

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA Cu-Ag EM *S. Aureus* E *P. Aeruginosa* *

Gabriel Alves Gomes¹

Gisela Lara da Costa²

Letícia dos Santos Aguilera³

André Ben-Hur da Silva Figueiredo⁴

Resumo

Neste trabalho, nanopartículas de ferrita mista cobre-prata foram estudadas como uma opção viável de material bactericida reciclável. As nanopartículas Cu-Ag foram sintetizadas pelo método de combustão em solução e caracterizadas via difração de Raios-X. Ensaios *in vitro* foram estabelecidos como meio de avaliação do potencial de interação e da taxa média de inibição nas cepas *S. Aureus* e *P. Aeruginosa*, usando o método de difusão em meio ágar líquido. Análise por densidade óptica mostrou as comparações de quantidades relativas das cepas que foram eliminadas ou inibidas através dos mecanismos físicos das amostras. Resultados preliminares foram comparados com trabalhos semelhantes na literatura, indicando que a eficiência antibacteriana do material depende tanto do contato das partículas com a membrana celular das bactérias quanto do tamanho médio de cristalito das ferritas.

Palavras-chave: Nanopartículas de ferrita; Ferrita de prata-cobre; Efeito antibacteriano; Síntese por combustão.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF FERRITE NANOPOWDERS Cu-Ag AGAINST *S. Aureus* AND *P. Aeruginosa*

Abstract

Nanosized particles of silver-copper ferrite were studied as a viable option of recyclable bactericide material. The Cu-Ag nanoparticles was synthesized by homogeneous combustion technique and characterized by X-ray diffraction. Tests *in vitro* were established as an evaluation of the interaction potential and average inhibition ratio on *S. Aureus* and *P. Aeruginosa* strains, using the agar liquid solution diffusion method. The optical density analyses show the comparatives of relative amounts of total strains eliminated or inhibited through the material mechanisms. The primary results were compared with similar works on literature, suggesting that the antibacterial efficiency depends on contact of the particles with on the bacteria cell membranes, as well as on ferrites crystallite size.

Keywords: Ferrite nanoparticles; Silver-copper ferrite; Antibacterial effects; Combustion synthesis.

¹ Bacharel em Física, Mestre em Engenharia Nuclear, doutorando em Ciência dos Materiais, Seção de Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Bióloga, Doutora em Biologia, pesquisadora do Laboratório de Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ Engenheira Civil, Mestre em Ciência dos Materiais, doutoranda em Ciência dos Materiais, Seção de Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Bacharel em Física, Doutor em Ciência dos Materiais, professor e pesquisador da Seção de Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, RJ, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos nos tratamentos antibióticos conhecidos amplamente, tornou-se, nas últimas décadas, um problema real de eventos potencialmente prejudiciais à saúde humana. Como resultado, crescentes ocorrências de genes com maior resistência aos antibióticos são encontradas em algumas espécies de bactérias presentes no contato com seres humanos e outros animais [1].

Com efeito, em maio de 2014 a Organização Mundial da Saúde publicou seu primeiro relatório quantificando a ameaça da resistência bacteriana em 114 países, sinalizando uma situação alarmante perante a resistência bacteriana em todas as regiões do mundo [2]. De acordo com Raffi *et al* (2009), tal quadro se configura mais grave ainda quando a imunidade de certos micro-organismos decorre propriamente do uso indiscriminado de antibióticos contra qualquer patógeno, o que acaba por provocar efeitos secundários que refletem na crescente resistência bacteriana a muitos antibióticos.

Vislumbrando a necessidade de se buscar novas alternativas para o controle e combate à proliferação de bactérias e fungos em ambientes não totalmente controlados, vários trabalhos foram publicados utilizando os conceitos da interação de materiais nanoestruturados com esses microrganismos e estudando os possíveis efeitos oriundos desse contato [3, 4, 8, 13].

Em termos de controle e prevenção de doenças, estudos em nanotecnologia permitem ampliar possibilidades influenciando na estrutura atômica dos materiais. Pode-se estimar pelos atuais avanços e pesquisas na área, que o estudo de nanomateriais com propriedades de combate a bactérias e fungos é particularmente recente, considerando desde o crescimento de novos microrganismos cada vez mais resistentes até aos antibióticos mais eficientes [3].

A utilização de partículas metálicas de prata como agente antibacteriano é notavelmente conhecida devido às suas principais vantagens em termos de estabilidade química, resistência a variações de temperatura, eficácia e durabilidade em longos períodos. As vantagens ainda podem ser estendidas ao considerar a relativa baixa toxicidade dessas partículas para o corpo humano em comparação com outros metais inorgânicos [4]. Um exemplo do atrativo dessas nanopartículas são as aplicações em sistemas purificadores de água, amplamente difundidos na indústria.

Neste trabalho, objetiva-se estudar majoritariamente a atuação de nanopartículas de ferrita cobre-prata como uma opção de material bactericida, avaliando ainda os aspectos de interação e taxa de inibição provocada pela exposição aos micróbios. Serão relatados os procedimentos verificados para uma melhor taxa inibitória de aproveitamento. Por se tratarem de materiais cerâmicos, as nanopartículas de ferrita não desenvolvem mutações nas células bacterianas, podendo ainda ser separadas magneticamente do material orgânico e recicladas após lavagem química.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese por Combustão em solução

Nanopartículas de ferrita Cu-Ag foram sintetizadas simplificadaamente pelo método de combustão em solução. Uma mistura estequiométrica dos reagentes nitrato cúprico, nitrato de prata e nitrato férrico para $Cu_{1-x}Ag_xFe_2O_4$ são diluídos juntamente com o agente redutor glicina ($C_2H_5NO_2$) em um recipiente contendo água

deionizada, nas massas previamente definidas para a composição desejada do produto final e na estequiometria exata para o consumo completo dos óxidos pelo agente complexante. Nessa fase, foram avaliadas duas proporções entre o agente redutor e os agentes oxidantes, fixando a taxa molar de glicina-nitratos (razão G:N) em 1:1 e 2:3.

Os componentes de reação são então aquecidos a 373 K até que uma reação redox exotérmica entre o combustível e o agente oxidante ocorra homogênea e instantaneamente, levando à combustão simultânea autossustentada em todo o volume de solução resultando em um pó de grande volume e aparência escura definida pela quantidade de óxido presente nas amostras de ferrita. [5]

2.2 Caracterização das Amostras por Difração de Raios X (DRX)

As amostras de ferrita foram caracterizadas por meio de um difratômetro de RX de amostras em pó (XRD, Bruker AXS D8 Advance), usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) em 40 kV e 35 mA.

O tamanho médio dos cristalitos em uma amostra pode ser estimado a partir de medidas de difração de raios X usando o método de Debye-Scherrer [6], que se baseia na largura dos picos característicos de difração, conforme a Equação (1)

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

em que D é o tamanho de cristalito da fase sob investigação, λ o comprimento de onda da radiação incidente e β a largura a meia altura (FWHM) do pico de maior amplitude espectral.

O parâmetro de rede pode ser calculado para todas as amostras por meio da Equação (2) a seguir,

$$a = d_{hkl} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad (2)$$

em que d_{hkl} representa o espaçamento interplanar do pico referente ao plano cristalográfico sob análise.

2.3 Preparo do Meio de Cultura e Seleção das Cepas

Foram selecionadas para os bioensaios as cepas padrão ATCC Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), para análises quantitativas frente às amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

Com auxílio de uma alça de inoculação, retira-se um fragmento da bactéria preservada transferindo para uma placa de Petri contendo o meio de cultura Mueller-Hilton Agar. Após incubar por 24 horas, transfere-se uma alíquota da bactéria para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultura caldo Mueller-Hinton. Todos os tubos foram então incubados por 4 horas a 37°C para ativação e sincronização das bactérias.

Transferiu-se 1,0 mL da bactéria já crescida para um tubo contendo 1 mL de formol 10%. A leitura da quantidade de colônias foi feita por meio da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Spectronic Genesys 10 UV, $\lambda \approx 625 \text{ nm}$). Em sequência,

ajustou-se a concentração para a faixa entre $10^6 \sim 10^7$ UFC/mL em tubos contendo 5,0 mL de meio caldo Mueller-Hinton.

2.4 Separação das Amostras e Incubação em Agitação

Foram levadas à teste ferritas Cu-Ag de composição estrutural $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com concentrações respectivas de 2% e 5% de íons Ag^{2+} em sua composição. As amostras de cobre-prata sofreram refinamento na etapa de síntese, ajustando uma quantidade maior de oxidantes por reagente (razão G:N de 2:3 e 1:1). Com isso, busca-se investigar o possível efeito induzido pela alteração na estequiometria da reação no processo de mitigação da atividade bacteriana.

As amostras de ferrita foram separadas em rótulos conforme sua estrutura. Todas as amostras utilizadas tiveram como objetivo a investigação do processo inibidor de crescimento bacteriano e a relação da quantidade do íon prata em tal processo. Para tal, foram utilizadas neste estudo quatro amostras de ferrita cobre-prata sintetizadas pelo método de combustão em solução, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos códigos usados no trabalho para as ferritas cobre-prata

Código - Composição estrutural de amostra	Razão molar G:N
C510 - $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	1:1
C507 - $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	2:3
C210 - $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	1:1
C207 - $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	2:3

Foram utilizados 4 frascos Erlenmeyer de 50 mL para os ensaios com cada amostra contendo 5 mL de meio caldo Mueller-Hinton, sendo selecionadas massas das amostras nas quantidades de 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$. Foram adicionadas a estas quantidades a concentração volumétrica de 5 μl de cultura bacteriana a 10^7 UFC/mL, ajustada por meio da densidade de crescimento em cada cultura.

Cada amostra foi homogeneizada 3 vezes junto ao meio de cultura para eliminação de grandes agregados e mantidas em condições de incubação (Edmund Bühler TH-30) sob agitação axial de 115 rpm a $36 \sim 37^\circ\text{C}$, pelo período de 20 horas (*overnight*). Todos os ensaios foram realizados em duplicata para garantir sua total reprodutibilidade e confiabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades estruturais

Os espectros de DRX são apresentados na Figura 1, e conferem resultados que confirmam os dados apresentados na literatura [7, 8] para as ferritas de cobre com a presença de uma fase prata. Na Figura 1 com os ângulos de difração entre 30° e 75° , são indexados os índices cristalográficos (220), (311), (222), (400), (422), (511), (440) e (533) correspondentes aos picos característicos da ferrita de cobre, indicando a estrutura cristalina cúbica de espinélio. Um único pico de difração indicando a presença da fase metálica prata é indexado em $2\theta = 36,8^\circ$, corroborando resultados apresentados na literatura [8, 9].

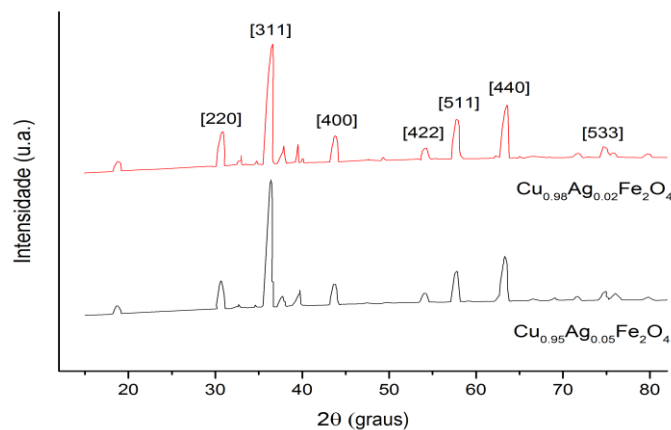


Figura 1. Padrão de difração das ferritas CuAg analisadas

O espaçamento interplanar d_{hkl} foi calculado usando a Lei de Bragg [6] por meio da posição média dos picos de difração, e os parâmetros de rede foram então deduzidos a partir da Eq. (2).

Com o auxílio da equação de Scherrer (1) foi possível ajustar o diâmetro médio de cristalito, resultando em 13 nm para as nanopartículas de cobre 98% e 11 nm para a amostra de cobre 95%.

Na Tabela 2 é feita a análise cristalográfica dos parâmetros fornecidos pelo padrão de difração das estruturas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e as intensidades dos picos experimentais são comparados com valores fornecidos na literatura [7].

Tabela 2. Parâmetros cristalográficos das nanopartículas Cu-Ag analisadas na Fig. 1

$\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$					$\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$					
2θ	hkl	d_{hkl} (Å)	a (nm)	I_{exp}	2θ	hkl	d_{hkl} (Å)	a (nm)	I_{exp}	I_{lit}
30,63	220	2,916	0,825	0,218	30,87	220	2,894	0,818	0,283	0,26
36,42	311	2,464	0,817	1,000	36,63	311	2,451	0,813	1,000	1,00
43,57	400	2,075	0,830	0,189	43,81	400	2,065	0,826	0,249	0,19
54,03	422	1,695	0,831	0,123	54,32	422	1,687	0,826	0,149	-
57,77	511	1,594	0,828	0,291	57,77	511	1,594	0,828	0,384	0,31
63,28	440	1,468	0,831	0,407	63,54	440	1,463	0,827	0,500	0,45
74,92	533	1,266	0,830	0,136	74,69	533	1,269	0,832	0,161	0,11

Uma das possibilidades da redução observada no parâmetro de rede com o aumento da quantidade de prata se deve à compressão da rede do espinélio pela fase metálica de prata formada nos limites da partícula [8, 10]. Tal fator também se reflete no tamanho médio de cristalito observado, que tende a ser estatisticamente menor para maiores distribuições de íons Ag^{2+} , na faixa de $0 < X_{\text{Ag}} < 0,1$.

3.2 Coleta de dados e avaliação das propriedades antibacterianas

A análise dos dados coletados na saída do espectrofotômetro será relevante para se associar o caráter do potencial inibitório das partículas frente às classes de bactérias previamente citadas. As medidas de densidade óptica foram feitas a partir

do espectrofotômetro UV anteriormente citado. A contagem das colônias é utilizada para se determinar a taxa de células viáveis pós contato com as cepas de bactérias. Os resultados das análises semi-quantitativas são elencados na Figura 2.

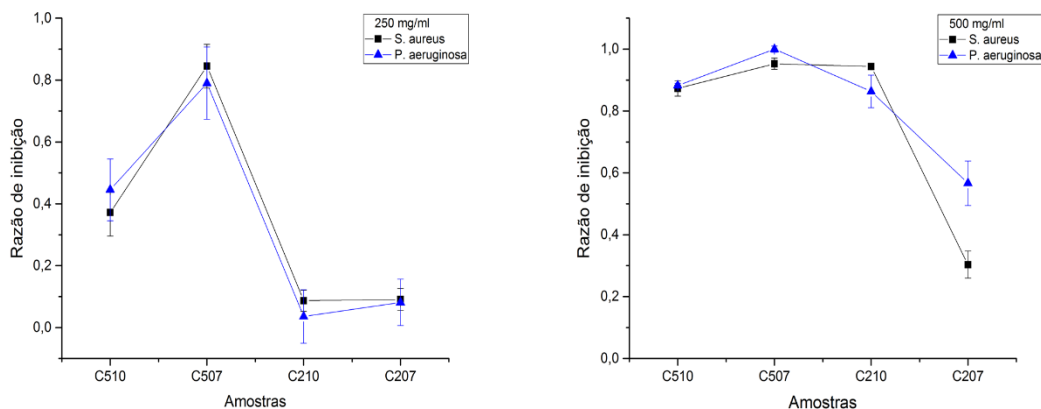


Figura 2. Taxa de inibição das amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507) e $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207) frente às bactérias analisadas (a) 250 µg/mL e (b) em 500 µg/mL

Os gráficos apresentam de forma conclusiva que ao se aumentar a concentração de amostra no meio, maior é o potencial reativo de combate ao crescimento das bactérias. Isso pode ser confirmado pela tendência mais ordenada dos resultados dispostos na Figura 2 entre as duas classes de bactérias utilizadas para o estudo.

Tais resultados indicam que as amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507) atuam contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, com um potencial inibitório médio na faixa de 61% para uma concentração de 250 µg/mL e cerca de 91% para o dobro da concentração amostral anterior. Já com relação à bactéria Gram negativa *P. aeruginosa*, as mesmas amostras atuam com potencial inibitório médio entre 62 - 94%.

As amostras $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207) apresentam taxa de inibição média de 62% para a bactéria *S. aureus* e 71% para as cepas de *P. aeruginosa*, ambas na concentração de 500 µg/mL.

Foram levados à teste ainda as ferritas de cobre (CuFe_2O_4) puro, sem adição da fase prata, constatando que estas não respondem positivamente à interação com os microrganismos, permitindo sua proliferação. Tal fator é forte indicativo que a ação dos íons de prata alocados na rede das nanopartículas possuem clara influência em seus parâmetros antibióticos.

Pode-se ainda avaliar que refinamentos na estequiometria da ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ durante sua síntese indicam a tendência de potencializar o efeito antibacteriano do material nanoparticulado, verificado nas duas concentrações a que foram submetidas as classes de bactérias estudadas, que pode ser conferido pelos aumentos drásticos de ação antibiótica na Figura 2. Esse efeito pode ser entendido pelo aumento da relação de área superficial de contato entre as amostras e os microrganismos, submetendo estes a uma maior quantidade de agente por volume de solução.

Diversos estudos [4, 8-12] mostraram quantitativamente que nanopartículas metálicas possuem características de comportamento antibacteriano dependentes da distribuição e do tamanho dos aglomerados. Desse modo quanto menor o tamanho médio de cristalito, mais permissível seria a ruptura da membrana celular da bactéria acarretando a mortalidade da célula.

4 CONCLUSÃO

Nanopartículas de ferrita de cobre com adição de prata ($\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$, $x = 0,2$ e $0,5$) foram satisfatoriamente sintetizadas pelo método de combustão em solução. Análises obtidas por DRX indicam que as amostras exibem estrutura de espinélio com tamanhos médios de cristalito na faixa de 11 a 13 nm.

A eficácia da ação antibacteriana foi testada contra dois tipos de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e resultados mostraram uma tendência inibitória crescente com adição de íons de prata nos interstícios das ferritas de cobre. Contudo, há de se observar que para maiores concentrações de prata, pode haver redução no efeito bacteriostático [8].

A melhoria na atividade biocida das nanopartículas reside no aumento da área superficial de contato por volume de amostra, possibilitando melhor relação de adsorção na superfície dos organismos.

Nesse aspecto, os dados indicam que a ação da prata como mecanismo carreador torna-se fundamental para a existência de qualquer interação das nanopartículas frente aos microrganismos testados. Demais estudos estão em progresso com objetivo de avaliar a viabilidade de reutilização das partículas pós tratamento através de remoção magnética, além da análise da razão inibitória contra demais microrganismos resistentes.

REFERÊNCIAS

- 1 Raffi M, Mehrwan S, Bhatti TM, Akhter JI, Hameed A, Yawar W, *et al.* Investigations into the bacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli. *Annals of Microbiology*. 2010; 60: 75–80.
- 2 World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva: WHO; 2014.
- 3 Piksová K, Weiserová M, Jedlicková A, Fojtík A. Silver nanoparticles and their bactericidal effect. In: International Conference on Nanomaterials: Research & Application; 2009; Roznov pod Radhostem, República Checa.
- 4 Lin L, Cui H, Zeng G, Chen M, Zhang H, Xu M, *et al.* Ag–CuFe₂O₄ magnetic hollow fibers for recyclable antibacterial materials. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1: 2719–2723.
- 5 Toniolo J, Takimi AS, Andrade MJ, Bonadiman R, Bergmann CP. Synthesis by the solution combustion process and magnetic properties of iron oxide (Fe₃O₄ and α -Fe₂O₃) particles. *Journal of Materials Science*. 2007; 42: 4785–4791.
- 6 Cullity BD. Elements of X-Ray Diffraction. 2nd ed. NY: Addison-Wesley Pub; 1978.
- 7 Depeyrot J, Da Silva GJ, Alves CR, Sousa EC, Magalhães M, Figueiredo Neto AM, *et al.* Static magneto optical birefringence of new electric double layered magnetic fluids. *Brazilian Journal of Physics*. 2001; 31(3): 390–397.
- 8 Xavier S, Cleetus H, Nimila PJ, Thankachan S, Sebastian RM, Mohammed EM. Structural and antibacterial properties of silver substituted cobalt ferrite nanoparticles. In: *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*; 2014.
- 9 Sanpo N, Berndt CC, Wen C, Wang J. Transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 2013; 9: 5830–5837.
- 10 Kooti M, Saiahi S, Motamedi H. Fabrication of silver-coated cobalt ferrite nanocomposite and the study of its antibacterial activity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2013; 333(2):138–143.
- 11 Kumar GR, Kumar KV, Venudhar YC. Synthesis, structural and magnetic properties of copper substituted nickel ferrites by sol-gel method. *Materials Sciences and Applications*. 2012; 3(3):87–91.

- 12 Sanpo N, Wen C, Berndt CC, Wang J. Antibacterial properties of spinel ferrite nanoparticles. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Espanha: Formatex Research Center; 2013; 239-250.
- 13 Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W, *et al.* Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. Nanotechnology. 2007;18(28):1-7.
- 14 Gao M, Sun L, Wang Z, Zhao Y. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. Materials Science and Engineering. 2013; 33(2): 397-404