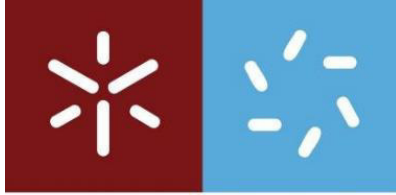


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Patrícia Rebelo Peixoto

Avaliação do efeito antimicrobiano de nanomateriais mono e bimetálicos baseados em zeólitos



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ana Patrícia Rebelo Peixoto

**Avaliação do efeito antimicrobiano de
nanomateriais mono e bimetálicos baseados
em zeólitos**

Tese de Mestrado

Mestrado em Bioquímica Aplicada

Especialização em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Professora Doutora Maria Isabel Pontes Correia Neves

Maio de 2017

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Patrícia Rebelo Peixoto

Endereço eletrónico: patricia.peixoto9@gmail.com

Telefone: +351 916 366 853

Cartão do Cidadão: 13347862

Título da tese de mestrado: Avaliação do efeito antimicrobiano de nanomateriais mono e bimetálicos baseados em zeólitos.

Orientadores:

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Professora Doutora Maria Isabel Pontes Correia Neves

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Bioquímica Aplicada

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE.

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura,

Agradecimentos

A poucos momentos de terminar esta longa e importante etapa, quero agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, foram essenciais ao longo deste percurso.

Às minhas orientadoras, professora Cristina Aguiar e professora Isabel Correia Neves, pela oportunidade que me deram de realizar este trabalho. Obrigada por todo o apoio e disponibilidade que sempre demonstraram, pelos conselhos, por todas as palavras de motivação e sobretudo pelos ensinamentos que me foram transmitindo ao longo desta jornada. Aprendi e evoluí imenso. Muito obrigada por tudo! O mérito também é vosso.

Ao professor António Maurício Fonseca agradeço toda a dedicação e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo deste processo.

Ao professor Rui Oliveira, pela sua disponibilidade, por toda a ajuda prestada no laboratório, não esquecendo a partilha de material em situações de necessidade.

Quero também agradecer à Liliane, que foi a pessoa que mais me tolerou durante esta etapa e que ouviu todas as minhas inseguranças e desabafos. Obrigada pela companhia nos dias (muitas vezes noites!) de trabalho, quer no laboratório, na biblioteca ou onde fosse possível e, essencialmente, quero agradecer por toda a ajuda, pela paciência e por me ajudar a manter a sanidade mental, principalmente nas últimas semanas. Obrigada é pouco!

À Joana Guedes, pela partilha de conhecimentos, por me ter ajudado na preparação dos nanomateriais e também pelo apoio essencial nos primeiros dias de laboratório.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por toda a boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram. Quero agradecer em especial à Carina pela sua boa disposição diária, por me acompanhar neste percurso, mas principalmente por toda a ajuda, incentivo e por todo o apoio que me deu no laboratório.

Ao DB e ao DQ por me terem facultado o espaço e os materiais para a realização deste trabalho. Agradeço também aos técnicos de laboratório, especialmente ao Luís Correia e à Manuela Rodrigues por toda disponibilidade e pela sua constante e incansável ajuda.

Aos meus amigos de sempre, Filipa, Rita, Fábio, Marco e Paula, pela amizade, pelo apoio constante e por todas as palavras de incentivo que sempre me deram.

Por último, mas não menos importante, tenho de agradecer aos meus pais pela educação e formação que me proporcionaram, mas sobretudo, por todo o apoio e dedicação. Obrigada também à minha irmã pela ajuda e por toda a paciência, principalmente nos últimos dias.

Avaliação do efeito antimicrobiano de zeólitos mono e bimetálicos em microrganismos

Resumo

O estudo da nanotecnologia em dispositivos médicos tem vindo a despertar cada vez mais interesse, permitindo a obtenção de materiais com um novo conjunto de propriedades à escala nano, que podem ser aplicados para diagnóstico, prevenção ou mesmo tratamento de doenças. O presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de novos e eficientes nanomateriais com propriedades antimicrobianas baseados em zeólitos. Para isso, foi escolhida a estrutura do zeólito NaY tendo em conta a sua elevada capacidade de troca iónica, que permite a inclusão de um ou dois íões metálicos com propriedades antimicrobianas: prata, zinco e/ou cobre. Assim, para a obtenção dos nanomateriais mono e bimetálicos foram introduzidos íões metálicos na estrutura do zeólito NaY através do método de troca iónica. Os nanomateriais obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios-X (XRD), Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM), Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma de Indução Acoplada (ICP-AES) e pela determinação do valor de pH_{PZC} de modo a comprovar a presença dos íões metálicos e a estabilidade da estrutura do zeólito após a preparação dos nanomateriais.

O potencial antimicrobiano dos nanomateriais foi avaliado contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus methicillin-resistant* (MRSA) e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. O valor da concentração mínima inibitória (MIC) para cada par nanomaterial/microrganismo foi determinado, verificando-se que as bactérias são mais sensíveis que as leveduras. Os ensaios antimicrobianos indicaram também que, entre os nanomateriais testados, $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ foram os mais ativos. Outros nanomateriais com diferentes quantidades de prata foram adicionalmente testados e comparados com diferentes antibióticos comerciais. Todos os nanomateriais testados exibiram um efeito superior à ação dos antibióticos vancomicina e eritromicina em *E. coli*, para os quais esta bactéria é resistente. Já em *S. aureus*, a ação da maior parte dos nanomateriais foi superior à ação da vancomicina, antibiótico ao qual é suscetível. Já para a MRSA, todos os nanomateriais de prata revelaram algum efeito antimicrobiano, contrariamente aos antibióticos testados, aos quais esta bactéria é resistente. Os resultados obtidos revelam que alguns dos nanomateriais estudados possuem propriedades muito promissoras e de potencial aplicação em infeções de origem microbiana, sobretudo em bactérias multirresistentes uma vez que os fármacos existentes no mercado não são eficazes.

Palavras-chave: nanomateriais, zeólitos, íões metálicos, propriedades antimicrobianas, bactérias multirresistentes.

Evaluation of the antimicrobial effect of mono and bimetallic zeolites in microorganisms

Abstract

The study of nanotechnology in medical devices has been attracting more and more interest, allowing the acquisition of materials with a new set of properties at nanometer scale, which can be applied for diagnosis, prevention or even treatment of diseases. The present work has as main objective the development of new and efficient nanomaterials with antimicrobial properties based on zeolites. For this, NaY zeolite structure was chosen due to its high ion exchange capacity which allows the inclusion of one or two metal ions with antimicrobial properties: silver, zinc and/or copper. Therefore, to obtain the mono and bimetallic nanomaterials metal ions were introduced in the NaY zeolite structure through ion exchange method. The obtained nanomaterials were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM), Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) and by determination of the pH_{pzc} value in order to verify the presence of the metal ions and the stability of the zeolite structure after preparation of the nanomaterials.

The antimicrobial potential of the nanomaterials was evaluated against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus methicillin-resistant* (MRSA) and the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined for each nanomaterial/microorganism pair, showing that bacteria are more sensitive to nanomaterials than yeasts. The antimicrobial assays also indicated that among the tested nanomaterials, $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ were the most active. Other materials with different amounts of silver were additionally tested and compared with different commercial antibiotics. All the nanomaterials tested showed a higher effect to the action of the antibiotics vancomycin and erythromycin in *E. coli*, for which this bacterium is resistant. In *S. aureus*, the action of most of the nanomaterials was higher than the action of vancomycin, antibiotic to which it is susceptible. For MRSA, all the silver nanomaterials showed some antimicrobial effect, contrary to the tested antibiotics, to which this bacterium is resistant. The results show that some of the studied nanomaterials have very promising properties and potential application in infections of microbial origin, especially in multi-resistant bacteria since the existing drugs on the market are not effective.

Keywords: nanomaterials, zeolites, metallic ions, antimicrobial properties, multi-resistant bacteria.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas	xv
1. Introdução	1
1.1. Nanomateriais com propriedades antimicrobianas.....	3
1.2. Zeólitos	3
1.2.1. Estrutura e propriedades	4
1.2.2. Zeólito A	6
1.2.3. Zeólito ZSM-5.....	7
1.2.4. Zeólito Y.....	8
1.3. Zeólitos como agentes antimicrobianos	9
1.4. Metais com propriedades antimicrobianas	10
1.4.1. Prata.....	10
1.4.2. Zinco.....	12
1.4.3. Cobre.....	13
1.5. Objetivos	14
2. Materiais e Métodos.....	15
2.1. Zeólito selecionado.....	17
2.2. Método de troca iônica.....	17
2.3. Preparação dos zeólitos monometálicos	17
2.4. Preparação dos nanomateriais bimetálicos.....	19
2.5. Técnicas de caracterização	19
2.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	19
2.5.2. Difração de Raios-X (XRD).....	21
2.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	22
2.5.4. Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma de Indução Acoplada (ICP-AES)	23
2.5.5. Determinação do valor do pH_{PZC}	23
2.6. Avaliação da atividade antimicrobiana	24
2.6.1. Microrganismos.....	24
2.6.2. Meios de cultura e manutenção de culturas microbianas.....	24

2.6.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanomateriais mono e bimetálicos	25
2.6.3.1.	Análise da viabilidade microbiana.....	26
2.6.3.2.	Método de difusão em disco.....	27
3.	Resultados e Discussão	29
3.1.	Caracterização dos nanomateriais	31
3.1.1.	Análise por FTIR	31
3.1.2.	Análise por XRD.....	32
3.1.3.	Análise por TEM	34
3.1.4.	Análise por ICP-AES	35
3.1.5.	Determinação do valor de pH_{PZC}	36
3.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanomateriais mono e bimetálicos.....	36
3.2.1.	Análise da viabilidade microbiana	36
3.2.2.	Método de difusão em disco	47
4.	Conclusões	53
5.	Referências	57

Lista de Abreviaturas

A ⁺	prata iônica
A ⁰	prata metálica
Ag _{0,01} A	zeólito A permutado com prata (0,01 M)
Ag _{0,01} Y	zeólito Y permutado com prata (0,01 M)
Ag _{0,001} Y	zeólito Y permutado com prata (0,001 M)
Ag _{0,002} Y	zeólito Y permutado com prata (0,002 M)
Ag _{0,01} ZSM-5	zeólito ZSM-5 permutado com prata (0,01 M)
AMC	antibiótico amoxicilina/ácido clavulânico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CIP	antibiótico ciprofloxacina
Cu _{0,05} Y	zeólito Y permutado com cobre (0,05 M)
Cu ²⁺	ião cobre
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERI	antibiótico eritromicina
FAU	código atribuído pela IZA para a estrutura do tipo faujasite
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>)
h	horas
ICP-AES	Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma de Indução Acoplada (do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i>)
IZA	<i>International Zeolite Association</i>
KBr	Brometo de potássio
LB	meio de cultura <i>Lysogeny Broth</i>
LBA	meio de cultura <i>Lysogeny Broth</i> suplementado com agar

LTA	código atribuído pela IZA para a estrutura do tipo Linde type A
MFI	código atribuído pela IZA para a estrutura do tipo <i>Mordenite Framework Inverted</i>
MIC	concentração mínima inibitória (do inglês: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
min	minutos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>meticillin-resistant</i>
NaA	zeólito A na sua forma básica
NaY	zeólito Y na sua forma básica
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH _{pzc}	pH nos pontos de carga zero
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento (do inglês: <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEM	Microscopia Eletrónica de Transmissão (do inglês: <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VAN	antibiótico vancomicina
XRD	Difração de raios-X (do inglês: <i>X-ray Diffraction</i>)
YPD	meio de cultura <i>Yeast extract peptone dextrose</i>
YPDA	meio de cultura <i>Yeast extract peptone dextrose</i> suplementado com agar
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	zeólito Y permutado com zinco (0,05 M) e prata (0,01 M)
Zn ²⁺	ião zinco
ZSM-5	<i>Zeolite Socony Mobil-5</i>

Lista de Figuras

Figura 1 - Unidade primária do zeólito - TO_4 , onde T representa um átomo de Silício ou Alumínio (adaptado de Georgiev et al., 2009).

Figura 2 - Arranjo tridimensional do tetraedro TO_4 , onde T pode ser um átomo de Si ou Al. No caso de T ser Al, o tetraedro apresenta carga elétrica negativa (Martins e Cardoso, 2006).

Figura 3 - Estrutura típica do zeólito A (IZA, 2016).

Figura 4 - Dimensão do poro do zeólito A (IZA, 2016).

Figura 5 - Estrutura típica do zeólito ZSM-5 (IZA, 2016).

Figura 6 - (A) e (B) Dimensões dos poros do zeólito ZSM-5 (IZA, 2016).

Figura 7 - Estrutura típica do zeólito Y onde se verifica a dimensão da supercavidade (1,12 nm) a cavidade sodalite e os duplos prismas hexagonais (adaptado de Lutz, 2014).

Figura 8 - Dimensão do poro do zeólito Y (IZA, 2016).

Figura 9 - Processo de calcinação usado na preparação dos nanomateriais, representando-se a temperatura em função do tempo. O segmento 1 representa o período de aquecimento (aproximadamente 1h30min), dos 20 °C aos 500 °C, com velocidades de 5 °C/min. No segmento 2, a temperatura foi mantida a 500 °C durante 4 h. O segmento 3 corresponde à fase de arrefecimento, com diminuição da temperatura até se atingir a temperatura ambiente. O fluxo de ar durante este processo foi de 30-40 mL/min (adaptado de Guedes, 2015).

Figura 10 - Componentes presentes num espectrofotómetro de FTIR (adaptado de Stuart, 2005).

Figura 11 - Espectro de infravermelho do zeólito NaY com as regiões de vibração definidas. Região 1: vibração de deformação do anel duplo; Região 2: vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T; Região 3 vibrações dos grupos hidroxilos (T-OH) (Figueiredo, 2007).

Figura 12 – Espectros de FTIR dos nanomateriais monometálicos, $Cu_{0,05}Y$, $Zn_{0,05}Y$ e $Ag_{0,01}Y$, em comparação com o espectro do zeólito NaY.

Figura 13 - Espectros de FTIR do nanomaterial bimetálico $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$, em comparação com o espectro de NaY e $Zn_{0,05}Y$.

Figura 14 - Padrões de difração de raios-X de NaY, $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$.

Figura 15 – Micrografias de TEM de $Ag_{0,01}Y$ (à esquerda) e de $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ (à direita).

Figura 16 - Viabilidade (UFC/mL) da bactéria *E. coli* após 0 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de NaY, Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial (n=1).

Figura 17 - Viabilidade (UFC/mL) da levedura *S. cerevisiae* após 0 (A) e 48 h (B) de incubação a 30 °C, 200 rpm com 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de NaY, Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial (n=1).

Figura 18 - Avaliação da atividade antimicrobiana de Ag_{0,01}Y contra as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* e contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. As células foram incubadas a 30 °C ou 37 °C, 200 rpm com Ag_{0,01}Y nas concentrações 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. Após 24 h foram retiradas alíquotas de cada cultura e diluídas até 10⁻⁴ sendo colocadas alíquotas de 10 µL de cada uma das diluições em placas de YPDA e LBA e incubadas a 30 °C durante 48 h ou a 37 °C durante 24 h, conforme se tratasse respetivamente de leveduras ou de bactérias.

Figura 19 - Viabilidade (UFC/mL) das leveduras *S. cerevisiae* (A) e *C. albicans* (B) após 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 8 (T8) e 10 (T10) h de incubação a 30 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Figura 20 - Viabilidade (UFC/mL) das bactérias *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) após 0 (T0), 20 (T20), 40 (T40) e 60 (T60) min de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Cu_{0,05}Y e Zn_{0,05}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Figura 21 - Viabilidade UFC/mL das bactérias *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) após 0 (T0), 10 (T10), 20 (T20), 30 (T30) 40 (T40) e 60 (T60) min de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Figura 22 - Percentagem de inibição de células viáveis de *E. coli* provocada por 0,2 mg/mL após 60 minutos de incubação com os nanomateriais Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. A significância da diferença entre a eficácia antimicrobiana de cada nanomaterial é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p.

Lista de Tabelas

Tabela I - Classificação estrutural dos zeólitos (adaptado de van Bekkum et al., 2001).

Tabela II - Características dos reagentes usados no método de troca iônica.

Tabela III - Nanomateriais monometálicos preparados neste trabalho.

Tabela IV - Características das estirpes de bactérias e leveduras utilizadas.

Tabela V – Composição do meio LBA.

Tabela VI - Composição do meio YPDA.

Tabela VII - Análise por XRD dos materiais: informação sobre a cristalinidade e a razão Si/Al.

Tabela VIII - Análise química das amostras: razão Si/Al, quantidades de sódio (Na), prata (Ag) e zinco (Zn) determinadas por ICP-AES.

Tabela IX - Valores de pH_{PZC} obtidos para NaY, $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$.

Tabela X - Valores de MIC (mg/mL) dos nanomateriais contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*.

Tabela XI - Nanomateriais usados para o método de difusão em disco. Para estes nanomateriais indica-se também a percentagem de prata, zinco e a razão Si/Al.

Tabela XII - Efeito antimicrobiano de 50 μ L de cada nanomaterial nas leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Os resultados estão expressos na medida do diâmetro de cada halo de inibição (em mm). - Ausência de halo.

Tabela XIII - Critérios de diâmetro listados para os antibióticos vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) (adaptado de CLSI, 2015).

Tabela XIV - Efeito antimicrobiano de 50 μ L dos nanomateriais a 2 mg/mL e dos antibióticos comerciais (vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) nas bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA. Os resultados estão expressos na medida do diâmetro de cada halo de inibição (em mm). - Ausência de halo.

Tabela XV - Atividade antibacteriana dos nanomateriais em comparação com o efeito dos antibióticos vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) em que + significa maior atividade antibacteriana que o antibiótico, - menor atividade que a do antibiótico e = quando a atividade do nanomaterial é idêntica à do antibiótico. A sombreado indicam-se os antibióticos para os quais cada bactéria testada é suscetível.

1. Introdução

1.1. Nanomateriais com propriedades antimicrobianas

A nanotecnologia envolve a adaptação de materiais a uma escala entre 1 e 100 nanômetros com o objetivo de atingir propriedades únicas, podendo ser manipulados para uma diversidade de aplicações desejadas (Gleiter, 2000). Os nanomateriais são cada vez mais procurados para aplicações médicas devido à sua capacidade de adaptação ao funcionamento biológico (Xu et al., 2006). Estes materiais podem transportar fármacos que podem ajudar a combater patologias como o cancro (Farokhzad et al., 2006) e também espécies ativas contra agentes patogénicos como as bactérias (Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Morones et al., 2005; Panáček et al., 2006; Shrivastava et al., 2010).

O estudo de materiais em nanoescala tem sido bastante explorado nos últimos anos devido às propriedades físico-químicas únicas que esses nanomateriais possuem e que podem atuar contra microrganismos (Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Ruparelia et al., 2008; Rai et al., 2009; Shrivastava et al., 2010). Os zeólitos são estruturas com canais e cavidades em escala nano, com dimensões estritamente regulares (microporos), que possuem propriedades únicas e têm sido utilizados como suportes na preparação de materiais antimicrobianos para prevenção/tratamento de doenças microbianas (Demirci et al., 2013).

1.2. Zeólitos

Os zeólitos são uma classe de minerais descobertos em 1756 pelo mineralogista sueco Axel Fredrik Crönstedt (Xu et al., 2006). A estilbite foi o primeiro zeólito natural a ser identificado quando Crönstedt descobriu que, ao ser aquecido, libertava água de forma tão vigorosa que parecia estar a ferver. Assim, o termo zeólito surgiu da combinação das palavras gregas *Zeo* (ferver) e *Lithos* (pedra ou rocha) (Turcotte e Johnson, 1992; Pescarmona, 2003). Desde então, foram também identificados outros zeólitos naturais tais como analcite, clinoptilolite, erionite, heulandite e mordenite (Chester e Derouane, 2009). No entanto, apesar das suas propriedades como adsorventes e catalisadores, os zeólitos naturais possuem irregularidades nas suas estruturas que podem limitar a sua aplicação (Chester e Derouane, 2009). Isto impulsionou a síntese de zeólitos (como os zeólitos A, X e Y) de modo a ajustar as suas propriedades físico-químicas, como a composição e o tamanho, otimizando o material para a função pretendida (Bogdanov et al., 2009). Hoje em dia há inúmeros zeólitos sintéticos que são mais vantajosos que os naturais na medida em que possuem uma maior pureza, um tamanho uniforme de poros e permitem uma maior capacidade de permuta de iões (Turcotte e Johnson, 1992; Bogdanov et al., 2009). Estas características conferem aos zeólitos a vantagem de poderem ser usados para diferentes

aplicações em processos de catálise, adsorção, troca iônica e separação (van Bekkum, 1991; Bogdanov et al., 2009; Chester e Derouane, 2009; Zhang et al., 2010; Demirci et al, 2013; Chibani et al., 2016). Recentemente, estes materiais têm vindo a ser usados como agentes antimicrobianos com a introdução de íons metálicos com propriedades antimicrobianas na estrutura zeolítica, através do método de troca iônica (Karami e Rohani, 2009; Zhang et al., 2010; Demirci et al, 2013; Chibani et al., 2016). Até à data, foram definidos pela IZA (*International Zeolite Association*), que regulariza e confere a nomenclatura de todas as estruturas zeolíticas, 67 zeólitos naturais e 213 tipos de zeólitos sintéticos (IZA, 2016).

1.2.1. Estrutura e propriedades

Os zeólitos são aluminossilicatos cristalinos microporosos cuja estrutura tridimensional é constituída por átomos de silício (Si) e alumínio (Al) ligados entre si por átomos de oxigénio. Estes átomos formam um arranjo tridimensional de tetraedros TO_4 (unidades primárias dos zeólitos) em que T é um átomo de Si ou Al ligado a quatro átomos de oxigénio (Figura 1). Cada átomo de Si e Al está contido num tetraedro com quatro átomos de oxigénio nos vértices, formando tetraedros de SiO_4 e AlO_4^- . Estes estão ligados através da partilha um átomo de oxigénio, resultando numa macromolécula inorgânica com uma geometria tetraédrica tridimensional (Guisnet e Ribeiro, 2004).

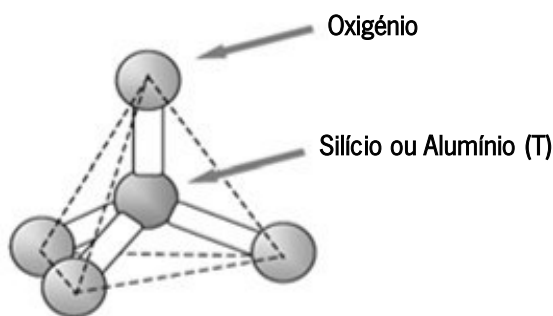


Figura 1 - Unidade primária do zeólito - TO_4 , onde T representa um átomo de Silício ou Alumínio (adaptado de Georgiev et al., 2009).

Nas estruturas zeolíticas (onde cada átomo de oxigénio partilha dois átomos T) cada átomo de silício (com número de oxidação igual a +4) está ligado a quatro átomos de oxigénio compartilhados, estando o sistema eletricamente neutro. No entanto, a presença do átomo de alumínio (com número de oxidação +3), que estabelece o mesmo tipo de ligação com os átomos de oxigénio, não permite o balanço da carga total da estrutura gerando uma carga negativa (Figura 2) (Pescarmona, 2003; Corma e Garcia, 2004; Horcajada et al., 2006; Martins e Cardoso, 2006; Ferreira, 2012). Esta carga negativa é

compensada pela introdução de catiões, normalmente metais alcalinos e alcalinoterrosos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , entre outros) ligados não covalentemente. Como não estão ligados à estrutura de forma covalente, estes estão livres para se moverem nos canais da rede podendo ser substituídos, através de permuta iônica, por outros catiões em solução, conferindo aos zeólitos a capacidade de permutarem catiões em solução aquosa (Figueiredo, 2007).

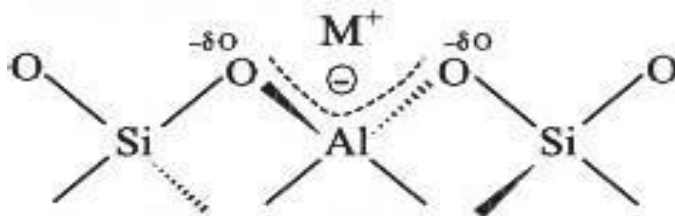
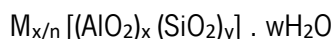


Figura 2 - Arranjo tridimensional do tetraedro TO_4 , onde T pode ser um átomo de Si ou Al. No caso de T ser Al, o tetraedro apresenta carga elétrica negativa (Martins e Cardoso, 2006).

A razão Si/Al é um parâmetro muito utilizado para determinar a composição química de um zeólito, sendo que, segundo a regra de Löwenstein, esta razão assume valores nunca inferiores a 1 (no caso em que o número de átomos de Si é igual ao número de átomos de Al). Esta regra dita não ser possível a ligação entre dois tetraedros AlO_4^- , ou seja, o valor mínimo da razão Si/Al será quando todos os tetraedros SiO_4 estejam individualmente ligados a tetraedros AlO_4^- e vice-versa, não existindo um limite máximo definido. Nos zeólitos naturais, o valor de Si/Al está situado entre 5 e 6 (Tsitsishvili et al., 1992; Pina et al., 2011; Montalvo et al., 2012). A alteração da razão Si/Al pode levar a variações na acidez do zeólito, uma vez que quanto maior a razão Si/Al da estrutura, maior será a força dos centros ácidos (Pescarmona, 2003; Montalvo et al., 2012). Esta acidez dos zeólitos deve-se essencialmente aos grupos hidroxilo (OH) (Rebello, 2009). A razão Si/Al permite avaliar a capacidade iônica dos zeólitos e as suas propriedades como a estabilidade térmica e química ou a polaridade (Auerbach et al., 2003; Figueiredo, 2007). A acidez e a resistência ácida de um zeólito podem ser modificadas por alteração do pré-tratamento da amostra ou método de preparação, por troca dos catiões usados, modificando a razão Si/Al ou por substituição de Al e Si (Deka, 1998).

De entre as propriedades destes materiais destaca-se a alta estabilidade térmica, a capacidade de permuta de iões, a grande área superficial, com poros e cavidades de tamanhos regulares (Chester e Deroune, 2009; Zhang et al., 2010; Demirci et al., 2013; Chibani et al., 2016). A capacidade de permuta iônica está, normalmente, relacionada com a razão Si/Al, em que zeólitos com menor razão Si/Al

possuem uma maior capacidade de permuta de iões (Demirci et al., 2013). A fórmula estrutural de um zeólito é baseada no seu teor em óxidos de silício e alumínio sendo representada por:



onde M é o catião, n é a carga do catião, w é o número de moléculas de água por unidade de célula, x e y o número total de unidades tetraédricas por unidade de célula (van Bekkum et al., 2001).

O tamanho do poro do zeólito é um fator importante na seletividade de iões. O tamanho do anel define o poro, n-anel, em que n é o número de átomos T presentes. Assim, esta propriedade pode ser utilizada para classificar os zeólitos em quatro grupos de acordo com o tamanho do poro: pequeno, médio, largo e extralargo (Tabela I) (Turcotte e Johnson, 1992; van Bekkum et al., 2001).

Tabela I - Classificação estrutural dos zeólitos (adaptado de van Bekkum et al., 2001).

Classificação	n-anel	Tamanho do poro (nm)	Exemplo de zeólito
Poros pequenos	8	0,30 – 0,45	A
Poros médios	10	0,45 – 0,60	ZSM-5
Poros largos	12	0,60 – 0,80	X e Y
Poros extra-largos	≥ 14	0,80 – 1,0	UTD-1

Os zeólitos A, X, Y e ZSM-5 são exemplos de estruturas de zeólito sintéticas sendo bastante utilizados atualmente (Bogdanov et al., 2009, Demirci et al., 2013). Possuem capacidade para a permuta iônica, que é a característica essencial na preparação de nanomateriais com propriedades antimicrobianas (Demirci et al., 2013). Os zeólitos de poros pequenos (zeólito A) e poros médios (zeólito ZSM-5) foram amplamente estudados por Guedes (2015). Estas estruturas demonstraram ser excelentes hospedeiros para iões metálicos com propriedades antimicrobianas (Guedes 2015). O zeólito utilizado neste trabalho pertence ao grupo de poros largos (zeólito Y).

1.2.2. Zeólito A

O zeólito A possui uma estrutura base do tipo *Linde Type A* - LTA (código atribuído pela IZA), estando as suas cavidades de sodalite numa disposição cúbica e unidas por pontes de oxigénio para formar 4 anéis duplos (Figura 3) (Georgiev et al., 2009; IZA, 2016). A sua fórmula química é representada por $|Na_{12}(H_2O)_{27}|_8 [Al_{12}Si_{12}O_{48}]_8$ e é sintetizado geralmente na forma sódica (NaA) (Baerlocher et al., 2007).

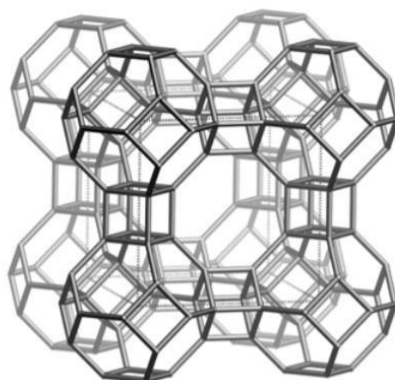


Figura 3 - Estrutura típica do zeólito A (IZA, 2016).

Este zeólito é considerado um zeólito de poro pequeno com diâmetro 0,41x0,41 nm (Figura 4) e possui baixa razão Si/Al (Chester e Derouane, 2009; IZA, 2016). O zeólito A é essencialmente utilizado em processos de adsorção e separação o que o torna muito significativo em termos comerciais (Terzioglu, 2016).

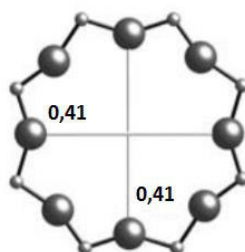


Figura 4 - Dimensão do poro do zeólito A (IZA, 2016).

1.2.3. Zeólito ZSM-5

O zeólito ZSM-5 possui estrutura base do tipo MFI (*Mordenite Framework Inverted topology*) (Figura 5) e pertence à família de zeólitos com as iniciais ZSM (*Zeolite Socony Mobil*) (Chester e Derouane, 2009; IZA, 2016). A sua fórmula química é representada por $|Na_n(H_2O)_{16}|[Al_nSi_{96-n}O_{192}]$ (Baerlocher et al., 2007). O zeólito ZSM-5 é considerado um zeólito de poro médio sendo a sua estrutura formada por dois sistemas de canais lineares (com poros de dimensões 0,51x0,55 nm; Figura 6A) e sinusoidais (com poros de dimensões 0,53x0,56 nm; Figura 6B) que se cruzam entre si formando cavidades com cerca de 0,9 nm de diâmetro (Turcotte e Johnson, 1992; Baerlocher et al., 2007; Chester e Derouane, 2009, IZA, 2016).

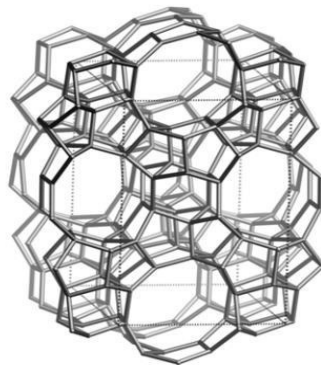


Figura 5 - Estrutura típica do zeólito ZSM-5 (IZA,2016).

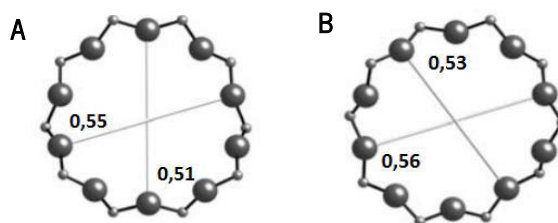


Figura 6 - (A) e (B) Dimensões dos poros do zeólito ZSM-5 (IZA, 2016).

Este zeólito é caracterizado pelo seu elevado teor em sílica e elevada estabilidade térmica o que o torna um excelente material na catálise e também como adsorvente (Chester e Deroune, 2009; Zhang et al., 2010).

1.2.4. Zeólito Y

O zeólito Y (Figura 7) pertence à família da faujasite (correspondente ao código FAU, atribuído pela IZA) sendo considerado o zeólito catalítico mais importante, uma vez que é o mais utilizado na investigação e na indústria (Karami e Rohani, 2009). Este zeólito apresenta diferentes análogos, na forma sódica (NaY) e protônica (HY) (Kaduk e Faber, 1995; Lutz, 2014). A unidade estrutural do zeólito Y contém 8 cavidades de sodalite que se ligam entre si por 8 prismas hexagonais formando cavidades maiores, designadas por supercavidades. Estas supercavidades têm um diâmetro livre de 1,12 nm e estão interligadas através de quatro aberturas (poros) com um diâmetro de 0,74 nm, sendo este zeólito considerado de poro largo (Figura 8) (Lutz, 2014).

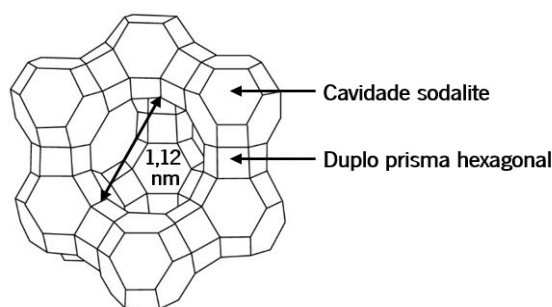


Figura 7 - Estrutura típica do zeólito Y onde se verifica a dimensão da supercavidade (1,12 nm) a cavidade sodalite e os duplos prismas hexagonais (adaptado de Lutz, 2014).

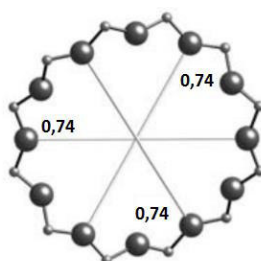


Figura 8 - Dimensão do poro do zeólito Y (IZA, 2016).

O zeólito Y tem elevada estabilidade térmica e é representado pela sua fórmula química geral $[(Ca, Mg, Na_2)_{29}(H_2O)_{240}][Al_{58}Si_{134}O_{384}]$ (Baerlocher et al., 2007) sendo que a sua baixa razão Si/Al pressupõe uma elevada capacidade de permuta iónica (Figueiredo, 2007; van Bekkum, 2001).

1.3. Zeólitos como agentes antimicrobianos

O aumento da resistência aos antibióticos e o aparecimento de espécies multirresistentes exigem uma nova abordagem para o tratamento de infeções (Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Hu e Xia, 2006; Rai et al., 2009; Lara et al., 2010; Chen et al., 2014). Assim, torna-se bastante importante a descoberta de novas estratégias com propriedades antimicrobianas que possam atuar contra microrganismos e também diminuir a resistência a antibióticos. Os nanomateriais, dadas as suas propriedades, são atraentes para a utilização contra microrganismos, o que tem impulsionado a investigação nesta área (Inoue et al., 2002; Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Rai et al., 2009; Chen et al., 2014). Os zeólitos são estruturas nanométricas que podem ser usados como coadjuvantes no tratamento de doenças microbianas pela introdução de iões com propriedades antimicrobianas (Morones et al., 2005; Kim et al., 2008; Jones et al., 2008; Grass et al., 2011; Demirci et al., 2013). A utilização de zeólitos como agentes antimicrobianos tem sido possível devido à elevada capacidade de permuta iónica destas

estruturas e à estabilidade destes em meios biológicos, possuindo vantagens como a adsorção, armazenamento e libertação gradual dos metais de transição utilizados (Top e Ülkü, 2004; Monteiro et al., 2009; Sabbani et al., 2010; Lalueza et al., 2011; Inoue e Hamashima 2012). Neste trabalho, para testar o efeito dos zeólitos como agentes antimicrobianos, foram usados os metais de transição: prata, zinco e cobre, sendo estes inseridos na estrutura do zeólito por permuta iónica. Estes metais são bem conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas (Jaiswal et al., 2012).

1.4. Metais com propriedades antimicrobianas

1.4.1. Prata

Entre os cátions metálicos existentes, os iões prata são os mais reconhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas, não só por apresentarem baixa toxicidade em células humanas, mas também por serem biocidas de longa duração com elevada estabilidade térmica e volatilidade baixa (Kumar e Münstedt, 2005). Estudos relatam que a prata metálica possui uma forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, e alguns vírus (Matsumura et al., 2003; Rai et al., 2009). A prata é extremamente tóxica para os microrganismos (Berger et al., 1976; Slawson et al., 1992; Zhao e Stevens, 1998) e tem sido bastante usada na forma de prata metálica e nitrato de prata no tratamento de infeções, feridas e queimaduras (Silver e Phung, 1996; Crabtree et al., 2003; Dunn e Edwards-Jones, 2004; Tian et al., 2007, Ruparelia et al., 2008). É também usada na indústria em tecidos têxteis e no tratamento de águas residuais de hospitais contendo microrganismos infecciosos (Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Monteiro et al., 2009; Ruparelia et al., 2008; Rai et al., 2009)

A prata é geralmente aplicada na forma de nitrato de modo a induzir um efeito antimicrobiano (Chen et al., 2014). Estudos recentes mostram que nanopartículas de prata possuem excelentes propriedades antimicrobianas (Rai et al., 2009; Chen et al., 2014), tornando a prata muito procurada para terapias tópicas e para aplicação em dispositivos médicos, como cateteres e próteses de modo a prevenir a colonização bacteriana (Ruparelia et al., 2008; Monteiro et al., 2009; Jaiswal et al., 2012) e a sua incorporação em curativos ou revestimento de produtos médicos pode desempenhar um papel importante na era da resistência aos antibióticos (Ip et al., 2006). Soluções diluídas de nitrato de prata foram utilizadas desde o século XIX para tratar infeções e queimaduras antes da introdução do creme de sulfadiazina de prata (Fox, 1968). Foi comprovado que, das formas vulgarmente usadas em aplicações tópicas, os pensos revestidos com prata eram mais eficazes contra uma gama mais ampla de bactérias do que a base do creme, sendo menos irritantes e melhor tolerados (Ip et al., 2006). Assim, a prata

possui uma elevada capacidade antibacteriana na cicatrização de feridas reduzindo significativamente a inflamação através da aplicação de pensos revestidos com prata (Ip et al., 2006; Chen et al., 2014).

Estas nanopartículas possuem grande atividade antibacteriana contra uma variedade de bactérias incluindo as resistentes a antibióticos (Chen et al., 2014). Lara et al., (2010) mostraram o seu potencial bactericida contra a bactéria multirresistente *Pseudomonas aeruginosa*, contra *Escherichia coli* resistente à ampicilina e contra *Staphylococcus pyogenes* resistente à eritromicina. Foi igualmente demonstrado que as nanopartículas de prata não são apenas agentes antibacterianos, mas também antivirais e antifúngicos (Kim et al., 2008). Embora o mecanismo do efeito antimicrobiano dos íons metálicos não seja compreendido em pormenor, sabe-se que os íons Ag^+ induzem numerosos danos nas células Gram-positivas e Gram-negativas bacterianas. Os íons Ag^+ penetram facilmente através da parede celular e membrana plasmática entrando para a célula. Os íons prata interagem com o grupo tiol (-SH) das cisteínas existentes normalmente na membrana celular das bactérias (Zhang et al., 2009; Llorens et al., 2012; Pal et al., 2015) podendo reagir com a cisteína de modo a substituir o átomo de hidrogénio por um átomo de prata, formando o complexo S-Ag que irá afetar a estrutura de enzimas ligadas à membrana, como as enzimas da cadeia respiratória (Kim et al., 2008; Malachová et al., 2011). Com a inativação destas enzimas, o processo respiratório é interrompido sendo formadas espécies reativas de oxigénio (ROS) que desencadeiam a morte da bactéria. Um estudo realizado por Morones et al. (2005) sugere que as nanopartículas de prata atuam de três maneiras contra bactérias Gram-negativas: (1) nanopartículas na faixa de 1-10 nm atacam a superfície da membrana celular perturbando drasticamente a sua função, como permeabilidade e respiração; (2) são capazes de penetrar dentro das bactérias e causar danos adicionais, possivelmente interagindo com compostos contendo enxofre e fósforo, como o DNA; (3) as nanopartículas libertam os íons de prata que terão uma contribuição adicional para o efeito bactericida. Isto resulta num efeito antibacteriano bastante eficiente contra bactérias Gram-negativas (como *E. coli*, *P. aeruginosa*, entre outras) (Chen et al., 2014). Um outro estudo demonstrou que as nanopartículas de prata podem ancorar-se na parede celular bacteriana, penetrar na parede e levar à lise celular (Shrivastava et al., 2010). É adicionalmente referido que as nanopartículas de prata com pequenos tamanhos e uma grande área superficial têm a capacidade de atravessar a parede e a membrana celulares em células bacterianas (Knetsch e Koole, 2011). Já estudos de Kim et al. (2008) relataram que os radicais livres produzidos pelas nanopartículas de prata podem provocar danos na membrana celular aumentando a sua porosidade e levando, posteriormente, à morte celular. Os íons de prata que são libertados destas nanopartículas podem interagir com o fósforo no DNA impedindo a sua replicação. Podem também reagir com proteínas com enxofre para aumentar os níveis de ROS e inibir a

respiração enzimática, resultando também na morte celular (Feng et al., 2000; Matsumura et al., 2003; Morones et al., 2005). Provavelmente, os zeólitos com íons de prata ao libertarem estes íons deverão seguir um destes mecanismos e, portanto, podem ser usados na conservação de alimentos, desinfecção de dispositivos médicos, descontaminação de materiais, plásticos, *sprays* antissépticos e têxteis (Inoue et al., 2002; Rai et al., 2009; Guangjian et al., 2012).

1.4.2. Zinco

O zinco desempenha funções muito importantes no organismo humano estando associado a funções e estruturas de inúmeras macromoléculas aí presentes, sendo essencial a muitos processos enzimáticos e podendo atuar como agente anti-inflamatório e antioxidante (Coleman et al., 2009, Pasquet et al., 2014). Estudos relatam que os íons de zinco funcionam como agentes antimicrobianos contra um largo espectro de bactérias e alguns fungos (Coleman et al., 2009; Stanić et al., 2010; Guangjian et al., 2012; Shruti et al., 2013; Pasquet et al., 2014), embora sejam menos estudados que os íons de prata. Os íons zinco possuem, tal como os íons prata, uma elevada resistência ao calor, mas são menos eficazes que os íons de prata, sendo a sua capacidade antibacteriana apenas 1/1000 em comparação com os íons de prata (Guangjian et al., 2012). Uma das aplicações do zinco reside no uso a nível oral, tendo sido utilizado em materiais dentários sendo aplicado em amálgamas no tratamento da gengivite (Jaiswal et al., 2012). Pode também ser utilizado em dermatologia como tratamento tópico de infeções (verrugas, leishmaniose), dermatoses inflamatórias (acne, rosácea), ou como protetores solares e como ingrediente ativo de champôs anticaspa (Jaiswal et al., 2012; Pasquet et al., 2014). Tal como a prata, o zinco pode ser incorporado em zeólitos por permuta iónica permitindo, posteriormente, a sua utilização em várias aplicações como agente antimicrobiano contra um largo espectro de bactérias e alguns fungos (Top e Ülkü 2004; Malachová et al., 2011).

Os estudos sobre a utilização do zinco como agente antimicrobiano estão relacionados com nanopartículas de óxido de zinco que apresentam atividade bactericida através de múltiplos mecanismos tais como a foto-oxidação e a fotocatalise (Szabó et al., 2003; Chen et al., 2014). No entanto, os efeitos antibacterianos do óxido de zinco estão dependentes do volume das nanopartículas: nanopartículas de óxido de zinco de dimensões entre 10 e 50 nm exibem melhores propriedades antimicrobianas que partículas maiores (2 µm) (Yamamoto et al., 2000). A entrada das nanopartículas de óxido de zinco de pequenas dimensões na célula pode ser promovida por ultrassom e a combinação destes promove um efeito antibacteriano em *Staphylococcus aureus* ao produzir mais peróxido de hidrogénio (Seil e Webster, 2012). O tratamento com ultrassom pode também facilitar fisicamente a dissociação da membrana

celular, aumentando a penetração das partículas com óxido de zinco na célula (Seil e Webster, 2012; Chen et al., 2014). Outro dos mecanismos antibacterianos das nanopartículas com óxido de zinco é o aumento dos níveis de ROS intracelulares, tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH^\bullet) e o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O OH^\bullet e o $O_2^{\bullet-}$ não conseguem penetrar na membrana celular devido às suas cargas, no entanto o H_2O_2 consegue penetrar nas bactérias e induzir assim a morte celular durante a infeção (Sawai e Yoshikawa, 2004; Jones et al., 2008; Shah et al., 2013; Chen et al., 2014).

1.4.3. Cobre

Na sua forma iónica, o cobre desempenha funções muito importantes nos organismos vivos sendo crucial para o funcionamento dos órgãos e processos metabólicos. Apesar de ser essencial em pequenas quantidades, pode facilmente tornar-se tóxico quando usado em quantidades excessivas uma vez que os iões de cobre livres podem sofrer reações redox, alternando entre Cu(I) e Cu(II), que pode resultar na transferência de eletrões para o peróxido de hidrogénio, promovendo a formação de radicais hidroxilo que podem provocar danos celulares (Rensing e Grass, 2003; Santo et al., 2010).

Atualmente, estudos com nanopartículas de cobre ainda são escassos, no entanto, as suas propriedades, como o tamanho e a atividade antimicrobiana têm sido explorados por alguns investigadores (Yoon et al., 2007; Santo et al., 2010; Grass et al., 2011; Malaachová et al., 2001; Seil e Webster, 2012). As propriedades antibacterianas do cobre foram já testadas em agentes patogénicos humanos, como *Staphylococcus aureus* *meticillin-resisant* (MRSA), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*, tendo sido observada uma redução de bactérias viáveis após a incubação com cobre metálico (Mehtar et al., 2008). O principal mecanismo da atividade antibacteriana do cobre é sugerido como sendo morte mediada por contacto. Estudos com organismos resistentes, difíceis de erradicar, mostraram que o tempo de contacto com o cobre é um fator importante para a atividade antibacteriana (Mehtar et al., 2008; Grass et al., 2011). A morte mediada por contacto é precedida por uma série de ações específicas: danos na membrana celular, influxo de cobre para as células, dano oxidativo e danos no DNA (Santo et al., 2011). Vários estudos relataram que as bactérias Gram-positivas como *S. aureus* são mais sensíveis às nanopartículas de cobre quando comparadas com as bactérias Gram-negativas como *E. coli* (Yoon et al., 2007; Ruparelia et al., 2008; Seil e Webster, 2012). O mecanismo de ação antimicrobiano das nanopartículas de cobre poderá também estar relacionado com as interações eletrostáticas que estes, com carga positiva do metal, podem estabelecer com a carga negativa da membrana celular dos microrganismos. Estas interações possibilitam a entrada dos iões na membrana

celular através de canais iônicos, alterando assim a permeabilidade da membrana. Ao entrarem na célula, os íons cobre podem levar à substituição de íons essenciais, à inativação de enzimas, bloquear grupos funcionais de proteínas e pode ocorrer a produção de ROS que desempenham um papel fundamental na morte da bactéria (Hu et al., 2006; Akhavan e Ghaderi, 2010).

1.5. Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver novos nanomateriais com atividade antimicrobiana baseados em estruturas zeolíticas consideradas eficientes e estáveis. Para isso, foram escolhidas as estruturas NaA, NaY e ZSM-5 devido à sua capacidade de permuta iônica, o que permitiu a introdução de um ou dois íons metálicos (prata, zinco e/ou cobre). Os nanomateriais mono e bimetálicos baseados em zeólitos foram testados em diferentes microrganismos para avaliar as suas propriedades antimicrobianas, utilizando-se três estirpes de duas espécies de bactérias - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus methicillin-resistant* (MRSA) - e duas espécies de leveduras - *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

Alguns nanomateriais selecionados foram caracterizados por diferentes técnicas: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM), Difração de raios-X (XRD), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma de Indução Acoplada (ICP-AES). Após seleção dos nanomateriais, a sua ação antimicrobiana foi de novo avaliada num ensaio de difusão em placa, a par da de outros nanomateriais antibacterianos previamente estudados e de alguns antibióticos comerciais de utilização comum contra as bactérias estudadas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Zeólito selecionado

Neste trabalho foi utilizado o zeólito NaY (CBV100) fornecido pela *Zeolyst International*. O zeólito em pó apresenta uma razão de Si/Al de 2,40 e foi utilizado sem tratamento prévio.

2.2. Método de troca iônica

O método de troca iônica teve como objetivo a preparação de nanomateriais com propriedades antimicrobianas através da introdução de íons metálicos na estrutura zeolítica. Neste processo, o zeólito foi adicionado a uma solução aquosa de MNO_3 contendo o catião (M) desejado para permuta, em que M representa o íon prata, zinco ou cobre. Com a introdução de um íon metálico foram obtidos os zeólitos monometálicos e com a introdução sequencial de dois íons metálicos obtiveram-se os zeólitos bimetálicos.

Para a realização de cada troca iônica no zeólito NaY, foram utilizadas soluções de nitrato de prata (I), nitrato de zinco (II) e nitrato de cobre (II) cujas características estão descritas na Tabela II. Estes reagentes foram usados sem qualquer método adicional de purificação.

Tabela II- Características dos reagentes usados no método de troca iônica.

Reagente	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Fornecedor
Nitrato de prata (I)	$AgNO_3$	169,87	<i>Fisher Scientific</i>
Nitrato de zinco (II)	$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	297,48	<i>Sigma-Aldrich</i>
Nitrato de cobre (II)	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3 H_2O$	232,59	<i>Ridel-Haen</i>

2.3. Preparação dos zeólitos monometálicos

Como referido, os zeólitos monometálicos foram preparados através do método de troca iônica (Ferreira et al., 2015) introduzindo-se apenas um íon metálico (prata, zinco ou cobre) em cada estrutura zeolítica. Com essa finalidade, foram adicionados os zeólitos em soluções de nitrato de prata, zinco ou cobre com concentrações diferentes em balões de fundo redondo. No caso dos materiais com prata, o balão foi revestido com papel de alumínio de modo a evitar a redução do catião devido à sua sensibilidade à luz. Os balões foram colocados em agitação à temperatura ambiente, com uma velocidade de 300 rpm (rotações por minuto), durante 24 horas (h). Após este período, as soluções foram filtradas e lavadas

com água desionizada sendo posteriormente colocadas numa estufa a 90 °C durante aproximadamente 12 h para o processo de secagem. De seguida, os zeólitos monometálicos foram calcinados sob fluxo de ar a 500 °C durante 4 h, de acordo com o programa de calcinação representado na Figura 9. A calcinação foi realizada de forma a assegurar a remoção de todas as impurezas assim como para garantir a migração dos iões metálicos para o interior da estrutura zeolítica.

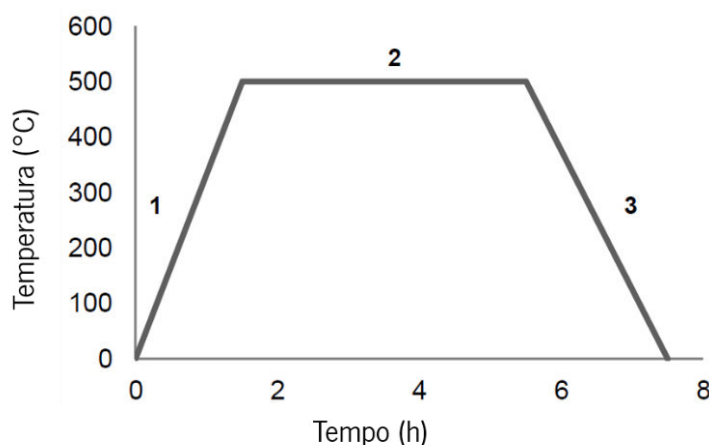


Figura 9 - Processo de calcinação usado na preparação dos nanomateriais, representando-se a temperatura em função do tempo. O segmento 1 representa o período de aquecimento (aproximadamente 1h30min), dos 20 °C aos 500 °C, com velocidades de 5 °C/min. No segmento 2, a temperatura foi mantida a 500 °C durante 4 h. O segmento 3 corresponde à fase de arrefecimento, com diminuição da temperatura até se atingir a temperatura ambiente. O fluxo de ar durante este processo foi de 30-40 mL/min (adaptado de Guedes, 2015).

No final do processo de calcinação, os nanomateriais monometálicos obtidos a partir do zeólito NaY pelo método de troca iónica (Tabela III) foram identificados como $M_x\text{Zeo}$, onde o M representa o ião permutado e x a concentração da solução do ião usada na troca iónica (por exemplo, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$).

Tabela III- Nanomateriais monometálicos preparados neste trabalho.

Zeólito de partida	Solução	Designação do material
NaY	AgNO_3 (0,01 M)	$\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$
	AgNO_3 (0,001 M)	$\text{Ag}_{0,001}\text{Y}$
	AgNO_3 (0,002 M)	$\text{Ag}_{0,002}\text{Y}$
	CuNO_3 (0,05 M)	$\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$
	ZnNO_3 (0,05 M)	$\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$

Para efeitos de comparação nos estudos do **Método de difusão em disco** (secção 2.6.3.2), foram adicionalmente utilizados dois nanomateriais preparados com prata a partir de duas estruturas zeolíticas diferentes, os zeólitos A e ZSM-5 - $\text{Ag}_{0,01}\text{A}$ e $\text{Ag}_{0,01}\text{ZSM-5}$ - que se encontram descritos em Guedes (2015).

2.4. Preparação dos nanomateriais bimetálicos

À semelhança do procedimento experimental descrito para os nanomateriais monometálicos, foi preparado o nanomaterial bimetálico $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$. A diferença reside no facto do zeólito base não ser o zeólito de partida (NaY), mas sim um zeólito monometálico obtido anteriormente. Assim, o nanomaterial bimetálico foi obtido através da introdução de um segundo ião metálico no zeólito monometálico pelo método de troca iónica, usando as mesmas condições experimentais usadas anteriormente, e seguindo-se a sua calcinação. Para efeitos de comparação nos estudos do **Método de difusão em disco** (secção 2.6.3.2), foi utilizado um nanomaterial preparado com zinco e prata ao partir do zeólito Y e com uma razão de Si/Al de 2,83 - $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ - que se encontra descrito em Ferreira (2012). Neste trabalho identificou-se o nanomaterial como, $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}^{(*)}$.

2.5. Técnicas de caracterização

Os nanomateriais mono e bimetálicos baseados em zeólitos foram caracterizados através de diferentes técnicas como a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios-X (XRD), Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM), Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma de Indução Acoplada (ICP-AES) e a determinação do valor de pH_{pzc} .

2.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica baseada na energia de absorção na região infravermelha do espectro eletromagnético que permite a identificação de grupos funcionais presentes nas moléculas, tornando-se bastante útil na análise estrutural de compostos (Li e Wu, 2003; Prati et al., 2016). A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é bastante utilizada na caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos ou na identificação de compostos (Li e Wu, 2003; Kalantar-zadeh e Fry, 2008), podendo ser usada não só em análises qualitativas como em análises quantitativas uma vez que o tamanho dos picos do espectro resultante está diretamente relacionado com

a quantidade de material presente na amostra (Meyers, 2000; Hof, 2003). Neste método há um dispositivo baseado na transformada de Fourier, designado por interferômetro, que produz um único tipo de sinal com todas as frequências de infravermelhos e que pode ser medido de uma forma rápida, normalmente na ordem de um segundo ou menos (Hof, 2003; Li e Wu, 2003). Como o sinal resultante, designado interferograma, não pode ser interpretado diretamente, será “descodificado” através de um programa matemático chamado transformada de Fourier, sendo realizado pelo computador que irá apresentar ao utilizador o espectro com a informação necessária para a análise (Figura 10) (Lambert et al., 1998).

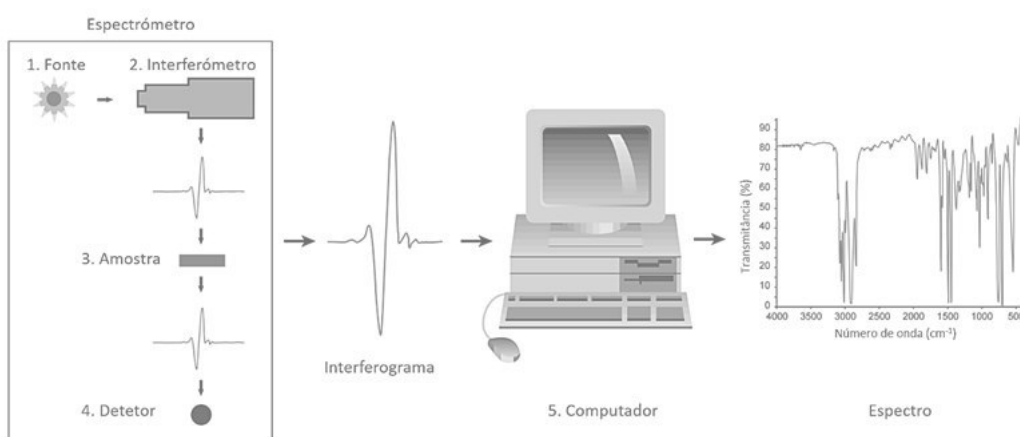


Figura 10 - Componentes presentes num espectrofotómetro de FTIR (adaptado de Stuart, 2005).

A espectroscopia FTIR tornou-se o método de espectroscopia de infravermelho mais utilizado na caracterização ou identificação de compostos uma vez que possui diversas vantagens como a elevada sensibilidade e resolução, a precisão e a rapidez de registo e também por ser um método simples e de baixo custo (Stuart, 2005; Lutz et al., 2002; Li e Wu, 2003; Ghesti et al., 2007; Kalantar-zadeh e Fry, 2008).

Para a caracterização dos zeólitos, a técnica de FTIR fornece informação sobre os grupos funcionais estruturais, a localização e a identificação de compostos introduzidos na estrutura (Li e Wu, 2003, Nibou et al., 2009). O espectro de infravermelho resultante compreende três zonas características (Lentys e Lercher, 2001):

- Entre 650 e 500 cm^{-1} : vibrações de deformação do anel duplo;
- Entre 1200 e 650 cm^{-1} : vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T (tetraedros SiO_4 e AlO_4);
- Frequências superiores a 3000 cm^{-1} : vibrações dos grupos hidroxilos (T-OH).

A presença de água na estrutura do zeólito origina uma banda de absorção na região ente 1650 e 1600 cm^{-1} (Mozgawa, 2000). Todas as zonas anteriormente descritas estão assinaladas na Figura 11 que é a representação do espectro de FTIR do zeólito NaY.

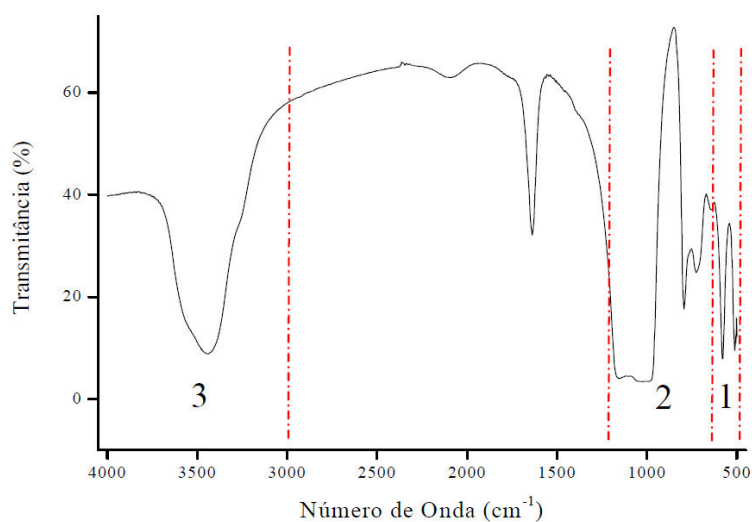


Figura 11 - Espectro de infravermelho do zeólito NaY com as regiões de vibração definidas. Região 1: vibração de deformação do anel duplo; Região 2: vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T; Região 3 vibrações dos grupos hidroxilos (T-OH) (Figueiredo, 2007).

Os espectros de FTIR dos nanomateriais antimicrobianos mono e bimetalicos e do zeólito de partida foram obtidos no espectrómetro *Bomen MB104* na região 4000 - 500 cm^{-1} sendo recolhidos a uma velocidade de vinte varrimentos por minuto e com uma resolução de 4 cm^{-1} . Para a obtenção dos espectros de FTIR foi necessária a preparação prévia de pastilhas de brometo de potássio (KBr) (*Panreac*) numa proporção de 5 mg de amostra para 100 mg de KBr, sendo esta mistura triturada num almofariz de ágata de modo a obter um pó homogéneo. O pó resultante foi prensado e foram obtidas as pastilhas usadas para a obtenção do espectro, por sua vez fornecido através de um programa informático designado *OriginLab*.

2.5.2. Difração de Raios-X (XRD)

A difração de raios-X (XRD) é uma técnica muito eficaz na caracterização de materiais. Esta técnica é fundamentada pelo fenómeno de difração da radiação que ocorre quando amostras com dimensões semelhantes às dimensões dos átomos são expostas à radiação de raios-X (Guisnet e Ribeiro, 2004). A XRD é essencial na caracterização estrutural de zeólitos (Lentys e Lercher, 2001) sendo possível

obter informações acerca das fases cristalinas, como a estrutura cristalina e o tamanho das cristalites (Castaldi et al., 2008; Kalantar-zadeh e Fry, 2008). Para além disso, esta técnica pode também ser utilizada na determinação da composição química dos zeólitos, particularmente a razão Si/Al da rede cristalina do zeólito, que poderá ser usada para posterior comparação com a razão Si/Al total obtida por análise química (Figueiredo, 2007). A determinação desta razão é baseada no facto das ligações químicas Si-O e Al-O terem diferentes comprimentos de ligação, influenciando assim a dimensão da célula unitária que varia de acordo com a razão Si/Al (Figueiredo, 2007).

Um espectro típico de difração de raios-X consiste numa sequência de picos que determinam a posição, intensidade e largura, sendo que a largura destes é influenciada pelo tamanho do cristal: quanto menor o tamanho da cristalite maior o alargamento do pico de difração (Figueiredo e Ramôa, 1989; Castaldi et al., 2008; Kalantar-zadeh e Fry, 2008).

A cristalinidade das amostras foi estudada utilizando um difractómetro *Philips Analytical X-Ray* modelo PW 1710 BASED, à temperatura ambiente. Esta análise foi realizada aplicando radiação Cu K α (40 kV e 30 mA) com varrimento a 2 °C/min em que as amostras foram previamente preparadas de acordo com o método padrão.

2.5.3. Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM) é uma técnica valiosa para a caracterização físico-química completa de nanopartículas (Malatesta, 2016). Trata-se de um método microscópico que emprega um feixe de eletrões de alta energia para transmitir através de um espécime de espessura nanométrica. Nesta técnica é formada uma imagem que é uma projeção da densidade de massa encontrada pelos eletrões que se deslocam através da amostra (Donk, 2007). A sua alta resolução permite obter informações sobre vários aspetos de um espécime, incluindo o tamanho, forma, cristalinidade ou composição dos materiais (Su, 2017; Qiu et al., 2014). Esta técnica baseia-se nos mesmos princípios básicos que um microscópio de luz, mas recorre a eletrões em vez de luz. Como os eletrões possuem menor comprimento de onda que a luz, a resolução ideal das imagens de TEM usufrui de uma melhor magnitude permitindo revelar a estrutura interna de uma forma mais detalhada (Neogy, 2006).

Para a caracterização estrutural das diferentes morfologias observadas nos nanomateriais, empregou-se a técnica de microscopia eletrónica de transmissão de modo a obter informações sobre a distribuição das partículas metálicas nas amostras. As imagens de TEM foram obtidas usando um

microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (HRTEM) utilizando um instrumento JEOL2010F, com uma resolução espacial de 0,19 nm, sob condições de desfocagem de Scherzer.

2.5.4. Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma de Indução Acoplada (ICP-AES)

A espectroscopia de emissão atômica é um método que permite a análise quantitativa e qualitativa dos elementos (Skoog et al., 1996). É uma técnica vantajosa na determinação de metais devido à sua rapidez, simplicidade de análise e facilidade de utilização dos equipamentos (Aceto et al., 2002).

A análise química feita por ICP-AES permitiu determinar a composição química e a concentração dos elementos presentes na amostra. Este método utiliza uma fonte de excitação de plasma de argônio a altas temperaturas (7000-10000 K) de modo a produzir átomos excitados que emitem radiação em comprimentos de onda característicos dos elementos presentes na amostra (Hof, 2003; Figueiredo, 2007). A amostra a analisar é previamente atomizada - a amostra é decomposta de forma a produzir uma fase gasosa de átomos e iões - e, ao interagir com a radiação eletromagnética, produz um espectro descontínuo de emissão. Este espectro consiste num conjunto de linhas que representam transições eletrônicas bem definidas. Com a amostra atomizada, os estados vibracionais, rotacionais e os efeitos indutivos são eliminados da ligação química (Figueiredo, 2007). A técnica de ICP-AES é muito útil na caracterização de materiais com iões metálicos diferentes, uma vez que permite avaliar se a permuta iônica realizada com a introdução de iões metálicos na estrutura zeolítica foi eficiente (Ferreira, 2012).

A análise química dos materiais preparados foi efetuada no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico, recorrendo ao espectrofotómetro de absorção atômica *Philips ICP PU 7000 Spectrometer* e utilizando o método de quantificação SMEWW 3120.

2.5.5. Determinação do valor do pH_{PZC}

Este ensaio foi realizado com o objetivo de determinar o valor do pH_{PZC} (valor de pH nos pontos de carga zero) dos nanomateriais mono e bimetalicos preparados e do zeólito de partida. Para isto, foram adicionadas 20 mg de cada amostra (NaY , $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$) a 15 mL de água destilada e mediu-se o valor de pH (entre pH 2 e pH 10) para assim obter o pH inicial de cada amostra. Foi também realizado um controlo apenas com água destilada. Depois de medido o pH de todas as amostras, estas foram colocadas em agitação constante durante 24 h. Após esse período, foi medido novamente o pH

de cada amostra obtendo-se os valores de pH final. Posteriormente, os dados foram tratados sendo obtido o valor do pH_{PZC} .

2.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.6.1. Microrganismos

A atividade antimicrobiana dos nanomateriais mono e bimetálicos foi avaliada utilizando diferentes microrganismos: a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus methicillin-resistant* (MRSA) e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Tabela IV). Estes microrganismos foram obtidos da coleção de culturas do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

Tabela IV - Características das estirpes de bactérias e leveduras utilizadas.

Microrganismo	Estirpe	Código da estirpe	Origem
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	CECT423	Derivado λ da estirpe <i>E. coli</i> K-12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Isolado clínico (lesão humana)
	<i>Staphylococcus aureus methicillin-resistant</i> (MRSA)	M746665	Isolado clínico (aspiração)
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	Euroscarf
	<i>Candida albicans</i>	IGC3436	Isolado clínico (lesão da pele humana com micose interdigital)

2.6.2. Meios de cultura e manutenção de culturas microbianas

Os microrganismos testados foram cultivados e mantidos em condições de assepsia em meios de cultura apropriados. As bactérias (*E. coli*, *S. aureus* e MRSA) foram cultivadas em placas contendo meio LBA, que consiste em meio LB (*Difco™ LB Broth, Miller*) suplementado com agar (Tabela V), e por sua vez incubadas durante 24 h a 37 °C, de modo a obter culturas frescas.

Tabela V – Composição do meio LBA.

Constituinte	Concentração [% (p/v)]	Fornecedor
Triptona	1,0	<i>Becton Dickinson and Company</i>
Extrato de levedura	0,5	<i>Panreac</i>
NaCl	1,0	<i>Panreac</i>
Agar	2,0	<i>Labchem</i>

Para obter culturas frescas das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, as respectivas estirpes foram cultivadas em placas contendo meio YPD (*Difco™ YPD Broth*) suplementado com agar (YPDA) (Tabela VI), e incubadas durante 48 h a 30 °C.

Tabela VI - Composição do meio YPDA.

Constituinte	Concentração [% (p/v)]	Fornecedor
Peptona	2,0	<i>Becton Dickinson and Company</i>
Extrato de levedura	1,0	<i>Panreac</i>
Glucose	2,0	<i>Fisher Chemical</i>
Agar	2,0	<i>Labchem</i>

Todos os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm.

2.6.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanomateriais mono e bimetálicos

Os nanomateriais mono e bimetálicos foram testados a fim de avaliar as suas propriedades antimicrobianas contra os microrganismos selecionados como indicadores de suscetibilidade (Tabela IV). Os ensaios para avaliação de tais propriedades antimicrobianas contemplaram (i) a análise da viabilidade microbiana na presença de diferentes concentrações dos nanomateriais, sendo expressa através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) e a (ii) utilização do método de difusão em disco. A primeira abordagem foi usada com o objetivo de determinar os valores da concentração mínima inibitória (MIC, ou seja, a concentração mais baixa do nanomaterial capaz de inibir o crescimento de cada microrganismo) e ainda para avaliar a eficácia antimicrobiana ao longo de um tempo determinado,

de modo a avaliar o efeito de cada nanomaterial em cada estirpe, sendo expresso através do número de células viáveis existentes após incubação com os nanomateriais. O método de difusão em disco foi realizado com o intuito de comparar os nanomateriais preparados neste trabalho com outros materiais estudados anteriormente (Ferreira, 2012; Guedes, 2015) através de um método simples, rápido e direto.

2.6.3.1. Análise da viabilidade microbiana

Para testar as propriedades antimicrobianas dos nanomateriais baseados em zeólito foram realizados ensaios de viabilidade celular. Para cada ensaio, foi preparado um pré-inóculo com culturas frescas de bactéria em tubos de centrifuga de 50 mL com meio de cultura LB, procedendo-se à sua incubação durante a noite a 37 °C e a 200 rpm. Foi medida a densidade ótica (DO) a 600 nm e foi feito um inóculo das mesmas estirpes, em meio de cultura fresco e para uma DO inicial de 0,1, sendo as culturas reincubadas até se atingir uma DO de aproximadamente 0,4, correspondente ao meio da fase exponencial (e garantindo duas gerações de crescimento). A amostra foi centrifugada a 4 °C e 5000 rpm durante 2 min. De seguida, foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi lavado duas vezes com água desionizada estéril. Foi realizada nova centrifugação nas condições referidas, repetiu-se a lavagem e uma última centrifugação. O sedimento resultante foi ressuscitado em meio LB, sendo a cultura posteriormente colocada em contacto com cada um dos nanomateriais (Tabela III) às concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL (já homogeneizados em meio de cultura por imersão num banho de ultrassons durante aproximadamente 2 min). Durante a incubação, foram retiradas alíquotas de 100 µL em tempos determinados (0, 20, 40 e 60 min) e efetuadas diluições de 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:1000. Alíquotas de 10 µL foram retiradas, em triplicado, diretamente de cada diluição da cultura para placas de meio LBA. Este procedimento foi sempre realizado em condições de assepsia. Após incubação a 37 °C durante 24 h a presença de crescimento foi registada contando-se o número de colónias obtidas em cada situação experimental. Foram realizados um mínimo de 3 ensaios com 3 réplicas para cada estirpe e condição estudada, sendo feita a média dos valores obtidos para a determinação de UFC/mL.

No caso das leveduras, foi realizado um procedimento semelhante ao descrito com a exceção do meio de cultura, sendo usado meio YPD em vez de LB, ou YPDA em vez de LBA, e a temperatura e tempo de incubação de 30 °C e 48 h, respetivamente.

2.6.3.2. Método de difusão em disco

O método de difusão em disco permite avaliar se os nanomateriais inibem o crescimento microbiano, em meio sólido, através da presença de halos de inibição. Este método foi realizado com o objetivo de comparar os nanomateriais usados neste trabalho com outros preparados e estudados anteriormente (Ferreira, 2012; Guedes, 2015) tendo em vista inferir sobre a influência de diferentes características exibidas pelos vários nanomateriais, como a quantidade de prata e a razão Si/Al, na sua atividade antimicrobiana.

Para a realização do método de difusão em disco foram preparados pré-inóculos com culturas frescas de bactérias e leveduras, de modo semelhante ao descrito na secção anterior. As culturas microbianas cultivadas durante a noite foram inoculadas em meio fresco, procedendo-se à incubação das novas culturas em condições apropriadas (meio LB a 37 °C ou meio YPD a 30 °C caso se tratasse de bactérias ou leveduras, respetivamente). Uma vez atingida uma DO entre 0,5 e 0,6 (fase exponencial de crescimento celular), transferiram-se 200 µL da cultura para 10 mL de top agar (agar 0,8% (p/v)). Esta mistura foi espalhada sobre uma placa com meio apropriado (LBA ou YPDA). De seguida, foram colocados discos de papel (*BBL™ Blank Paper Discs 6 mm diameter, Becton Dickinson and Company*) sobre a camada microbiana embebida em top-agar, sendo colocados em cada disco 50 µL da solução com o nanomaterial a testar, na concentração de 2,0 mg/mL. As placas com bactérias e leveduras foram colocadas na estufa a 37 ou 30 °C, durante aproximadamente 24 ou 48 h, respetivamente, após o que se procedeu à análise da presença de halos de inibição. Cada halo de inibição foi medido com uma régua em três direções diferentes sendo os resultados obtidos expressos como a média das três medições, em milímetros (mm).

Discos comerciais contendo os antibióticos vancomicina (*Sensi-Disk™ Vancomycin*), amoxicilina/ácido clavulânico (*Sensi-Disk™ Amoxicillin/Clavulanic Acid*), eritromicina (*Sensi-Disk™ Erythromycin*) e ciprofloxacina (*Sensi-Disk™ Ciprofloxacin*) (*Becton Dickinson and Company*) foram usados como controlos, em placas de LBA inoculadas com as mesmas estirpes bacterianas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos nanomateriais

Os resultados apresentados nesta secção são relativos aos nanomateriais preparados neste trabalho a partir do zeólito NaY, que apresenta uma razão de Si/Al de 2,40.

3.1.1. Análise por FTIR

O zeólito de partida e os nanomateriais antimicrobianos, preparados conforme descrito nos pontos 2.3 e 2.4 do capítulo 2, foram analisados por FTIR. Os espectros de FTIR obtidos são muito semelhantes entre si. Os nanomateriais apresentam as bandas características dos zeólitos de partida. A Figura 12 apresenta os espectros de FTIR dos nanomateriais monometálicos obtidos com o zeólito Y e a Figura 13 mostra os espectros do nanomaterial bimetálico obtido com o nanomaterial $Zn_{0,05}Y$, ambos na região entre 4000 a 500 cm^{-1} . O espectro de FTIR do zeólito NaY é caracterizado por uma banda larga a 3500 cm^{-1} que é atribuída às vibrações dos grupos hidroxilo das cavidades da estrutura do zeólito (Li e Wu, 2003). A banda de absorção na região 1650-1600 cm^{-1} indica a presença de água absorvida na estrutura do zeólito (Mozgawa, 2000). As bandas representativas das vibrações de alongamento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T (T=Si ou Al) da estrutura do zeólito estão presentes na região entre 1200 e 650 cm^{-1} . Por fim, na região entre 650 e 500 cm^{-1} estão localizadas as vibrações de anel duplo (Lentys e Lercher, 2001).

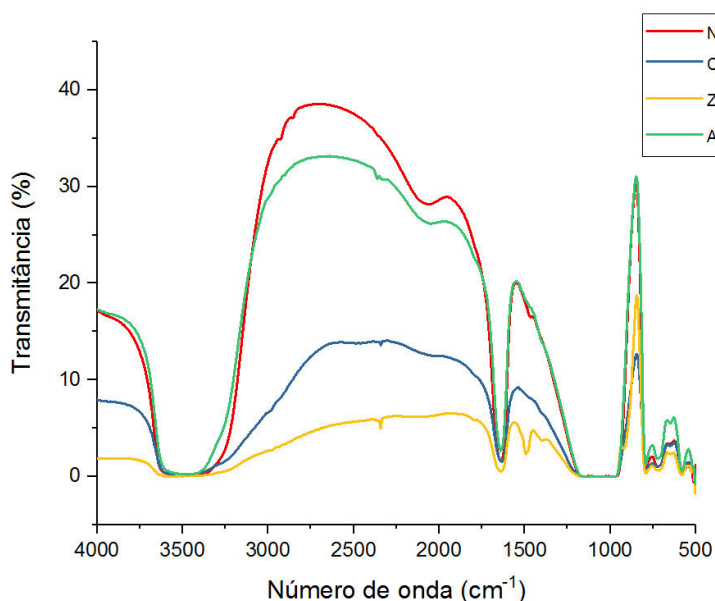


Figura 12 – Espectros de FTIR dos nanomateriais monometálicos, $Cu_{0,05}Y$, $Zn_{0,05}Y$ e $Ag_{0,01}Y$, em comparação com o espectro do zeólito NaY.

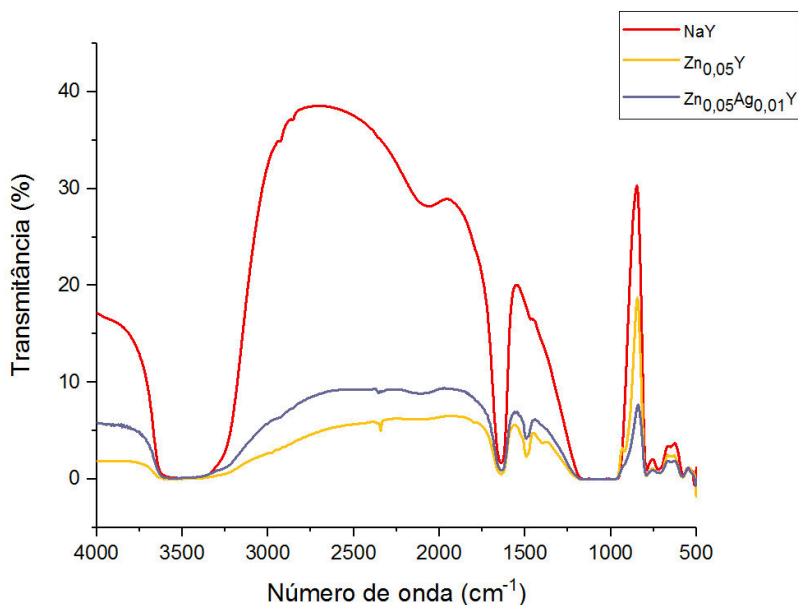


Figura 13 - Espectros de FTIR do nanomaterial bimetalico $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$, em comparação com o espectro de NaY e $Zn_{0,05}Y$.

De acordo com a Figura 12, todos os espectros dos nanomateriais preparados apresentam bandas de absorção fortes características da estrutura zeolítica, sendo muito semelhantes ao zeólito NaY. Tal como esperado, o tratamento de permuta iônica não provocou alterações na estrutura do zeólito, ou seja, após a introdução dos metais, o zeólito manteve a sua integridade estrutural inicial. Na Figura 13 verificou-se também que o espectro obtido para $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ foi semelhante ao seu zeólito de partida ($Zn_{0,05}Y$) indicando que não ocorreram alterações na estrutura do zeólito após o processo de troca iônica. Estes resultados foram também observados por Ferreira et al. (2012) após a introdução de diferentes concentrações dos íons prata e zinco na estrutura do zeólito NaY. Nas amostras com zinco, a banda por volta de 1500 cm^{-1} que é observada deve-se provavelmente à presença do zinco na estrutura do zeólito, uma vez que a concentração de metal utilizada foi de 0,05 M.

3.1.2. Análise por XRD

Foram realizadas análises por difração de raios-X a fim de averiguar se a permuta iônica provocou alterações na estrutura cristalina dos zeólitos. Os padrões de difração XRD das amostras foram registrados em 2θ entre 5° e 60° com radiação Cu-K α . Os nanomateriais exibiram padrões típicos e semelhantes

aos das estruturas dos zeólitos de partida. Na Figura 14 estão apresentados os padrões de difração de raios-X obtidos para o NaY, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$, a título de exemplo.

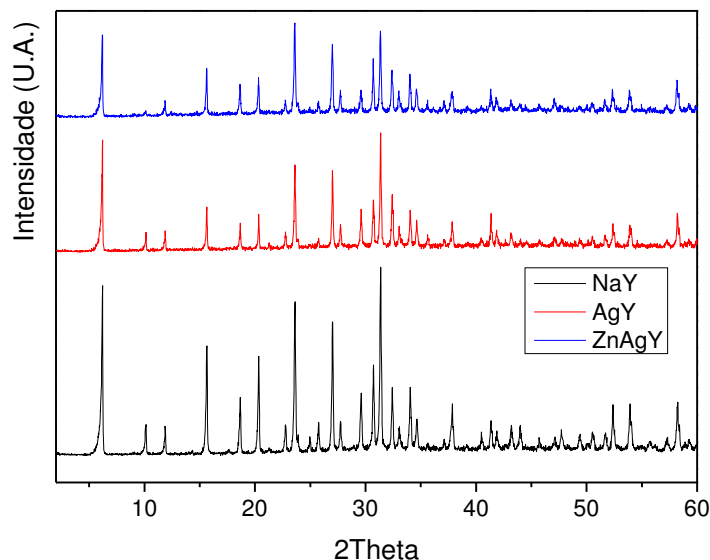


Figura 14 - Padrões de difração de raios-X de NaY, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$.

As posições dos picos e as intensidades dos padrões de XRD obtidos das amostras e os padrões de XRD característicos da estrutura FAU estão em concordância. Os difractogramas dos nanomateriais apresentam um padrão típico e semelhante ao difractograma do zeólito de partida (NaY), tal como foi descrito por Fonseca e Neves (2013). Isto mostra que a estrutura cristalina do zeólito não sofreu alterações estruturais após o tratamento de troca iônica. Não foram detetados os picos característicos da prata metálica a valores de 2θ iguais a $38,12^\circ$ e $44,18^\circ$ (Salavati-Niasari, 2009) no padrão de XRD de $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$. Estas observações foram também reconhecidas por Ferreira et al. (2012) e por Guedes (2015).

Com a análise por XRD foi também possível determinar a cristalinidade relativa e a razão Si/Al das amostras analisadas. Na Tabela VII estão apresentados os valores determinados para cada amostra. A cristalinidade relativa foi estimada pela comparação da intensidade dos picos de difração das amostras modificadas com a intensidade do pico do zeólito NaY que tem 100% de cristalinidade de acordo método ASTM D 3906. Os nanomateriais monometálicos e bimetálico apresentam 85 % e 80 % de cristalinidade, respetivamente, não sendo observada qualquer variação nos picos característicos do zeólito NaY após o

tratamento de permuta iônica. Estes resultados indicam, mais uma vez, que processo de troca iônica não alterou a estrutura do zeólito, tal como foi sugerido por Rebelo (2009) e Ferreira (2012).

Tabela VII - Análise por XRD dos materiais: informação sobre a cristalinidade e a razão Si/Al.

Material	Cristalinidade (%)	Si/Al
NaY	100	2,40
Ag _{0,01} Y	85	2,39
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	80	2,25

Pela análise da Tabela VII pode inferir-se que a razão Si/Al dos zeólitos permutados com íons metálicos diminui quando ocorre a segunda troca iônica. No entanto, esta diminuição não é muito significativa, indicando que não ocorreu desaluminação da estrutura com o tratamento. Também Rebelo (2009) e Ferreira (2012) observaram que os valores da razão Si/Al das amostras que prepararam eram próximos do valor da razão Si/Al do zeólito de partida, verificando que não sofreram desaluminação.

3.1.3. Análise por TEM

A análise por TEM foi realizada com o propósito de obter informações acerca da distribuição das partículas metálicas nos nanomateriais preparados (Qiu et al., 2014). Em gamas de reduzida ampliação, esta técnica fornece informações também sobre a morfologia dos nanomateriais (Su, 2017). Na Figura 15 estão representadas as imagens obtidas por TEM dos nanomateriais monometálico Ag_{0,01}Y e bimetálico Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y.

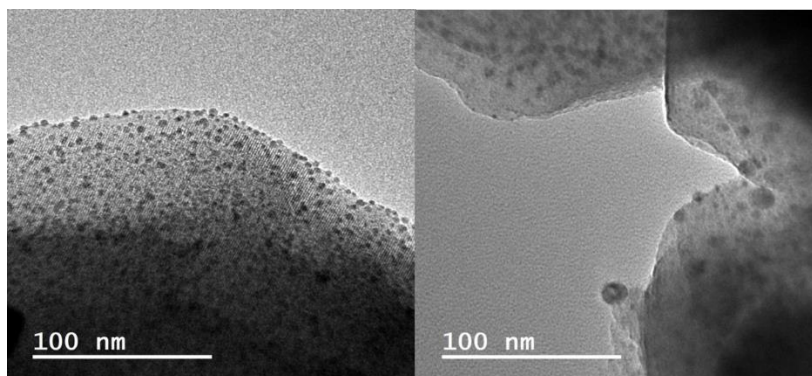


Figura 15 – Micrografias de TEM de Ag_{0,01}Y (à esquerda) e de Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y (à direita).

Pela análise da Figura 15, é possível verificar uma dispersão elevada de pequenas partículas de prata ao longo da partícula do zeólito NaY no $Ag_{0,01}Y$. No nanomaterial bimetálico são evidenciadas partículas de tamanhos diferentes, os iões prata (partículas pequenas) e zinco (partículas maiores) que estão também dispersos nas partículas do NaY. Observa-se também que a periferia das nanopartículas de zeólito é mais rica em ambos os metais do que no interior e ambos os metais são acessíveis à superfície do zeólito. Outros autores (Graaf et al, 2001; Valtchev e Bozhilov, 2004; Donk, 2007) reportaram resultados idênticos, tendo concluído que as partículas de iões inseridas na estrutura do zeólito se encontravam dispersas na estrutura do zeólito testado.

3.1.4. Análise por ICP-AES

A análise química das estruturas zeolíticas foi determinada por ICP-AES (Tabela VIII) a fim de determinar a quantidade de prata e zinco introduzidos no zeólito através do método de troca iónica.

Tabela VIII - Análise química das amostras: razão Si/Al, quantidades de sódio (Na), prata (Ag) e zinco (Zn) determinadas por ICP-AES.

Material	NaY	$Ag_{0,01}Y$	$Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$
Razão Si/Al	2,40	-	-
Na (%)	7,10	4,90	1,50
Ag (%)	-	7,90	6,30
Zn (%)	-	-	5,20

A quantidade de sódio na estrutura do zeólito desempenha um papel importante na capacidade de troca iónica. Tal como esperado, o zeólito NaY apresenta uma grande capacidade para a troca iónica devido ao elevado teor em sódio, indicando ser uma melhor estrutura zeolítica para materiais antimicrobianos (Ferreira et al., 2012; Fonseca e Neves, 2013). A análise química indica também a presença dos metais no zeólito NaY e uma diminuição do ião sódio após a permuta iónica, tal como foi demonstrado por Ferreira (2012) e Fonseca e Neves (2013). Verifica-se que o nanomaterial bimetálico ($Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$) apresenta menor quantidade de prata em comparação com o monometálico ($Ag_{0,01}Y$). Isto ocorreu devido à maior seletividade que o zeólito do tipo FAU tem para o ião prata em comparação com o zinco (Čejka e Bekkum, 2005). Assim, por cada ião prata permutado é despendido um ião sódio da estrutura, enquanto por cada ião zinco são gastos dois iões sódio. Como há uma maior seletividade dos iões prata, a percentagem de prata no nanomaterial bimetálico é superior à percentagem de zinco.

3.1.5. Determinação do valor de pH_{PZC}

Os valores de pH_{PZC} , que correspondem ao valor de pH nos pontos de carga zero da superfície, foram determinados para o zeólito NaY e os nanomateriais $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ (Tabela IX).

Tabela IX - Valores de pH_{PZC} obtidos para NaY, $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$.

Material	pH_{PZC}
NaY	6,47
$Ag_{0,01}Y$	5,37
$Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$	5,72

Com a análise da Tabela IX verifica-se que o valor de pH_{PZC} do zeólito de partida (6,47) é um valor muito aproximado de pH 7. Este valor deve-se ao facto do zeólito NaY apresentar um carácter neutro devido à presença de iões sódio como contra ião, em detrimento de protões na rede zeolítica. No caso dos nanomateriais $Ag_{0,01}Y$ e $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$, após a introdução de um ou dois iões, foi verificada uma diminuição do valor de pH_{PZC} . Isto mostra que com a entrada dos iões na estrutura cristalina do zeólito, foram geradas cargas positivas o que confere um carácter ácido aos materiais preparados. Estes resultados são semelhantes a resultados publicados anteriormente (Li e Wang, 2009; Fan et al., 2011).

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanomateriais mono e bimetálicos

3.2.1. Análise da viabilidade microbiana

Após a preparação dos nanomateriais mono e bimetálicos baseados no zeólito Y (secções 2.3 e 2.4), foi realizada a avaliação da sua atividade antimicrobiana contra as duas estirpes de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) e as duas de leveduras (*S. cerevisiae* e *C. albicans*) usadas como estirpes indicadores de sensibilidade. Numa primeira fase foram realizados ensaios em que células em fase exponencial de crescimento, foram incubadas na presença dos nanomateriais numa gama de concentrações entre 0,2 e 2,0 mg/mL. Esta fase teve como objetivo determinar o MIC de cada par nanomaterial-microrganismo, de modo a otimizar o ensaio e estabelecer as concentrações de nanomaterial e os tempos de incubação a usar para cada estirpe, definindo assim as condições experimentais a usar posteriormente. Para o

efeito, foram retiradas amostras da cultura microbiana assim que foi colocada na presença de cada nanomaterial (tempo T0) e após 24 h (T24) ou 48 h (T48) no caso das bactérias ou das leveduras, respetivamente. A Figura 16 mostra, a título de exemplo, o ensaio realizado nesta primeira fase para uma das bactérias, a *E. coli*.

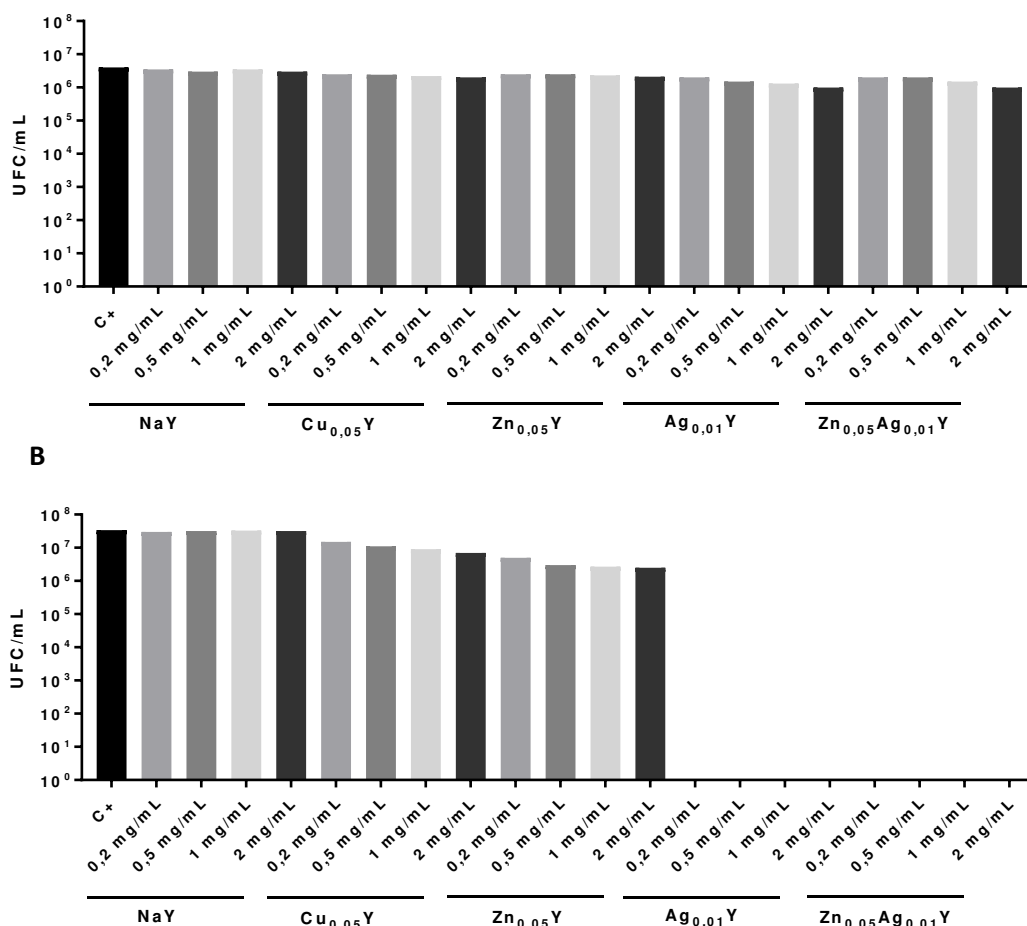


Figura 16 - Viabilidade (UFC/mL) da bactéria *E. coli* após 0 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de NaY, Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial (n=1).

Tal como se pode observar na figura anterior, o efeito causado pelo zeólito de partida (NaY) foi semelhante ao controlo, indicando que este zeólito não produz qualquer efeito contra a estirpe testada. Por outro lado, os restantes nanomateriais provocam uma diminuição de UFC logo à concentração de 0,2 mg/mL e após 24 h de incubação é notório um efeito ainda mais acentuado indicando que o efeito antimicrobiano destes nanomateriais se deve à presença dos metais na estrutura do zeólito. Para o zeólito permutado com prata não foram detetadas células viáveis de *E. coli* neste tempo permitindo concluir que o valor de MIC quer para Ag_{0,01}Y quer para Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y é de 0,2 mg/mL. Por esta razão,

numa segunda fase, o ensaio passou a ser realizado unicamente para a concentração mais baixa onde ocorreu inibição do crescimento (0,2 mg/mL) testando-se todos os nanomateriais preparados no presente trabalho: $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ a essa concentração. Como foi observada inibição do crescimento bacteriano desde o início do tratamento e a ausência total de células em alguns nanomateriais (permutados com prata) após 24 h, foi estabelecido um tratamento com duração de 60 minutos e com recolha de amostras em intervalos de 20 minutos acrescentando-se ainda os tempos de incubação T10 e T30 para verificar se seria nessa altura que se verificava ou não um efeito bactericida. Um ensaio equivalente ao ilustrado na Figura 16 foi igualmente realizado para ambas as leveduras, estando o exemplo da levedura *S. cerevisiae* apresentado na figura que se segue.

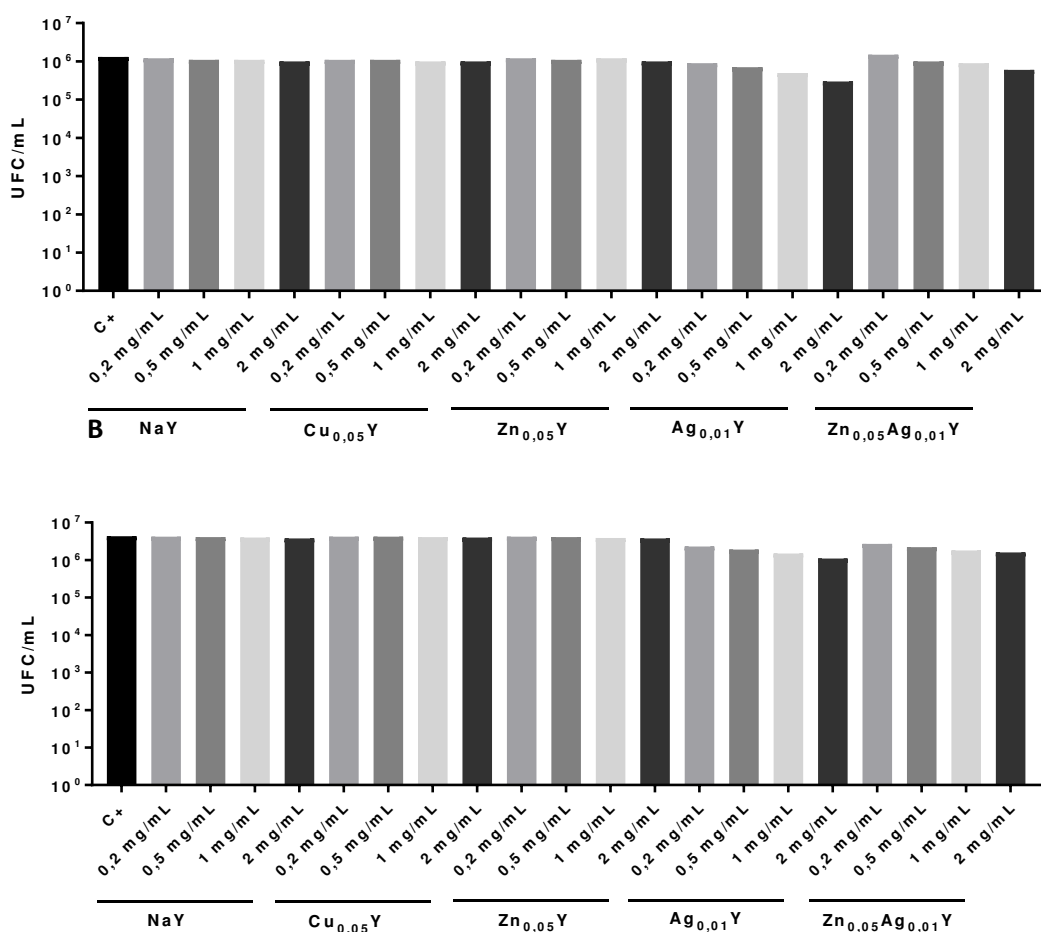


Figura 17 - Viabilidade (UFC/mL) da levedura *S. cerevisiae* após 0 (A) e 48 h (B) de incubação a 30 °C, 200 rpm com 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de NaY, $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial (n=1).

Com a análise da Figura 17 pode concluir-se que o número de UFC para NaY, $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ foi semelhante ao do controlo, indicando que estes nanomateriais não exerceram qualquer efeito antimicrobiano contra esta estirpe. Por outro lado, foi observada a diminuição de células viáveis quando

tratadas com os nanomateriais à base de prata, em particular no caso do monometálico $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$, indicando que estes conseguem exercer algum efeito em ambas as estirpes mesmo na concentração mais baixa. Assim, para a segunda fase destes ensaios com os nanomateriais $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ foi estipulado um tratamento com uma duração de 10 h de incubação com recolha de amostras a intervalos de 2 h.

A Figura 18 ilustra os resultados obtidos num dos ensaios realizados nesta primeira fase, sendo neste caso testado $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ em todos os microrganismos indicadores: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*.

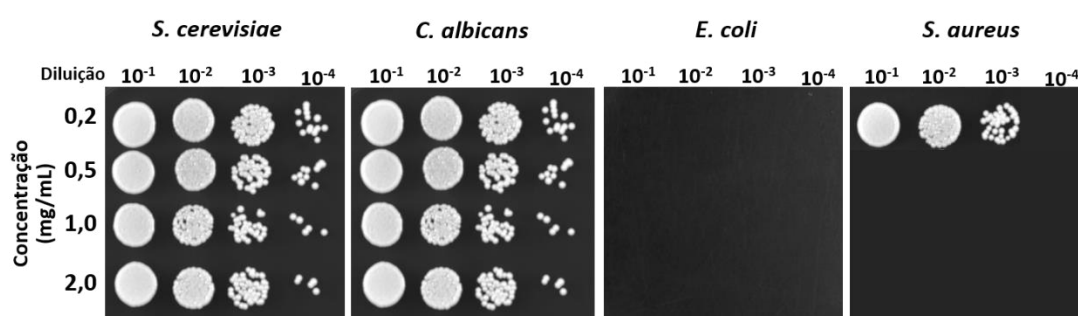


Figura 18 - Avaliação da atividade antimicrobiana de $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ contra as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* e contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. As células foram incubadas a 30 °C ou 37 °C, 200 rpm com $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ nas concentrações 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. Após 24 h foram retiradas aliquotas de cada cultura e diluídas até 10^{-4} sendo colocadas aliquotas de 10 μL de cada uma das diluições em placas de YPDA e LBA e incubadas a 30 °C durante 48 h ou a 37 °C durante 24 h, conforme se tratasse respetivamente de leveduras ou de bactérias.

É evidente que com o aumento da concentração do nanomaterial, o número de colónias diminui ou é ausente para *E. coli* em todas as concentrações testadas e para *S. aureus* a partir de 0,5 mg/mL. Na sequência dos ensaios antimicrobianos descritos (Figuras 16, 17 e 18) foram determinados os valores de MIC para cada par nanomaterial/microrganismo (Tabela X). Não foi possível determinar a MIC de todos os nanomateriais contra as leveduras assim como de $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ para as bactérias, pois para inibir o crescimento destas estirpes seria necessário utilizar concentrações superiores à máxima testada (2,0 mg/mL). As bactérias *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se sensíveis aos nanomateriais $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ cujos valores de MIC foram 0,2 mg/mL e 0,5 mg/mL, respetivamente. Todos os nanomateriais exibem valores de MIC superiores a 2,0 mg/mL face às duas leveduras testadas (Tabela X). $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ apresentaram também valores de MIC superiores a 2,0 mg/mL nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela X - Valores de MIC (mg/mL) dos nanomateriais contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*.

Zeólito	Microrganismo			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Cu_{0,05}Y	>2	>2	>2	>2
Zn_{0,05}Y	>2	>2	>2	>2
Ag_{0,01}Y	0,2	0,5	>2	>2
Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y	0,2	0,5	>2	>2

Alguns autores, como Lalueza et al., (2011) observaram que os materiais permutados com prata são mais biodisponíveis, apresentando uma melhor atividade antimicrobiana. O mesmo foi reportado por Ferreira et al. (2012), que demonstrou que o zeólito Y permutado com prata exibiu um valor de MIC de 0,2 mg/mL contra as espécies bacterianas *E. coli* e *B. subtilis*. Para além disso, está também descrito que a prata desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana (Sondi e Salopek-Sondi, 2004). Esta eficácia antibacteriana apresentada pelos nanomateriais pode estar também relacionada com a razão Si/Al, uma vez que o zeólito NaY possui baixa razão Si/Al permitindo assim uma elevada capacidade de troca iónica. Ferreira et al. (2012) mostraram também que as propriedades antibacterianas da prata em zeólitos FAU (NaY e NaX) são similarmente dependentes da razão Si/Al. Já o zeólito Y permutado com prata (Si/Al = 2,83 e Ag⁺ = 9,7 wt%) exibiu um valor de MIC inferior ao do zeólito X (Si/Al = 1,64 e Ag⁰ = 9,8 wt%) contra bactérias, que poderá ser devido à presença de prata metálica em AgX, que só atua como agente antimicrobiano quando convertida a prata iónica, sendo que neste caso a estabilização do íon prata no Y favorece MIC inferiores. Ruparelia et al. (2008) e Demirci et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do cobre ou zinco nestes zeólitos contra *E. coli* e *S. aureus*, observando valores de MIC semelhantes aos apresentados, concluindo que o nanomaterial à base de prata é o mais ativo entre os testados e que os à base de cobre e zinco apresentavam atividade antimicrobiana moderada.

Constatou-se, no entanto, que a análise dos valores de MIC (Tabela X) não permite uma diferenciação específica dos nanomateriais, uma vez que apesar dos valores serem semelhantes, cada estirpe pode apresentar diferentes respostas aos nanomateriais, como observado nos primeiros ensaios realizados (Figuras 16 e 17). Por esta razão, torna-se necessário estimar a atividade antimicrobiana dos nanomateriais contra cada estirpe através da avaliação da sua viabilidade, uma vez estabelecida a concentração de nanomaterial a usar. Nesta segunda fase, foram então realizados ensaios

antimicrobianos na concentração mais baixa para a qual se observou inibição do crescimento microbiano (0,2 mg/mL). Os tempos de incubação foram diferentes para leveduras (entre 0 e 10 h, com intervalos de 2 h) e para bactérias (entre 0 e 60 minutos, com intervalos de 20 minutos) (Figuras 19 a 21). A avaliação do efeito antimicrobiano foi feita pela comparação de UFC/mL obtida na presença de cada nanomaterial e na sua ausência (controlo positivo - células sem tratamento). Na Figura 19 são apresentados os resultados para as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* após 10 h de incubação com os nanomateriais baseados no zeólito Y, tendo sido avaliado o valor de UFC/mL a cada intervalo de 2 h.

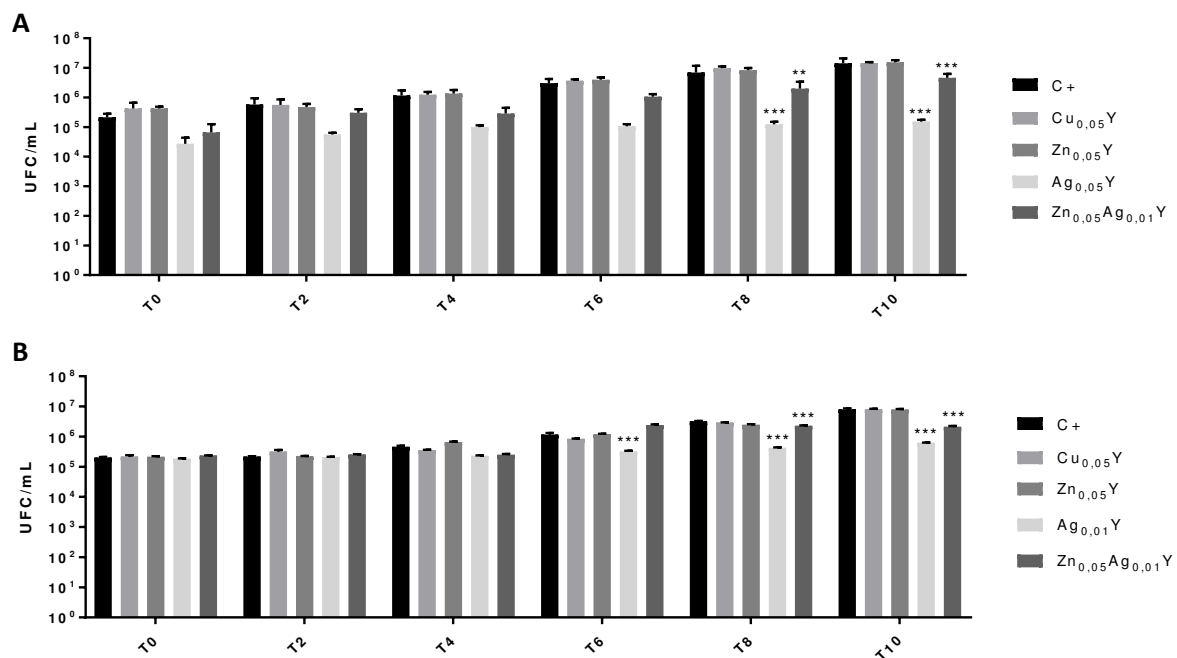


Figura 19 - Viabilidade (UFC/mL) das leveduras *S. cerevisiae* (A) e *C. albicans* (B) após 0 (T₀), 2 (T₂), 4 (T₄), 6 (T₆), 8 (T₈) e 10 (T₁₀) h de incubação a 30 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Cu_{0,05}Y e Zn_{0,05}Y não exibem efeito antimicrobiano contra as duas leveduras, que apresentam valores de UFC/mL semelhantes aos do controlo positivo. Porém, apesar de não ter sido possível determinar um valor de MIC para qualquer dos quatro nanomateriais testados, os que contêm prata mostram um efeito antimicrobiano significativo após algumas horas de incubação (T₈ e T₁₀). No que diz respeito à levedura *S. cerevisiae*, esse efeito é visualmente notório desde o início da incubação (87 % de inibição para Ag_{0,01}Y e 69 % para Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y) (Figura 19A), embora a diferença de UFC só se torne significativa a partir de 8 h de incubação (Ag_{0,01}Y com 98 % de inibição e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y com 72 %). Já em *C. albicans*, o efeito antimicrobiano de Ag_{0,01}Y é significativo após 6 h (correspondente a 73 % de inibição,

que aumenta para 92 % após 10 h), enquanto para o nanomaterial $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$ se observa um efeito antimicrobiano significativo em termos da redução do número de UFC a partir de 8 h de incubação (equivalente a 29 % de inibição nesse tempo e 74 % após 10 h) (Figura 19B). De acordo com estes resultados, pode inferir-se que o $Ag_{0,01}Y$ foi mais eficaz em ambas as leveduras uma vez que se observou uma maior redução do número de UFC. Um estudo da atividade antifúngica da prata realizado por Chiericatti et al., (2014) na estrutura de modernite mostrou que este zeólito permutado com prata, em pequenas quantidades, foi eficaz contra diferentes leveduras como o caso da *S. cerevisiae* ocorrendo uma redução significativa ($\log \text{UFC/mL} = 4,5$) de UFC em 4 h com a adição de apenas 10 mg, indicando um forte efeito num curto período de tempo. Foi também observado em outro estudo que os nanomateriais de prata possuem uma atividade antimicrobiana contra *S. cerevisiae* e *C. albicans* levando à diminuição de 90 % de células viáveis com MIC de 32 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente (Nasrollahi et al., 2011), em concordância com os resultados apresentados neste trabalho. Porém, de acordo com o estudo realizado por Ferreira (2012), os nanomateriais mais eficazes contra estas duas estirpes foram os nanomateriais bimetálicos $ZnAgY$ e $AgZnY$, ambos com MIC de 2,0 mg/mL enquanto que nos restantes, incluindo os monometálicos, o MIC foi superior a 2,0 mg/mL.

Os nanomateriais $Cu_{0,05}Y$ e $Zn_{0,05}Y$ foram também testados nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*, ao longo de 60 minutos, recolhendo-se amostras para contagem de UFC/mL a cada 20 minutos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 20. Na Figura 20A observa-se um efeito antibacteriano significativo dos nanomateriais $Cu_{0,05}Y$ e $Zn_{0,05}Y$ em *E. coli*, uma vez que é observada uma diminuição significativa do número de UFC ao longo do tratamento em comparação com o controlo. Para $Cu_{0,05}Y$ foi registada uma percentagem de inibição máxima de 82 % e para $Zn_{0,05}Y$ foi de 96 % uma vez decorridos 40 minutos. Zhou et al. (2004), Hu e Xia (2006) e Mehtar et al. (2008) observaram efeitos antimicrobianos de iões cobre contra diversas bactérias, incluindo *E. coli*, registando uma diminuição de células viáveis após a incubação com cobre. Foi igualmente demonstrado o efeito antimicrobiano de nanopartículas permutadas com cobre contra *E. coli*, expressa através de uma redução de bactérias viáveis (Ruparelia et al., 2008; Akhavan e Ghaderi, 2010; Grass et al., 2011). Estes estudos corroboram os resultados obtidos no estudo do efeito destes nanomateriais em *E. coli* embora no presente estudo o $Zn_{0,05}Y$ se tenha revelado mais ativo. No entanto, no estudo realizado por Ferreira (2012) foi verificado que os nanomateriais com cobre e zinco (CuY e ZnY) possuem efeitos semelhantes contra ambas as bactérias exibindo valores de MIC superiores a 2,0 mg/mL.

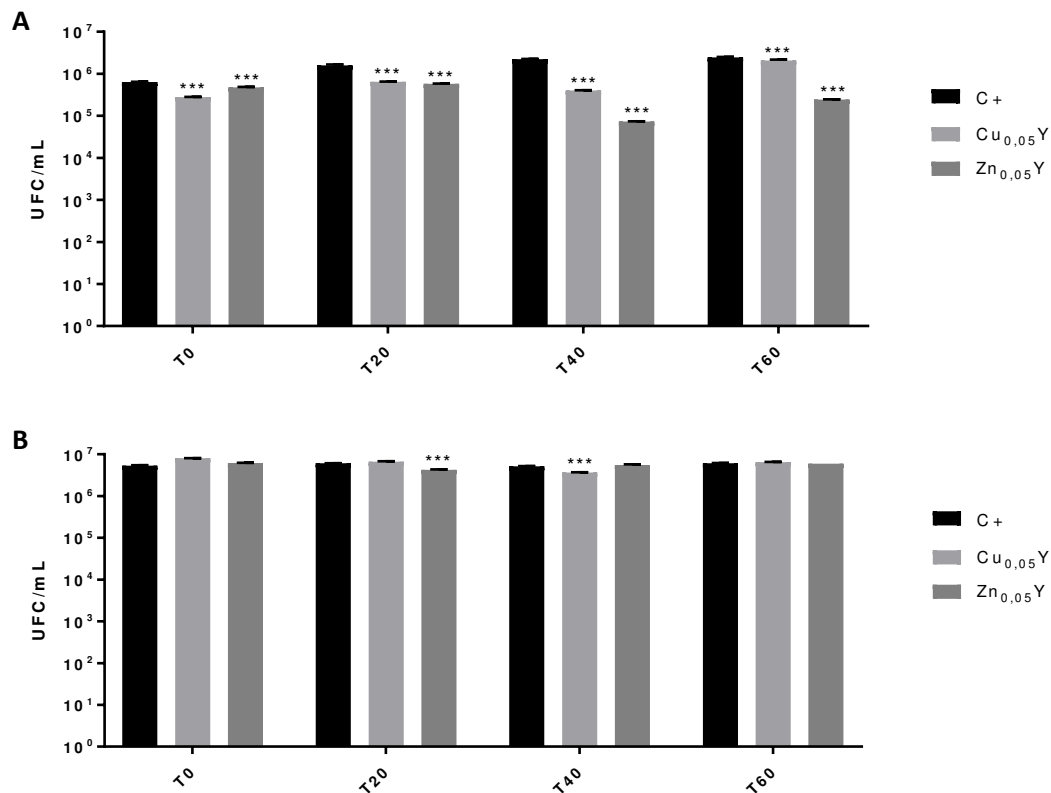


Figura 20 - Viabilidade (UFC/mL) das bactérias *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) após 0 (T0), 20 (T20), 40 (T40) e 60 (T60) min de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Cu_{0,05}Y e Zn_{0,05}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Em relação a *S. aureus* (Figura 20B), apesar de se observar uma diminuição significativa no número de colónias desta bactéria quando tratada com Zn_{0,05}Y após 20 minutos (30 % de inibição) e com Cu_{0,05}Y após 40 minutos (29 % de inibição), respetivamente, no geral estes nanomateriais não exercem efeito antibacteriano nesta estirpe, nas concentrações testadas, pois acaba por recuperar desse efeito antimicrobiano. Assim, a bactéria *E. coli* revelou-se mais sensível aos nanomateriais monometálicos de cobre e zinco do que *S. aureus*. Segundo Demirci et al. (2013), nanopartículas de zinco e cobre baseadas nos zeólitos X e A, apesar de menos eficazes que as de prata (com MICs entre 32 e 64 µg/mL), apresentam ainda assim alguma eficácia antimicrobiana contra *S. aureus* exibindo valores de MIC entre 512 e 2048 µg/mL, respetivamente; no entanto, tal efeito não foi observado neste trabalho.

A mesma avaliação foi realizada para os restantes nanomateriais (Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y) incubando-se *E. coli* e *S. aureus* na sua presença, e recolhendo-se aliquotas para análise da viabilidade microbiana nos tempos 0, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos (Figura 21). Saliente-se que no caso destes

nanomateriais com prata, a concentração de zeólito testada contra *E. coli* corresponde ao valor de MIC (Tabela X), diferentemente do que aconteceu relativamente aos restantes pares de nanomateriais.

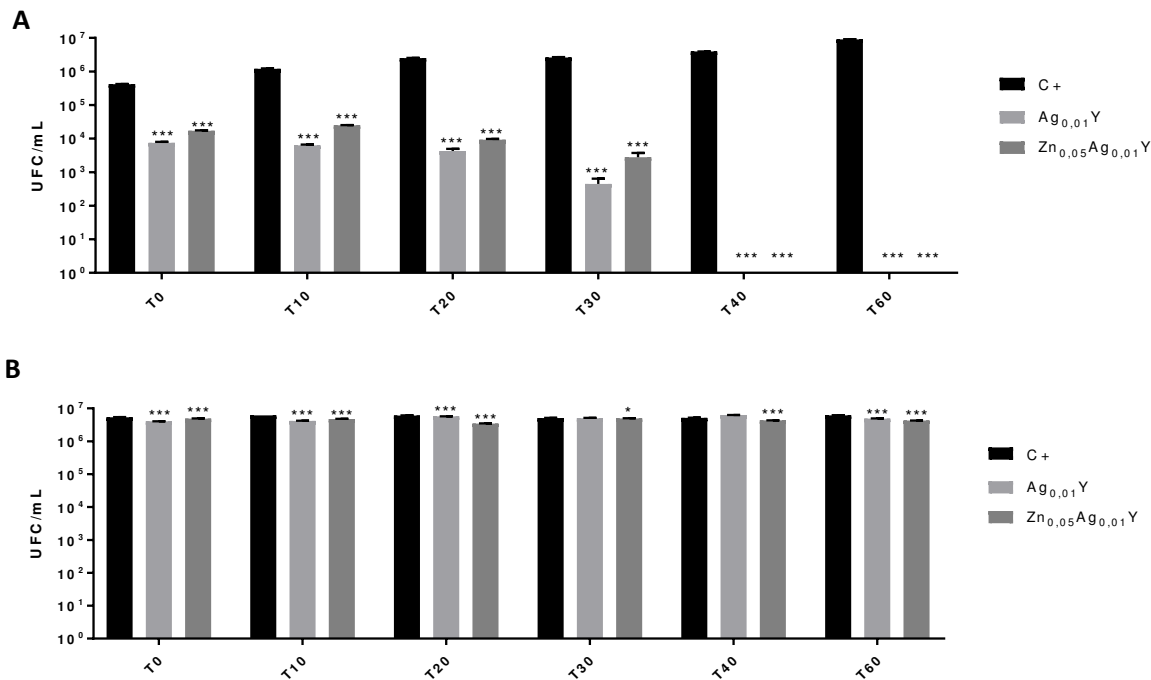


Figura 21 – Viabilidade UFC/mL das bactérias *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) após 0 (T0), 10 (T10), 20 (T20), 30 (T30) 40 (T40) e 60 (T60) min de incubação a 37 °C, 200 rpm com 0,2 mg/mL de Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. Utilizou-se como controlo uma experiência idêntica na ausência de cada nanomaterial. A significância da diferença entre as médias dos tratamentos em comparação com o respetivo controlo é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p estando apenas apresentada quando UFC/mL do tratamento é inferior ao controlo.

Os nanomateriais permutados com prata - Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y - afetam o crescimento bacteriano. Na Figura 21A constata-se uma diminuição significativa no crescimento de *E. coli* após 30 minutos de incubação e ausência de células viáveis após 40 e 60 minutos, mostrando que estes dois nanomateriais exercem um efeito bactericida (100 % de inibição) contra esta bactéria tais períodos de incubação. Ferreira et al. (2012) mostraram que o zeólito Y permutado com prata exibe atividade contra *E. coli*, não sendo detetadas células viáveis após incubação com AgY a uma concentração de 0,2 mg/mL. Na Figura 21B pode observar-se que o nanomaterial bimetálico Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y exerce um efeito antibacteriano em *S. aureus* desde o início do tratamento, observando-se uma diminuição significativa do número de colónias (30% de inibição após 60 minutos) face ao controlo. Quanto a Ag_{0,01}Y não se pode concluir com clareza o seu efeito em *S. aureus* pois é possível observar dois efeitos opostos ao longo do tempo, seria provavelmente necessária uma concentração mais elevada para um efeito

antimicrobiano mais expressivo. Contudo, estudos publicados anteriormente mostram que nanomateriais permutados com prata (AgY, AgX e AgA) são eficazes contra ambas as bactérias, apresentando valores de MIC entre 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$, possivelmente devido a quantidades de prata superiores (Matsumura et al., 2003; Ruparelia et al., 2008; Demirci et al., 2013).

Perante estes resultados (Figuras 19 a 21) pode afirmar-se que as leveduras são menos sensíveis à ação dos nanomateriais permutados com prata do que as bactérias. Em ambas as leveduras o valor de MIC é superior a 2,0 mg/mL, enquanto nas bactérias é de 0,2 mg/mL para *E. coli* e 0,5 mg/mL para *S. aureus* (Tabela X). Nos estudos realizados por Ferreira et al. (2012), Demirci et al. (2013) e Guedes (2015) foi também evidenciado que as leveduras testadas eram menos sensíveis do que as bactérias à ação de vários nanomateriais. A maior suscetibilidade das bactérias pode estar relacionada com a estrutura da parede celular uma vez que os iões prata possuem a capacidade de penetrar facilmente na célula através da parede celular. Os iões prata são libertados e interagem com as cisteínas existentes na membrana plasmática substituindo o átomo de hidrogénio do grupo tiol por um átomo de prata (complexo S-Ag) que irá alterar a estrutura e inativar as enzimas da cadeia respiratória desencadeando a morte da bactéria (Malachová et al., 2011; Llorens et al., 2012; Pal et al., 2015).

Pode também concluir-se que o zeólito de partida adquire atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias apenas na presença de metais. Os melhores nanomateriais testados são os que possuem o ião prata na sua estrutura: $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ uma vez que ambos tiveram efeito antimicrobiano contra todos os microrganismos testados, um comportamento que se deve à presença de prata na estrutura do zeólito Y (Ferreira et al., 2012). Por outro lado, os nanomateriais $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ não se mostraram eficazes contra ambas as leveduras nem contra a bactéria *S. aureus*.

Comparando a eficácia antimicrobiana de cada nanomaterial em *E. coli* através da percentagem de inibição de células viáveis face ao respetivo controlo (Figura 22), constata-se que enquanto $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ levam a uma percentagem de inibição de 36 % e 90 %, respetivamente, os nanomateriais com prata - $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ - apresentaram 100 % de inibição contra esta estirpe. Estes resultados afiguram-se bastante promissores principalmente face a infeções bacterianas com origem em *E. coli*, por se ter revelado a estirpe mais sensível aos nanomateriais de prata (MIC mais baixo e um efeito bactericida), perspetivando-se a sua exploração na prevenção de infeções com esta origem microbiana, o que é particularmente importante no contexto atual, em que se assiste a uma diminuição da eficácia terapêutica dos antibióticos e a um aumento da resistência microbiana a esses agentes terapêuticos.

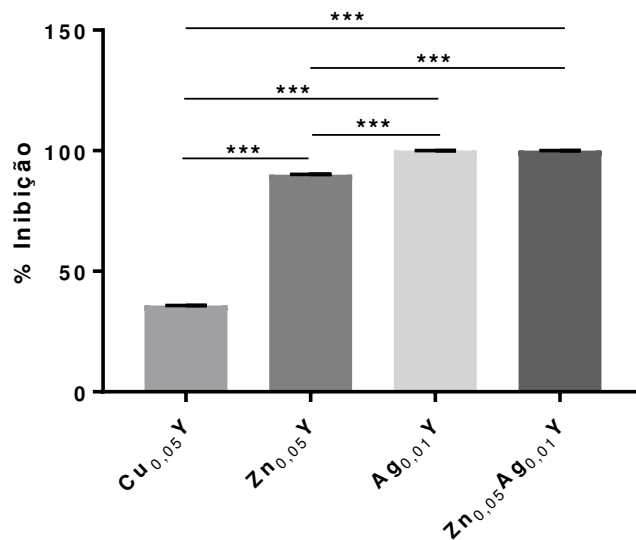


Figura 22 – Percentagem de inibição de células viáveis de *E. coli* provocada por 0,2 mg/mL após 60 minutos de incubação com os nanomateriais Cu_{0,05}Y, Zn_{0,05}Y, Ag_{0,01}Y e Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y. A significância da diferença entre a eficácia antimicrobiana de cada nanomaterial é representada por * 0,05 > p ≥ 0,01, ** 0,01 > p ≥ 0,001, *** 0,001 > p.

A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias mudam a sua resposta a esses agentes e é uma das maiores ameaças à saúde global. Esta resistência ocorre naturalmente, mas o uso indevido e excessivo de antibióticos acelera esse processo. A incidência das infecções bacterianas está a aumentar, sendo cada vez mais difíceis de tratar face a crescente ineficácia dos antibióticos disponíveis, conduzindo a estadias hospitalares mais prolongadas, custos médicos mais elevados e mortalidade aumentada. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou recentemente uma lista de agentes patogénicos de prioridade global - bactérias resistentes a antibióticos - para guiar a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (OMS, 2017). Nessa lista, dividida em três categorias de acordo com a urgência da necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos: crítica, alta e média prioridade, estão presentes doze grupo de bactérias que representam atualmente a maior ameaça para a saúde humana, destacando-se em particular a ameaça de bactérias Gram-negativas que são resistentes a múltiplos antibióticos. O grupo mais crítico inclui bactérias multirresistentes que ameaçam particularmente hospitais, casas de repouso e pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres de sangue. Incluem *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*. Estas bactérias tornaram-se resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo as classes das carbapenemas e cefalosporinas de terceira geração (antibióticos disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes), e podem causar infecções graves e muitas vezes mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia. O segundo e terceiro grupos (prioridade alta e média) contêm outras

bactérias cada vez mais resistentes aos medicamentos, que causam doenças mais comuns como a gonorreia e intoxicação alimentar causada por salmonelas.

A infecção urinária é a doença microbiana mais comum sendo maioritariamente causada por bactérias, no entanto, podem também ocorrer infecções fúngicas, virais e parasitárias (Sheerin, 2011). Quando o corpo humano é colonizado por microrganismos, são desencadeados mecanismos de defesa para tentar eliminar os agentes microbianos da urina (Hoepelman et al., 2003). Contudo, alguns microrganismos permanecem capazes de crescer e aumentar a infecção sendo mais difícil combater a infecção e o paciente torna-se mais suscetível a desenvolver infecções urinárias (Hoepelman et al., 2003, Sheerin, 2011). As bactérias são também e geralmente os principais microrganismos responsáveis por infecções urinárias, sendo que por vezes envolvem as bactérias da flora intestinal como *E. coli* (Lee e Neild, 2007; Sheerin, 2011). Os organismos patogénicos mais comuns em infecções urinárias são *E. coli*, *S. aureus* uma vez que foram as bactérias mais isoladas em estudos de infecções urinárias (Lee e Neild, 2007; Sheerin, 2011, Ekwealor et al., 2016) e os resultados obtidos no presente trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias/soluções capazes de prevenir tais infecções.

3.2.2. Método de difusão em disco

Os nanomateriais antibacterianos baseados no zeólito Y e preparados neste trabalho foram ainda comparados com outros previamente estudados recorrendo-se para o efeito ao método de difusão em disco, um método mais simples e mais rápido. Este método permitiu avaliar e comparar a atividade antimicrobiana dos nanomateriais por observação e medição de eventuais halos de inibição do crescimento das estirpes em estudo. Para além destes nanomateriais monometálicos e bimetálicos, foram também testados nesta metodologia outros nanomateriais preparados com diferentes concentrações de prata e/ou diferentes estruturas zeolíticas com diferentes percentagens de prata, estando todos apresentados na Tabela XI.

Tabela XI - Nanomateriais usados para o método de difusão em disco. Para estes nanomateriais indica-se também a percentagem de prata, zinco e a razão Si/Al.

Nanomaterial	Ag (%) ^(a)	Zn (%) ^(a)	Si/Al ^(b)	Referência
NaY	-	-	2,40	Este trabalho
Cu _{0,05} Y	-	-	2,60	Este trabalho
Zn _{0,05} Y	-	5,40 ^(c)	2,63	Este trabalho
Ag _{0,01} Y	7,90	-	2,39	Este trabalho
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	6,30	5,20	2,25	Este trabalho
Ag _{0,001} Y	0,50 ^(c)	-	2,62	Este trabalho
Ag _{0,002} Y	2,10 ^(c)	-	2,60	Este trabalho
Ag _{0,01} A	2,30	-	1,24	Guedes, 2015
Ag _{0,01} ZSM-5	0,70	-	15,0	Guedes, 2015
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y ^(*)	1,25	3,31	2,83	Ferreira, 2012

^(a)valores obtidos por ICP-AES^(b)valores obtidos por XRD^(c)valores obtidos por EDX^(*) Nanomaterial com diferente percentagem de prata que Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y obtido em 2.4

Os nanomateriais presentes na tabela XI foram testados na concentração de 2,0 mg/mL contra as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Tabela XII) e contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* (Tabela XIII). Pela análise da Tabela XII, pode concluir-se que NaY, Cu_{0,05}Y e Zn_{0,05}Y não exerceram efeito antimicrobiano contra qualquer das leveduras. Os restantes nanomateriais provocaram alguma inibição do crescimento de ambas as leveduras, embora se verifiquem diâmetros ligeiramente superiores no caso de *S. cerevisiae*, sendo, por conseguinte, o efeito antimicrobiano ligeiramente mais pronunciado em *S. cerevisiae* do que em *C. albicans*. Estes resultados corroboram os resultados obtidos anteriormente para ambas as leveduras (Figura 19) onde foi detetado algum efeito antimicrobiano para os nanomateriais de prata apenas, revelados numa redução do número de UFC após tratamento com esses nanomateriais. Contudo, a ausência de um antifúngico como controlo não permite que se possa ter uma noção exata do potencial antimicrobiano destes nanomateriais, embora a existência de halos de inibição seja indicadora de tal atividade, e seja certamente dependente da concentração.

Tabela XII - Efeito antimicrobiano de 50 µL de cada nanomaterial nas leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Os resultados estão expressos na medida do diâmetro de cada halo de inibição (em mm). - Ausência de halo.

Nanomaterial	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
NaY	-	-
Cu _{0,05} Y	-	-
Zn _{0,05} Y	-	-
Ag _{0,01} Y	21,50	16,67
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	19,33	15,17
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y ^(*)	15,50	15,50
Ag _{0,01} A	15,67	13,33
Ag _{0,01} ZSM-5	15,50	13,40

Para além das leveduras, foi igualmente testado o efeito antimicrobiano nas bactérias *E. coli*, *S. aureus*, tendo-se incluído ainda a bactéria MRSA neste rastreio e quatro antibióticos comerciais - vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) - (Tabela XIV) dada a já conhecida atividade antibacteriana de alguns destes nanomateriais. A análise dos resultados obtidos foi feita segundo os critérios de diâmetro atualmente listados propostos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015) para os quatro antibióticos testados (Tabela XIII).

Tabela XIII - Critérios de diâmetro listados para os antibióticos vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) (adaptado de CLSI, 2015).

	Suscetível	Intermédio	Resistente
VAN	≥ 12	10 - 11	≤ 9
ERI	≥ 26	23 - 25	≤ 22
AMC	≥ 18	14 - 17	≤ 13
CIP	≥ 21	14 - 20	≤ 14

Tabela XIV - Efeito antimicrobiano de 50 µL dos nanomateriais a 2 mg/mL e dos antibióticos comerciais (vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) nas bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA. Os resultados estão expressos na medida do diâmetro de cada halo de inibição (em mm). - Ausência de halo.

Nanomaterial	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA
NaY	-	-	-
Cu _{0,05} Y	-	-	-
Zn _{0,05} Y	-	-	-
Ag _{0,01} Y	18,83	21,17	22,83
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	17,50	19,67	23,50
Ag _{0,001} Y	17,83	9,67	15,33
Ag _{0,002} Y	18,17	9,83	15,17
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y ^(*)	18,67	19,67	20,83
Ag _{0,01} A	16,50	19,50	22,17
Ag _{0,01} ZSM-5	18,67	18,83	24,00
Antibióticos			
VAN	-	18,33	-
ERI	9,17	24,00	-
AMC	22,33	48,33	-
CIP	35,67	26,17	-

Pela comparação dos valores das Tabelas XIII e XIV, pode inferir-se que *S. aureus* é suscetível aos antibióticos VAN, AMC e CIP uma vez que apresentou diâmetros superiores aos limites estabelecidos para cada antibiótico (Tabela XIII). Já o antibiótico ERI apresenta um efeito intermédio em *S. aureus* de acordo com os valores tabelados (Tabela XIII). *E. coli* é considerada resistente aos dois antibióticos VAN e ERI e mostrou-se suscetível aos antibióticos AMC e CIP (Tabelas XIII e XIV). Por outro lado, a bactéria MRSA, resistente a todos os antibióticos testados neste trabalho, não apresentou qualquer halo de inibição (Tabela XIV). Esta resistência adquirida é, como já referido, reconhecida pela OMS como um problema de saúde mundial, uma vez que as infeções provocadas por MRSA não apresentam tratamentos eficazes. Esta bactéria foi aliás listada pela OMS como um agente de prioridade alta para o desenvolvimento de novos antibióticos (OMS, 2017). As bactérias resistentes possuem a capacidade inata de encontrar novas formas de resistir ao tratamento, podendo transmitir material genético que permite a outras bactérias tornarem-se também resistentes aos fármacos.

No presente trabalho verifica-se que alguns dos nanomateriais exerceram maior efeito do que os antibióticos testados. Foi feita uma comparação entre os valores dos halos obtidos para cada nanomaterial e antibiótico (Tabela XIV) calculando-se a razão entre os diâmetros do halo de inibição

obtido para cada nanomaterial e o registado para um dado antibióticos, contra uma dada bactéria, a fim de verificar o potencial antimicrobiano de cada nanomaterial (maior, menor ou idêntico efeito ao de um dado antibiótico se o valor calculado for respetivamente superior, inferior ou idêntico a 1). Quando o nanomaterial exerceu maior atividade antibacteriana do que o antibiótico tal efeito foi assinalado com o sinal +, caso se tenha revelado menos eficaz que o antibiótico escolheu-se o símbolo - e, por último, foi utilizado o símbolo = se ambos tiverem efeito antimicrobiano idêntico. Estes resultados estão apresentados na Tabela XV onde se pode observar que NaY, Cu_{0,05}Y e Zn_{0,05}Y exibem um efeito idêntico ou menor que o dos antibióticos contra as três estirpes. Por outro lado, todos os zeólitos permutados com prata possuem maior atividade contra *E. coli* do que os antibióticos VAN e ERI aos quais a estirpe é resistente. Os antibióticos VAN e ERI atuam sobre as bactérias através da inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese de proteínas, respetivamente. Já o antibiótico AMC inibe a síntese de peptidoglicano da parede celular e CIP inibe a síntese de ácidos nucleicos, sendo a ação antibacteriana de ambos (aos quais a estirpe é suscetível) superior a todos os nanomateriais testados.

Tabela XV - Atividade antibacteriana dos nanomateriais em comparação com o efeito dos antibióticos vancomicina (VAN), eritromicina (ERI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP) em que + significa maior atividade antibacteriana que o antibiótico, - menor atividade que a do antibiótico e = quando a atividade do nanomaterial é idêntica à do antibiótico. A sombreado indicam-se os antibióticos para os quais cada bactéria testada é suscetível.

	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>				MRSA			
	VAN	ERI	AMC	CIP	VAN	ERI	AMC	CIP	VAN	ERI	AMC	CIP
NaY	=	-	-	-	-	-	-	-	=	=	=	=
Cu _{0,05} Y	=	-	-	-	-	-	-	-	=	=	=	=
Zn _{0,05} Y	=	-	-	-	-	-	-	-	=	=	=	=
Ag _{0,01} Y	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Ag _{0,001} Y	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ag _{0,002} Y	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Zn _{0,05} Ag _{0,01} Y(*)	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Ag _{0,01} A	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Ag _{0,01} ZSM-5	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

Quanto a *S. aureus*, apenas alguns nanomateriais permutados com prata - concretamente $Ag_{0,01}Y$, $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$, $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y^{(*)}$, $Ag_{0,01}A$ e $Ag_{0,01}ZSM-5$ - foram mais eficazes que VAN (Tabela XV). No caso dos nanomateriais monometálicos, apenas o baseado no zeólito Y (Si/Al = 2,40) permutado com maior quantidade de prata (7,9 %) desencadeou um maior halo de inibição que o antibiótico VAN, ao contrário dos nanomateriais $Ag_{0,001}Y$ e $Ag_{0,002}Y$, indicando que a quantidade de prata é importante para a ação antimicrobiana deste nanomaterial e também a disponibilidade da prata como é evidenciado pela análise de TEM (Figura 15). Os restantes nanomateriais foram menos eficazes contra a estirpe do que os antibióticos ERI, AMC e CIP (Tabela XV).

Por último, todos os nanomateriais permutados com prata afetam o crescimento de MRSA, ao contrário dos quatro antibióticos testados que não possuem qualquer efeito nesta estirpe (Tabela XIII). Este resultado torna-se bastante interessante uma vez que se trata de uma bactéria multirresistente aos antibióticos, mas que é afetada pela ação dos nanomateriais em estudo.

4. Conclusões

O zeólito NaY mostrou ser um bom suporte para permutar um ou dois íons na sua estrutura porosa. Foram preparados diferentes nanomateriais monometálicos e um bimetálico sendo preservadas as propriedades estruturais do suporte. Os nanomateriais baseados no zeólito Y foram caracterizados por diferentes técnicas. As análises por FTIR e XRD confirmam a integridade da estrutura zeolítica após a permuta dos íons sugerindo que os metais permutados estão homoganeamente dispersos na estrutura do zeólito. A análise por TEM corrobora esses resultados. As micrografias de TEM para os nanomateriais $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ mostram que os íons de prata e zinco estão dispersos na estrutura do zeólito NaY, sendo que a periferia das nanopartículas de zeólito é mais rica em ambos os metais do que no interior e ambos os metais são acessíveis à superfície do zeólito. A análise química confirmou a presença da prata e de zinco nos nanomateriais preparados.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados com os nanomateriais preparados em concentrações de 0,2 a 2 mg/mL. Para cada nanomaterial foi determinado o valor da concentração mínima inibitória (MIC) contra cada uma das estirpes microbianas testadas. Foi comprovado que a presença de metais confere atividade antimicrobiana à estrutura zeolítica. Para os nanomateriais monometálicos com Cu e Zn uma concentração de 2 mg/mL não foi suficiente para inibir totalmente o crescimento de todos os microrganismos testados e o mesmo aconteceu para o nanomaterial monometálico com Ag e o bimetálico contra as duas leveduras testadas. Porém, $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ mostraram-se eficazes contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* inibindo completamente o crescimento microbiano às concentrações de 0,2 e 0,5 mg/mL, respectivamente. Assim, pode concluir-se que estes nanomateriais à base de prata (mas todos eles de um modo geral) têm mais atividade antibacteriana que antifúngica.

Os nanomateriais mais eficazes contra *E. coli* foram $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ uma vez que foi observada uma diminuição significativa de UFC ao longo do tempo, não se observando crescimento após 40 minutos de incubação com os nanomateriais. $\text{Zn}_{0,05}\text{Y}$ e $\text{Cu}_{0,05}\text{Y}$ afetaram também o crescimento de *E. coli*, já em *S. aureus* só após 20 e 40 minutos, respectivamente, se detetou algum efeito. O nanomaterial bimetálico $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ mostrou-se também significativamente eficaz contra *S. aureus* mas o mesmo não se verificou com $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$, não se podendo concluir com clareza o seu efeito. De acordo com estes resultados, a bactéria Gram-negativa *E. coli* mostrou-se mais sensível aos nanomateriais do que a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

No caso das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, apenas os nanomateriais com prata afetaram de algum modo o seu crescimento: $\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ e $\text{Zn}_{0,05}\text{Ag}_{0,01}\text{Y}$ inibiram o crescimento de *S. cerevisiae* de

forma significativa a partir de 8 h de incubação enquanto que em *C. albicans* se verifica uma diminuição significativa após 6 h incubação com $Ag_{0,01}Y$ e após 8 h de incubação com $Zn_{0,05}Ag_{0,01}Y$.

Com o método de difusão em disco foi possível comparar o comportamento de todos os nanomateriais preparados e o comportamento de outros nanomateriais com diferentes quantidades de prata e/ou estrutura zeolítica com a finalidade de comprovar se o efeito antimicrobiano estará dependente da quantidade de prata na estrutura. Tal como esperado, os nanomateriais de cobre e zinco não surtiram qualquer efeito contra as estirpes de levedura e bactéria testadas ao contrário dos nanomateriais com prata. Comparando as duas leveduras, verificou-se que os diâmetros observados para *S. cerevisiae* foram ligeiramente superiores aos diâmetros de *C. albicans*.

Foi comparada a ação das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e MRSA com os antibióticos VAN, ERI, AMC e CIP. Alguns dos nanomateriais testados exerceram maior efeito antimicrobiano que os antibióticos. Os nanomateriais com prata tiveram uma maior ação contra *E. coli* do que os antibióticos VAN e ERI aos quais é resistente. Já para *S. aureus*, apenas os nanomateriais $Ag_{0,001}Y$ e $Ag_{0,002}Y$ foram menos eficazes que o antibiótico VAN ao qual é suscetível, ao contrário do que se verificou com todos os restantes nanomateriais à base de prata. Este resultado permite concluir que o efeito dos nanomateriais pode estar dependente da quantidade de prata sendo necessária uma quantidade mais elevada para maior atividade que este antibiótico, pelo menos nesta estirpe. Por fim, todos os nanomateriais de prata foram mais eficazes contra a bactéria MRSA do que os antibióticos testados (aos quais esta bactéria é resistente) devido à sua capacidade de resistência a antibióticos sendo indicada pela OMS como alta prioridade para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, este resultado revela-se de extrema importância uma vez que pode levar ao desenvolvimento de soluções que possam ser usadas na prevenção e combate a esta estirpe.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os nanomateriais de prata foram os nanomateriais mais eficazes contra os microrganismos em estudo sendo por vezes mais eficazes do que os antibióticos.

5. Referências

- Aceto, M., Abollino, O., Bruzzoniti, M. C., Mentasti, E., Sarzanini, C., Malandrino, M. (2002). Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food Additives and Contaminants*, 19(2):126-133.
- Akhavan, O., Ghaderi, E. (2010). Cu and CuO Nanoparticles Immobilized by Silica Thin Films as Antibacterial Materials and Photocatalysts. *Surface and Coatings Technology*, 205(1):219–23.
- Auerbach, S. M., Carrado, K. A., Dutta, P. K. (2003), *Handbook of Zeolites Science and Technology*, 1ª edição, Marcel Dekker, Nova Iorque.
- Baerlocher, Ch., McCusker, L. B., Olson, D. H. (2007). *Atlas of Zeolite Framework Types*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.
- Berger, T. J., Spadaro, J. A., Chapin, S. E., Becker, R. O. (1976). Electrically Generated Silver Ions: Quantitative Effects on Bacterial and Mammalian Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9(2):357–58.
- Bogdanov, B., Georgiev, D., Angelova, K., Hristov, Y. (2009). Synthetic Zeolites and Their Industrial and Environmental Applications. *Natural and Mathematical Science*, 4, 1-5.
- Castaldi, P., Santona, L., Enzo, S., Melis, P. (2008). Sorption process and XRD analysis of a natural zeolite exchanged with Pb²⁺, Cd²⁺ and Zn²⁺ cations. *Journal of Hazardous Materials*. 156, 428-434.
- Čejka, J., Bekkum, H. (2005). *Zeolites and ordered mesoporous materials: progress and prospects*, *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier, Amsterdam, volume 157 1st Edition.
- Chen, C. W., Hsu, C. Y., Lai, S. M., Syu, W. J, Wang, T. Y., Lai, P. S. (2014). Metal Nanobullets for Multidrug Resistant Bacteria and Biofilms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78:88–104.
- Chester, A. W., Derouane, E. G. (2009). *Zeolite Characterization and Catalysis. A Tutorial*. Springer.
- Chibani, S., Chebbi, M., Lebègue, S., Cantrel, L., Badawi, M. (2016). Impact of the Si/Al ratio on the selective capture of iodine compounds in silver-mordenite: a periodic DFT study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(36), 25574–25581.
- Chiericatti, C., Basílico, J. C., Basílico, M. L. Z., Zamaro, J. M. (2014). Antifungal activity of silver ions exchanged in mordenite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 188, 118–125.
- CLSI (2015). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute document M100-S25. CLSI, Wayne, PA.
- Coleman, N.J., Bishop, A.H., Booth, S.E., Nicholson, J.W. (2009). Ag⁺- and Zn²⁺-Exchange Kinetics and Antimicrobial Properties of 11 Å Tobermorites. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(6):1109–17.
- Corma, A., Garcia, H. (2004). Supramolecular Host-Guest Systems in Zeolites Prepared by Ship-in-a-Bottle Synthesis. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (6):1143-64.
- Crabtree, J. H., Burchette, R. J., Siddiqi, R. A., Huen, I. T., Hadnott, L. L, Fishman, A. (2003). The Efficacy of Silver-Ion Implanted Catheters in Reducing Peritoneal Dialysis-Related Infections. *Peritoneal Dialysis International*, 23(4):368–74.
- Deka, R. C. (1998). Acidity in zeolites and their characterization by different spectroscopic methods. *Indian Journal of Chemical Technology*, 5(3):109–123.
- Demirci, S., Ustaoglu, Z., Yilmazer, G. A., Sahin, F., Baç, N. (2013). Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc against a Broad Range of Microorganisms.

- Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(3):1652–62.
- Donk, S., Janssen, A. H., Bitter, J. H., Jong, K. P. (2007). Generation, Characterization, and Impact of Mesopores in Zeolite Catalysts. *Catalysis Reviews*, 45(2), 297–319.
- Dunn, K., Edwards-Jones, V. (2004). The Role of Acticoat™ With Nanocrystalline Silver in the Management of Burns. *Burns* 30 (Supl. 1).
- Ekwealor, P. A., Ugwu, M. C., Ezeobi, I., Amalukwe, G., Ugwu, B. C., Okezie, U., Stanley, C., Esimone, C. (2016). Antimicrobial Evaluation of Bacterial Isolates from Urine Specimen of Patients with Complaints of Urinary Tract Infections in Awka, Nigeria. *International Journal of Microbiology*, vol. 2016, Article ID 9740273, 6 pages.
- Fan, J., Zhang, J., Zhang, E., Ren, L., Shi, Q. (2011). Adsorption of 2,4,6-trichlorophenol from aqueous solution onto activated carbon derived from loosestrife. *Desalination* 267, 139-146.
- Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P. W., Richie, J. P., Langer, R. (2006). Targeted Nanoparticle-aptamer Bioconjugates for Cancer Chemotherapy *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16):6315–20.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., Kim, J. O. (2000). A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4):662–68.
- Ferreira, L. (2012). Desenvolvimento de Embalagens Alimentares Poliméricas com Propriedades Antimicrobianas. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.
- Ferreira, L., Almeida-Aguiar, C., Parpot, P., Fonseca, A. M., Neves, I.C. (2015). Preparation and Assessment of Antimicrobial Properties of Bimetallic Materials Based on NaY Zeolite. *RSC Advances*, 5(47):37188–95.
- Ferreira, L., Fonseca, A. M., Botelho, G., Aguiar, C. A., Neves, I. C. (2012). Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous and Mesoporous Materials*, 160, 126–132. a review. *Food Additives and Contaminants*, 19(2), 126–133.
- Figueiredo, H. (2007). Reutilização Catalítica de Biossorventes Suportados em Zeólitos. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.
- Figueiredo, L., Ramôa, F. R. (1989). *Catálise Heterogénea*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Fonseca, A. M., Neves, I. C. (2013). Study of silver species stabilized in different microporous zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, 181:83–87.
- Fox, C. L. Jr. (1968). Silver Sulfadiazine-A New Topical Therapy for *Pseudomonas* in Burns. *Therapy of Pseudomonas Infection in Burns. Arch Surg*, 96(2):184-188.
- Georgiev, D., Bogdanov, B., Angelova, K., Markovska, I., Hristov, Y. (2009). Synthetic zeolites: structure, classification, current trends in zeolite synthesis. *Technical Studies*, 7:1-5.
- Ghesti, G.C., Macedo, J.L., Parente, V.C.I., Dias, J.A., Dias, S.C.L. (2007). *Microporous and Mesoporous Materials*, 100:27-34.
- Gleiter, H. (2000). Nanostructured Materials: Basic Concepts and Microstructure. *Acta Materialia*, 48(1):1–29.
- Graaf, J., van Dillen, A., Jong, K., Koningsberger, D. (2001). Preparation of Highly Dispersed Pt Particles

- in Zeolite Y with a Narrow Particle Size Distribution: Characterization by Hydrogen Chemisorption, TEM, EXAFS Spectroscopy, and Particle Modeling. *Journal of Catalysis*, 203(2), 307–321.
- Grass, G., Rensing, C., Solioz, M. (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5):1541–47.
- Guangjian, D., Aili, Y., Xiang, C., Qingshan, S., Yousheng, O, Shaozao, T. (2012). Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Zinc and Cerium Co-Doped α -Zirconium Phosphate. *Journal of Rare Earths*, 30(8):820–25.
- Guedes, J. (2015). Zeolite-based nanomaterials for the control of opportunistic pathogenic microorganisms. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.
- Guisnet, M., Ribeiro, F. (2004). Zeólitos: Um nanomundo ao serviço da catálise. Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa.
- Hoepelman, A. I. M., Meiland, R., Geerlings, S. E. (2003). Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, S35-S43.
- Hof, M. (2003). Basics of Optical Spectroscopy. in *Handbook of Spectroscopy*. G. Gauglitz, T. Vo-Dinh Editor. Wiley-VCH.
- Horcajada, P., Márquez-Alvarez, C., Rámila, A., Pérez-Pariente, J., Vallet-Regí, M. (2006). Controlled release of Ibuprofen from dealuminated faujasites. *Solid State Sciences*, 8(12):1459-65.
- Hu, C., Xia, M. (2006). Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88. *Applied Clay Science*, 31:180-184.
- Hu, C.H., Xu, Z.R, Xia, M.S. (2005). Antibacterial Effect of Cu^{2+} -Exchanged Montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* and Discussion on its Mechanism. *Veterinary Microbiology*, 109(1-2):83–88.
- Inoue, Y., Hamashima, H. (2012). Effect of Silver-Loaded Zeolite on the Susceptibility of *Escherichia coli* Against Antibiotics. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(01):114–17.
- Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y, Hamashima, H., Sasatsu, M. (2002). Bactericidal Activity of Ag-zeolite Mediated by Reactive Oxygen Species under Aerated Conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(1):37–42.
- Ip, M., Lui, S. L., Poon, V. K. M., Lung, I., Burd, A. (2006). Antimicrobial Activities of Silver Dressings: An *in vitro* Comparison. *Journal of Medical Microbiology*, 55(1):59–63.
- IZA (2016). Database of zeolite structures from the International Zeolite Association (IZA-SC). Disponível em www.iza-structure.org/databases. Acedido em setembro de 2016.
- Jaiswal, S., McHale, P., Duffy, B. (2012). Preparation and Rapid Analysis of Antibacterial Silver, Copper and Zinc Doped Sol-Gel Surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94:170–76.
- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., Manna, A. C. (2008). Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle Suspensions on a Broad Spectrum of Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1):71–76.
- Kaduk, J. A., Faber, J. (1995). Crystal Structure of Zeolite Y as a Function of Ion Exchange. *The Rigaku Journal*, 12(2):1.
- Kalantar-zadeh, K., Fry, B. (2008). *Characterization Techniques for Nanomaterials. Nanotechnology-Enabled Sensors*. Springer.

- Karami, D., Rohani, S. (2009). Synthesis of pure zeolite Y using soluble silicate, a two-level factorial experimental design. *Chemical Engineering and Processing*, 48(8):1288-1292.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., Lee, D. G. (2008). Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8):1482–84.
- Knetsch, M. L. W., Koole, L. H. (2011). New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*, 3(1):340–66.
- Kumar, R., Münstedt, H. (2005). Silver Ion Release from Antimicrobial Polyamide/Silver Composites. *Biomaterials*, 26(14):2081–88.
- Laluzza, P., Monzón, M., Arruebo, M., Santamaría, J. (2011). Bactericidal Effects of Different Silver-Containing Materials. *Materials Research Bulletin*, 46(11):2070–76.
- Lambert, J. B., Shurvell, H. F., Lightner, D. A., Cooks, R. G., (1998). *Organic Structural Spectroscopy*. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 226 – 239.
- Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., Rodríguez-Padilla, C. (2010). Mode of Antiviral Action of Silver Nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1):1.
- Lee, J. B. L., Neild, G. H. (2007). Urinary tract infection. *Medicine*, 35:423-428.
- Lentys, A, Lercher, J. A. (2001). Techniques of Zeolite Characterization, in van Bekkum, H., Flanigen, E.M., Jacobs, P.A., Jansen, J.C., “Introduction to Zeolite Science and Practice”, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Li, C., Wu, Z. (2003). Microporous Materials Characterized by Vibrational Spectroscopies. in *Handbook of Zeolite Science and Technology*. S.M. Auerbach, K.A. Carrado, P.K. Dutta (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Li, K., Wang, X. (2009). Adsorptive removal of Pb (11) by activated carbon prepared from *Spartina alterniflora*: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Bioresource Technology* 100:2810-2815.
- Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevich, R., Fernandez, A. (2012). Metallic-Based Micro and Nanocomposites in Food Contact Materials and Active Food Packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1):19–29.
- Lutz, W. (2014). Zeolite Y: Synthesis, Modification, and Properties—A Case Revisited. *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2014, Article ID 724248, 20 pages.
- Lutz, W., Ruscher, C. H., Heidemann, D. (2002). Determination of the framework and non-framework [SiO₂] and [AlO₂] species of steamed and leached faujasite type zeolites: calibration of IR, NMR, and XRD data by chemical methods. *Microporous and Mesoporous Materials*, 55:193-202.
- Malachová, K., Praus, P., Rybková, Z., Kozák, O. (2011). Antibacterial and Antifungal Activities of Silver, Copper and Zinc Montmorillonites. *Applied Clay Science*, 53(4):642–45.
- Malatesta, M. (2016). Transmission electron microscopy for nanomedicine: Novel applications for long-established techniques. *European Journal of Histochemistry*, 60(4), 8–12.
- Martins, L., Cardoso, D. (2006). Aplicação Catalítica de Peneiras Moleculares Básicas Micro e Mesoporosas. *Química Nova*, 29, 358-364.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T. (2003). Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with that of Silver Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):4278–81.

- Mehtar, S., Wiid, I., Todorov, S. D. (2008). The Antimicrobial Activity of Copper and Copper Alloys against Nosocomial Pathogens and Mycobacterium Tuberculosis Isolated from Healthcare Facilities in the Western Cape: an *in vitro* Study. *Journal of Hospital Infection*, 68(1):45–51.
- Meyers, R. A., (2000), “Encyclopedia of Analytical Chemistry”, John Wiley & Sons, Chichester.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., Angeles de la la Rubia, M. (2012). Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, 58, 125–133.
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo-Filho, A. C., Camargo, E. R., Barbosa, D. B. (2009). The Growing Importance of Materials that Prevent Microbial Adhesion: Antimicrobial Effect of Medical Devices Containing Silver. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(2):103–10.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, M. J. (2005). The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10):2346–53.
- Mozgawa, M., (2000). The influence of some heavy metals cations on the FTIR spectra of zeolites. *Journal of Molecular Structure*, 555(1-3): 299–304.
- Nasrollahi, Y. K., Kim, B. H., Jung, G. (2011). Antifungal Activity of Silver Nanoparticles on some fungi. *Plant Disease*, 93(10):1037–1043.
- Neogy, S., Savalia, R. T., Tewari, R., Srivastava, D., Dey, G. K. (2006). Transmission electron microscopy of nanomaterials. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 44:119–124.
- Nibou, D., Amokrane, S., Mekatel, H., Lebaili, N. (2009). Elaboration and characterization of solid materials of types zeolite NaA and faujasite NaY exchanged by zinc metallic ions Zn²⁺. *Physics Procedia*, 2(3):1433–1440.
- OMS (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Disponível em <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en>. Acedido em maio de 2017.
- Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. (2015). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42):1712–20.
- Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolár, M., Večřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevečná, T., Zboril, R. (2006). Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and their Antibacterial Activity. *Journal of Physical Chemistry*, 110(3):16248-53.
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., Bolzinger, M.A. (2014). The Contribution of Zinc Ions to the Antimicrobial Activity of Zinc Oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457(1):263–74.
- Pescarmona, P. (2003). An Exploration of Silsesquioxanes and Zeolites Using High-Speed Experimentation. Tese de doutoramento, Università di Torino, Itália.
- Pina, M. P., Mallada, R., Arruebo, M., Urbiztondo, M., Navascués, N., De La Iglesia, O., Santamaria, J. (2011). Zeolite films and membranes. Emerging applications. *Microporous and Mesoporous Materials*, 144(1–3):19–27.
- Prati, S., Sciutto, G., Bonacini, I., Mazzeo, R. (2016). New Frontiers in Application of FTIR Microscopy for Characterization of Cultural Heritage Materials. *Topics in Current Chemistry*, 374(3):1–32.

- Qiu, P., Wang, L., Mao, C. B. (2014). TEM Characterization of Biological and Inorganic Nanocomposites from Transmission Electron Microscopy Characterization of Nanomaterials, C. S. S. R. Kumar (ed.) in SpringerMaterials. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-41.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1):76–83.
- Rebello, P. (2009). Degradação Catalítica do Polietileno. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.
- Rensing, C., Grass, G. (2003). *Escherichia coli* Mechanisms of Copper Homeostasis in a Changing Environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):197–213.
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., Mukherji, S. (2008). Strain Specificity in Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3):707–16.
- Sabbani, S., Gallego-Perez, D., Nagy, A., Waldman, W. J., Hansford, D., Dutta, P. K. (2010). Synthesis of Silver-Zeolite Films on Micropatterned Porous Alumina and its Application as an Antimicrobial Substrate. *Microporous and Mesoporous Materials*, 135(1-3):131–36.
- Salavati-Niasari, M. (2009). Synthesis and characterization of 18- and 20-membered hexaaza macrocycles containing pyridine manganese(II) complex nanoparticles dispersed within nanoreactors of zeolite-Y. *Polyhedron*, 28(12):2321–2328.
- Santo, C. E., Lam, E. W., Elowsky, C. G., Quaranta, D., Domaille, D. W., Chang, C. J., Grass, G. (2011). Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3):794–802.
- Santo, C. E., Morais, P. V., Grass, G. (2010). Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5):1341–48.
- Sawai, J., Yoshikawa, T. (2004). Quantitative Evaluation of Antifungal Activity of Metallic Oxide Powders (MgO, CaO and ZnO) by an Indirect Conductimetric Assay. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4):803–9.
- Seil, J. T., Webster, T. J. (2012). Antibacterial Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Combined with Ultrasound. *Nanotechnology*, 23(49):495101.
- Shah, A. H., Manikandan, E., Ahmed, M. B., Ganesan, V. (2013). Enhanced Bioactivity of Ag/ZnO Nanorods-A Comparative Antibacterial Study. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4 (3)(03):1–6.
- Sheerin, N. S. (2011). Urinary tract infection. *Medicine*, 39(7):384-389.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2010). Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22):1–9.
- Shruti, S., Salinas, A. J., Lusvardi, G., Malavasi, G., Menabue, L., Vallet-Regi, M. (2013). Mesoporous Bioactive Scaffolds Prepared with Cerium-, Gallium- and Zinc-Containing Glasses. *Acta Biomaterialia*, 9(1):4836–44.
- Silver, S., Phung, L. T. (1996). Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annual Review of Microbiology*, 50(1):753–89.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th Edition.
- Slawson, R. M., Trevors, J. T., Lee, H. (1992). Silver Accumulation and Resistance in *Pseudomonas*

- stutzeri*. Archives of Microbiology, 158:398–404.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, S. (2004). 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(1):177–82.
- Stanić, V., Dimitrijević, S., Antić-Stanković, J., Mitrić, M., Jokić, B., Plečas, I.B., Raićević, S. (2010). Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Copper and Zinc-Doped Hydroxyapatite Nanopowders. Applied Surface Science, 256(20):6083–89.
- Stuart, B. H. (2005). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- Su, D. (2017). Advanced electron microscopy characterization of nanomaterials for catalysis. Green Energy & Environment, 2(2):70-83.
- Szabó, T., Németh, J., Dékány, I. (2003). Zinc Oxide Nanoparticles Incorporated in Ultrathin Layer Silicate Films and Their Photocatalytic Properties. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 230(1-3):23–25.
- Terzioğlu, P., Yücel, S., Öztürk, M. (2016). Application of Box–Behnken design for modeling of lead adsorption onto unmodified and NaCl-modified zeolite NaA obtained from biosilica. Water Science and Technology, 75(2):358–365.
- Tian, J., Wong, K. K. Y., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F., Tam, P. K. H. (2007). Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. ChemMedChem, 2(1):129–136.
- Top, A., Ülkü, S. (2004). Silver, Zinc, and Copper Exchange in a Na-clinoptilolite and Resulting Effect on Antibacterial Activity. Applied Clay Science, 27(1-2):13–19.
- Tsitsishvili, G. V., Andronikashvili, T. G., Kirov, G. N., Filizova, L. D., (1992). Natural Zeolites. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
- Turcotte, M. G., Johnson, T. A. (1992). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th edition. John Wiley & Sons. New York.
- Valtchev, V. P., Bozhilov, K. N. (2004). Transmission Electron Microscopy Study of the Formation of FAU-Type Zeolite at Room Temperature. The Journal of Physical Chemistry B, 108(40):15587–15598.
- van Bekkum, H., Flanigen, E. M., Jacobs, P. A., Jansen, J. C. (2001). Introduction to Zeolite Science and Practice. 2nd completely revised and expanded edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- van Bekkum, H., Flanigen, E. M., Jansen, J. C. (1991). Introduction to Zeolite Science and Practice. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q., Yu, A. B. (2006). Inorganic Nanoparticles as Carriers for Efficient Cellular Delivery. Chemical Engineering Science, 61(3):1027–40.
- Yamamoto, O., Sawai, J., Sasamoto, T. (2000). Change in Antibacterial Characteristics with Doping Amount of ZnO in MgO-ZnO Solid Solution. International Journal of Inorganic Materials, 2(5):451–54.
- Yoon, K. Y., Byeon, J. H., Park, J. H., Hwang, J. (2007). Susceptibility Constants of *Escherichia coli* and *Bacillus Subtilis* to Silver and Copper Nanoparticles. Science of the Total Environment, 373(2-3):572–75.
- Zhang, L., Liu, H., Li, X., Xie, S., Wang, Y., Xin, W., Liu, S., Xu, L. (2010). Differences between ZSM-5 and

- ZSM-11 zeolite catalysis in 1-hexene aromatization and isomerization. *Fuel Processing Technology*, 91:449-455.
- Zhang, Y., Zhong, S., Zhang, M., Lin, Y. (2009). Antibacterial Activity of Silver-Loaded Zeolite A Prepared by a Fast Microwave-Loading Method. *Journal of Materials Science*, 44(2):457–62.
- Zhao, G., Stevens, S.E. (1998). Multiple Parameters for the Comprehensive Evaluation of the Susceptibility of *Escherichia coli* to the Silver Ion. *BioMetals*, 11(1):27–32.

