

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

GABRIEL ALVES GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTÍCULAS DE FERRITA $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$**

Rio de Janeiro

2018

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

GABRIEL ALVES GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTÍCULAS DE FERRITA $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. André Ben-Hur S. Figueiredo - D.C.
Co-orientadora: Prof. Gisela Lara da Costa - D.C.

Rio de Janeiro
2018

c2018

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

620.1 Gomes, Gabriel Alves

G633a Avaliação do potencial antibacteriano de nanopartículas de ferrita $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ / Gabriel Alves Gomes; orientado por André Ben-Hur S. Figueiredo; Gisela Lara da Costa – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2018.

66p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2018.

1. Curso de Ciência dos Materiais – teses e dissertações. 2. Nanopartículas. 3. Ferrita. I. Figueiredo, André Ben-Hur S.. II. Costa, Gisela Lara da. III. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

GABRIEL ALVES GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTÍCULAS DE FERRITA $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. André Ben-Hur da Silva Figueiredo - D.C.

Co-orientadora: Prof. Gisela Lara da Costa - D.C.

Aprovada em 30 de janeiro de 2018 pela seguinte Banca Examinadora:



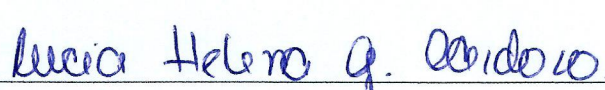
Prof. André Ben-Hur da Silva Figueiredo - D.C. do IME - Presidente



Prof. Gisela Lara da Costa - D.C. da FIOCRUZ



Prof. Alaelson Vieira Gomes - D.C. do IME



Prof. Lucia Helena Guimarães Cardoso - D.C. da ETAM



Prof. Manoel Marques Evangelista de Oliveira - D.C. da FIOCRUZ



Prof. Ricardo Pondé Weber - D.C. do IME



Prof. Sergio Neves Monteiro - Ph.D. do IME

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para que mais esta fase da minha formação se concretizasse.

À minha esposa Roberta Fernanda, aos meus seis pequenos felinos e aos meus familiares, fundamentais para o meu amadurecimento enquanto indivíduo e profissional da área de educação.

Em caráter especial, agradeço imensamente aos meus professores orientadores André Ben-Hur da Silva Figueiredo e Gisela Lara da Costa pelas diretrizes e norteadamentos ao longo do curso. À vocês, queridos professores, sou extremamente grato pelo exemplo de amadurecimento profissional e pelos diálogos enriquecedores, pilares de uma grande amizade formada.

Aos meus professores, em especial àqueles que pude ter a honra de conhecer por meio desta casa, exemplos profissionais e intelectuais que busco seguir cotidianamente.

Às duradouras amizades consolidadas durante o tempo de convivência no Instituto, sobretudo ao grande amigo Gabriel Burlandy Mota de Melo, que tanto auxiliou não somente de forma solícita sempre que fora necessário, mas com a fluidez e leveza das conversas e convivência nesses quatro anos de curso.

Agradeço ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por permitir o uso dos laboratórios e dependências, bem como à toda a equipe de profissionais pelo apoio.

Por último e de fundamental importância, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e ao Instituto Militar de Engenharia pela incrível oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	9
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Justificativa e objetivos do projeto	14
1.2 Aplicações e viabilidade da pesquisa	15
1.3 Originalidade da pesquisa	16
1.4 Organização do trabalho	16
2 SÍNTESE E PROPRIEDADES ESTRUTURAIS	17
2.1 Estrutura Cristalina das Ferritas	17
2.2 Síntese por Combustão Homogênea	19
2.3 Propriedades magnéticas das ferritas	20
2.4 Difração de raios X	21
2.4.1 Fundamentação teórica	22
2.4.2 O método de refinamento de Rietveld	23
2.5 Microscopia eletrônica de varredura	24
2.5.1 Princípios de operação	25
3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	27
3.1 Classificação das bactérias	27
3.1.1 Distribuição e morfologia da célula bacteriana	28
3.1.2 Meios de caracterização das bactérias	29
3.2 Método de difusão em meio semissólido	30
3.3 Método de macrodiluição em tubos	32
3.4 Espectrofotometria no ultravioleta visível (UV/Vis)	33
3.4.1 Fundamentos teóricos	33
3.5 Citometria de fluxo	35
3.5.1 Fundamentos teóricos	35
3.5.2 Princípios operacionais	36

4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Síntese e preparação das amostras	37
4.2	Separação das amostras de ferrita	40
4.3	Caracterização microestrutural	40
4.3.1	Difração de raios X	40
4.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	41
4.4	Testes de sensibilidade a antimicrobianos	41
4.4.1	Processamento das amostras para espectrofotometria UV/Vis	41
4.4.2	Aquisição e análise das amostras por espectrofotometria UV/Vis	42
4.4.3	Processamento das amostras para citometria de fluxo	43
4.4.4	Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1	Propriedades microestruturais	46
5.1.1	Difração de raios X	46
5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura	48
5.2	Propriedades antibacterianas	49
5.2.1	Avaliação da bioatividade por espectrofotometria	49
5.2.2	Avaliação da bioatividade por citometria de fluxo	52
5.2.3	Discussão dos possíveis mecanismos de ação biocida	57
6	CONCLUSÕES	60
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 2.1	Estrutura cúbica compacta de uma ferrita, mostrando o arranjo geométrico os sítios tetraédricos e octaédricos.	17
FIG. 2.2	Geometria de difração θ - 2θ e os planos paralelos de difração em um cristal.	22
FIG. 3.3	Método de difusão ágar-disco do $\text{Co}_{1-x}\text{M}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$	31
FIG. 3.4	(a) Tubos contendo concentração de <i>E. coli</i> antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento com fibras de $\text{Ag-CuFe}_2\text{O}_4$. Imagens de MEV em (b) <i>E. coli</i> e (c) <i>S. aureus</i> após o tratamento antibacteriano.	33
FIG. 3.5	Diagrama esquemático dos componentes de um espectrofotômetro UV/Vis.	34
FIG. 3.6	Diagrama esquemático dos componentes de um citômetro de fluxo comercial.	36
FIG. 4.7	Diagrama esquemático dos materiais para citometria de fluxo com todas as amostras de ferrita, nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$	43
FIG. 4.8	Diagrama esquemático dos materiais para citometria de fluxo com as amostras $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510), nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$	44
FIG. 4.9	Protocolo citofluorimétrico representativo.	44
FIG. 5.1	Padrão de difração da ferrita de cobre CuFe_2O_4	46
FIG. 5.2	Padrão de difração das ferritas (a) $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e (b) $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.	47
FIG. 5.3	MEV das ferritas (a) CuFe_2O_4 , (b) $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e (c) $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.	49
FIG. 5.4	Taxas de inibição das amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C207 e C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C507 e C510) na concentração 250 $\mu\text{g/mL}$ em bactérias (a) Gram positivas e (b) Gram negativas.	50
FIG. 5.5	Taxas de inibição das amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C207 e C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C507 e C510) na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ em bactérias (a) Gram positivas e (b) Gram negativas.	51
FIG. 5.6	Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ contra <i>E. coli</i> em incubação <i>overnight</i> . (a) Células mortas por calor; (b) tratamento com partículas CuFe_2O_4 (C010); (c) e (d) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507); (e) e (f) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207).	53

FIG. 5.7	Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas na concentração 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra <i>E. coli</i> em incubação <i>overnight</i> . (a) Células mortas por calor; (b) tratamento com partículas CuFe_2O_4 (C010); (c) e (d) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507); (e) e (f) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207).	54
FIG. 5.8	Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas contra <i>E. coli</i> em incubação por 1 hora. (a) Células mortas por calor; tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510) na concentração (b) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (c) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210) na concentração (d) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (e) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	56
FIG. 5.9	Representação de um dos mecanismos de ação das nanopartículas frente às bactérias.	58
FIG. 5.10	Solução de bactérias (a) sem nanopartículas e (b) com nanopartículas Cu-Ag após 16h de incubação.	58

LISTA DE TABELAS

TAB. 4.1	Fração das massas aferidas por reagente para a amostra CuFe_2O_4 . . .	38
TAB. 4.2	Fração das massas aferidas para a amostra $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	39
TAB. 4.3	Fração das massas aferidas para a amostra $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	39
TAB. 4.4	Amostras de ferrita cobre-prata avaliadas neste trabalho.	40
TAB. 5.1	Parâmetros estruturais das ferritas Cu-Ag estudadas.	47
TAB. 5.2	Parâmetros cristalográficos das nanopartículas Cu-Ag analisadas. .	48
TAB. 5.3	Número de células após incubação <i>overnight</i> com as nanopartículas.	50

RESUMO

Neste trabalho, nanopartículas de ferrita cobre-prata foram produzidas e aplicadas como material bactericida reciclável. As nanopartículas Cu-Ag foram sintetizadas pelo método de combustão em solução e caracterizadas por difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados de ambos os ensaios foram comparados e obtido um tamanho médio de cristalito de 13 nm e 11 nm e tamanhos médios de partícula entre 69 e 75 nm para as partículas com 2% e 5% de fase prata, respectivamente.

Ensaio *in vitro* foram estabelecidos como meio de avaliação do potencial de interação e da taxa média de inibição em bactérias Gram positivas e Gram negativas, usando o método de macrodiluição em frascos. Análises por absorvância em espectrofotômetro UV-Vis e citometria de fluxo permitiram obter comparações das quantidades relativas de cepas eliminadas ou inibidas através dos mecanismos físicos das amostras, mostrando satisfatória coerência de resultados.

Os resultados obtidos indicaram que a quantidade de íons de prata substituídos nos sítios das ferritas de cobre pode influenciar tanto na estrutura cristalina quanto nas propriedades antibacterianas das ferritas.

ABSTRACT

In this study, copper-silver ferrite nanoparticles were applied as recyclable bactericidal material. Cu-Ag nanoparticles were synthesized by the in-solution combustion method and characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained in both essays were compared and shown a mean crystallite size of 13 nm and 11 nm, and mean particle sizes about 69 and 75 nm with 2% and 5% of silver phase, respectively.

In vitro assays were established as a means of evaluating the interaction potential and mean inhibition rates on Gram positive and Gram negative strains using the macrodilution technique. Absorbance analyses by UV-Vis spectrophotometry and flow cytometry allowed comparisons of the relative amounts of strains eliminated or inhibited through the physical mechanisms, showing satisfactory results.

Results indicated that the amount of silver ions in the copper ferrites influences the crystal microstructure and antibacterial properties of the samples.

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, em 1928, homem e bactéria disputam uma verdadeira corrida contra o tempo (OLIVEIRA, 1994). Com micróbios cada vez mais resistentes aos tratamentos antibióticos disponíveis, estes podem se metamorfosear no ambiente, levando em muitos casos a complicações severas à saúde. Ao longo das décadas esse quadro preocupante se estendeu ao ponto de as infestações alcançarem ambientes cada vez mais amplos, como hospitais e indústrias em geral. 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 (RAFFI et al, 2009). A resistência aos antibióticos é uma consequência natural advinda da capacidade de adaptação dos microrganismos. O uso indiscriminado de produtos antibióticos no simples cotidiano acaba por promover uma alta pressão seletiva, tornando oportuna a exposição das bactérias a esses agentes e, por meio dos processos de seleção, facilitando os mecanismos de resistência celular (FIGUEIREDO, 1995).

Em maio de 2014, a Organização Mundial da Saúde publicou seu primeiro relatório quantificando a ameaça da resistência bacteriana em 114 países. Segundo a organização, a análise desses dados sinalizou uma situação alarmante frente à resistência bacteriana em todas as regiões do mundo (WHO, 2014). De acordo com Raffi et al (2009), tal quadro se configura mais grave ainda quando a imunidade de certos microrganismos 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. Juntamente às bactérias, alguns fungos tornaram-se uma grande ameaça à saúde, em particular em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou em tratamentos médicos agressivos, como quimioterapia (CIOFFI et al, 2005).

Com o amplo conhecimento dos surtos de doenças altamente infecciosas causadas por bactérias patogênicas, e com o crescimento da resistência destas a antibióticos, muitas atenções têm sido direcionadas ao objetivo de criar novas alternativas de agentes antibacterianos, promovendo a interlocução entre diferentes campos científicos (GONG, P.; LI, H., 2007). Visando reverter este quadro, alternativas com materiais nanoestruturados atraíram o foco para estudos aplicados à biomedicina nos últimos anos, o que é notável devido ao grande número de publicações e projetos voltados às suas aplicações.

As nanopartículas de ferrita oferecem vantagens potenciais em diversas áreas biológicas devido às suas propriedades magnéticas aliadas com características biocompatíveis dos óxidos metálicos (GONG et al, 2007). Essas aplicações dependem do

tipo de estrutura das partículas, que por sua vez são influenciadas pelos métodos de preparação, tamanho e morfologia. As propriedades dessas nanoestruturas, quando correlacionadas com suas estabilidades física e química, providenciam ao material vasto alcance em aplicações tecnológicas.

Em um estudo nacional recente, pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais desenvolveram um método de funcionalização de nanopartículas de sílica objetivando a inibição viral em células infectadas. Neste âmbito, a modificação das superfícies das nanopartículas com grupos químicos capazes de atrair as partículas virais e se conectar a elas, é capaz de impedir que o vírus chegue até o alvo, as células, e se ligue a ele, devido a já estar “ocupado” pelas nanopartículas. Com a realização de testes *in vitro* com os vírus HIV e VSV-G, os pesquisadores foram capazes de quantificar as células positivas e negativas frente à exposição ao vírus. Como resultado, as nanopartículas chegaram a reduzir a infecção viral em até 50%, mantendo a morfologia celular e demonstrando a eficiência da estratégia (SILVA et al, 2016).

Tais estudos demonstram que, em termos de controle e prevenção de doenças, investimentos em nanociência e nanotecnologia permitem ampliar possibilidades de respostas frente a questões até então complexas em tratamentos macroscópicos. A grande promessa efetiva dos tratamentos com nanoestruturas metálicas como alternativas viáveis às aplicações em tratamentos antimicrobianos se dá pela alta razão volume-superfície além de suas propriedades físicas e químicas na escala nanométrica. Com isso, existe ainda a capacidade desses materiais de influenciar diretamente na estrutura molecular das células, modificando sua permeabilidade ou rompendo parte de sua membrana pelo processo de deposição dos grupos químicos presentes na amostra.

Embora extremamente vantajoso, o estudo de nanomateriais capazes de promover um combate frente a proliferação microbiana e viral é particularmente recente, considerando o processo de crescimento de novos microrganismos cada vez mais resistentes aos antibióticos até então extremamente eficientes (PIKSOVÁ et al, 2009). Todavia, o uso de óxidos metálicos para contenção de anomalias infecciosas é amplamente difundido na comunidade científica, e a combinação de suas propriedades são amplamente exploradas em aplicações na imagiologia óptica, catálise, biomedicina, produtos de higiene, dentre outros. As nanopartículas de prata há décadas vêm atraindo considerável atenção, sendo utilizadas como agente antibacteriano em amplo espectro devido à sua estabilidade, durabilidade e capacidade de não contribuírem para o desenvolvimento de microrganismos resistentes (KOOTI et al, 2012).

Segundo Rai et al (2009), entre nanomateriais metálicos como cobre, zinco, titânio e ouro, nanopartículas de prata possuem maiores taxas de eficácia antibacteriana. O uso de quantidade dessas nanopartículas caracteriza também um uso particularmente potencial no tratamento de aquíferos usados em procedimentos nosocomiais, frequen-

temente infectados com bactérias altamente resistentes.

Nos próximos capítulos e seções deste trabalho, o objetivo será avaliar e estudar os mecanismos físicos e biológicos da atuação de nanopartículas magnéticas de ferrita prata-cobre $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ como uma inovadora alternativa de material bactericida frente a diversas classes de bactérias. Para isso, grande parte da presente tese versa em torno de estudos comparativos com artigos científicos e publicações de outras naturezas, concernente às aplicações e investigações dos efeitos estruturais das partículas durante o período de exposição às células.

1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO PROJETO

Estudos anteriores reportaram com grande eficácia a relação de produção de nanopartículas metálicas para eliminação ou inibição de células bacterianas em meios sólido ou aquoso. Neste aspecto, a grande vantagem do composto com nanopartículas de prata visa estabelecer uma relação de facilidade na adsorção dos íons Ag^+ com as paredes celulares de cada microrganismo. Os cátions de cobre, por interagirem diretamente com os microporos dessas superfícies celulares, possibilitam ao nanocomposto a liberação de grupos químicos atingindo diretamente o núcleo celular, provocando a resposta assintomática da bactéria responsável pela formação de biofilmes e demais mecanismos de defesa intracelular.

Recentemente, pesquisadores relataram com grande eficiência que nanopartículas de prata (AgNPs), quando sintetizadas a partir de culturas fúngicas *Trichoderma atroviride*, inibem o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* ainda no ciclo de crescimento larval, levando a um controle eficaz (SINGH et al, 2015).

O emprego de nanopartículas magnéticas como agente antimicrobiano é altamente vantajoso pelo fato de serem facilmente manipuladas através da aplicação de um campo magnético externo. Assim, diversos tipos de nanomateriais podem ser levados em consideração (XAVIER et al, 2014; KOOTI et al, 2013). O projeto atual se baseia na extensão dessas viabilidades, buscando ampliar possibilidades de questionamentos acerca da potencialização das nanopartículas de ferrita de cobre no tratamento e prevenção de possíveis processos já não completamente alcançados pelos tratamentos antibióticos usuais.

Em estudos recentes, Lin et al (2013) reportaram a fabricação da ferrita de cobre (CuFe_2O_4) com estrutura fibrilar, de modo a usá-la como carregadores das nanopartículas de prata para aplicações antibacterianas. Foi constatado ainda que a eficácia da atividade bactericida do cobre pôde ser melhorada devido à elevada área de superfície das fibras nas escalas micro e nanométricas, permitindo considerável melhoria no

carregamento de nanopartículas de prata.

Segundo o mesmo estudo, as utilizações de partículas metálicas de prata como agente bactericida são notavelmente conhecidas 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. Um exemplo do atrativo dessas nanopartículas são as aplicações em sistemas purificadores de água, amplamente difundidos na indústria.

1.2 APLICAÇÕES E VIABILIDADE DA PESQUISA

O principal objetivo da pesquisa realizada nesta tese é a formação de nanopartículas magnéticas de ferrita cobre-prata ($\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$) para aplicações em suspensão líquida, objetivando o tratamento de soluções contendo agentes contaminantes. No projeto serão analisadas nanopartículas de ferrita com concentrações de 2% e 5% de íons monovalentes de prata, sintetizadas pelo método de combustão homogênea. Técnicas de análise biocida com nanomateriais derivados de óxidos férricos são amplamente discutidos na literatura, em especial contendo cobre, zinco e cobalto. Ensaaios com a ferrita cobre-prata sintetizada por combustão homogênea são originais e comparações baseadas na literatura foram feitas com algumas considerações relevantes.

Nesse aspecto, Sanpo et al (2013) sugeriram uma abordagem que visa otimizar as propriedades antibacterianas das ferritas, visando aplicações biomédicas. Foi descoberto que a substituição de certa quantidade da ferrita espinelial com um metal de transição pode aumentar a eficiência antibacteriana das nanopartículas. No entanto, as aplicações destas no contexto biológico requerem estudos mais aprofundados tanto de suas propriedades como solução antimicrobiana como de sua biocompatibilidade.

A nanocompósito tratado neste trabalho constitui parte deste processo, podendo ser uma alternativa extremamente eficiente para tratamentos antimicrobianos superficiais, principalmente no que tange à sua reutilização. Por apresentar características predominantemente ferrimagnéticas, ferritas interagem permanentemente com o campo magnético externo aplicado, levando ao recolhimento das partículas em suspensão após sua interação com os microrganismos em áreas específicas. Portanto, uma das principais viabilidades do material se baseia na avaliação da taxa de perda, após recolhimento por separação magnética, e lavagem química, necessários para futuros tratamentos (GONG et al, 2007).

Durante o curso do trabalho pretendeu-se ainda investigar a influência do tamanho médio das partículas na eficiência das propriedades antibacterianas das ferritas. Os

cálculos estequiométricos foram reconsiderados por meio de refinamentos nas concentrações molares dos reagentes.

1.3 ORIGINALIDADE DA PESQUISA

O aspecto original do trabalho se apresenta nas duas fases de desenvolvimento da pesquisa: na síntese das ferritas de cobre e de cobre-prata pelo método de combustão em solução, desenvolvido e aperfeiçoado no Instituto em conjunto com o grupo de pesquisa em materiais nanoestruturados; e na aplicação do material com objetivo de eliminar microrganismos complexos em um meio de controle.

1.4 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido da seguinte forma: no Capítulo 2 é apresentada uma revisão das propriedades, estrutura, além dos métodos de caracterização e preparação das ferritas. Os ensaios de caracterização de bioatividade são apresentados no Capítulo 3, onde se encontra uma extensa revisão da morfologia e distribuição da célula bacteriana. No Capítulo 4 são descritas as etapas de preparação dos materiais utilizados para a síntese e caracterização das ferritas, com o detalhamento do processamento das amostras para os ensaios realizados. No Capítulo 5 são discutidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas de análise, tanto com relação à microestrutura dos materiais quanto em relação às suas aplicações. As considerações finais e conclusões são apresentadas no Capítulo 6 e no Capítulo 7 figuram as sugestões para continuidade do projeto em trabalhos futuros. As referências bibliográficas são mostradas no Capítulo 8.

2 SÍNTESE E PROPRIEDADES ESTRUTURAIS

As ferritas são geralmente compósitos cerâmicos ferrimagnéticos, constituídas por uma mistura de óxidos metálicos, nos quais cerca de 70% de sua composição total é formada por hematita (Fe_2O_3) e os 30% restantes constituído de óxidos de outros metais de transição bivalentes (CALLISTER et al, 2014). Possuem fórmula estrutural geral MFe_2O_4 , em que M representa um íon bivalente, como Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ou Cu^{2+} , oriunda da estrutura do mineral aluminato de magnésio ou espinélio ($\text{Mg}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$). Sua estrutura é classicamente composta por íons bivalentes e trivalentes em um empacotamento de simetria cúbica de face centrada, com 8 moléculas por célula unitária compostas de 32 ânions e 24 cátions, onde os íons de oxigênio ocupam posições em sítios de simetria tetraédrica e octaédrica (CULLITY; GRAHAM, 2009).

2.1 ESTRUTURA CRISTALINA DAS FERRITAS

O arranjo cúbico representado na FIG. 2.1 ilustra as posições dos íons metálicos M^{2+} e Fe^{3+} alocados nos interstícios dos íons de oxigênio, totalizando 96 sítios intersticiais em cada célula unitária, podendo ser classificados em dois tipos: 64 sítios A, onde os íons metálicos se encontram no centro de um tetraedro formado por 4 íons O^{2+} vizinhos (sítio tetraédrico), e 32 sítios B, onde os íons metálicos se encontram no centro de um octaedro cercado por 6 íons O^{2+} (sítio octaédrico). Contudo, devido ao arranjo simétrico da estrutura CFC, apenas 8 sítios tetraédricos e 16 sítios octaédricos são ocupados pelos íons metálicos.

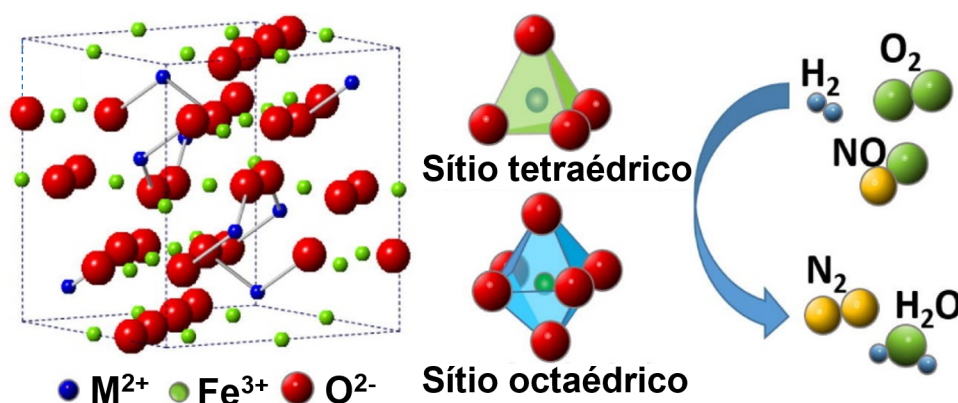
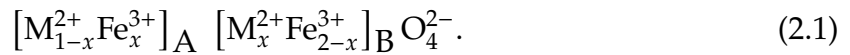


FIG. 2.1: Estrutura cúbica compacta de uma ferrita, mostrando o arranjo geométrico dos sítios tetraédricos e octaédricos.

Fonte: XU et al, 2016.

Ferritas podem ser classificadas de acordo com a configuração da estrutura do tipo espinélio. Existem três configurações possíveis de acordo com a distribuição de cátions entre os sítios tetraédricos e octaédricos: espinélio normal, parcialmente invertido e invertido (SANPO et al, 2013; ASLIBEIKI, 2014). Em ferritas de espinélio normal, sítios A são ocupados por íons metálicos bivalentes (M^{2+}) e sítios B ocupados por íons metálicos trivalentes (Fe^{3+}). Nas ferritas de espinélio invertido, os sítios A são ocupados apenas por íons metálicos trivalentes (Fe^{3+}) e os sítios B ocupados pelo mesmo número de íons metálicos trivalentes e bivalentes (M^{2+}). No caso do espinélio parcialmente invertido, os íons metálicos bivalentes (M^{2+}) e trivalentes (Fe^{3+}) ocupam os sítios A e B em graus de inversão, indicados pelo parâmetro de ocupação x .

Em geral, a distribuição iônica da estrutura espinélio nas ferritas pode ser escrita como



onde o primeiro termo representa distribuição de cátions nos sítios tetraédricos (A), o segundo termo nos sítios octaédricos (B) e x é o parâmetro de ocupação dos sítios pelos íons metálicos.

Dessa forma, quando o parâmetro $x = 0$, tem-se na EQ. 2.2 o caso de espinélio normal e para $x = 1$ é apresentado na EQ. 2.3 a estrutura de espinélio invertido.



Quando o parâmetro de ocupação for intermediário ($0 < x < 1$), dependendo da distribuição catiônica do material, a estrutura formada será o espinélio parcialmente invertido, representado pela EQ. 2.1.

Em escala nanométrica, a ferrita de cobre geralmente apresenta estrutura do tipo espinélio invertido. Contudo, em um estudo pioneiro, Prince e Treuting (1956) mostraram que quando aquecida a uma temperatura acima de 760°C seguida por um rápido resfriamento até a temperatura ambiente, as amostras apresentavam uma distorção na estrutura do espinélio, formando uma estrutura tetragonal de face centrada.

Com amplas possibilidades de simetria estrutural, as ferritas podem ser naturais e encontradas em certos minerais, ou produzidas artificialmente em laboratórios de pesquisa. Esses materiais vêm a ser de extrema importância devido à singularidade de suas propriedades óticas, elétricas e magnéticas. Embora ferritas sejam compostas por uma mistura de óxidos, suas características elétricas e magnéticas derivam dos metais que a compõem. Apresentam em geral grande permeabilidade, alta saturação de magnetização e alta anisotropia magnetocristalina (KUMAR et al, 2011; MURTHY et al, 2010).

Entre as alternativas de materiais magnéticos, ferritas costumam ser particularmente atrativas para aplicações físicas e biológicas devido às suas estabilidades química e térmica, garantidas pela estrutura cristalina cúbica. Contudo, as distintas propriedades dessas nanopartículas em aplicações biológicas requerem um controle preciso de tamanho de partícula, morfologia, dispersão, além do estudo cuidadoso de quaisquer fatores externos que possam influenciar nessas propriedades (WEN et al, 2012).

2.2 SÍNTESE POR COMBUSTÃO HOMOGÊNEA

São conhecidos diversos métodos físicos e químicos para a síntese de nanopartículas que, dependendo das propriedades que se desejam investigar, oferecerão resultados mais precisos. Entre esses métodos se encontram, por exemplo, as técnicas por coprecipitação, microemulsão, sol-gel, combustão e outras (SANPO et al, 2013).

Entre as técnicas possíveis para se preparar um nanocompósito, a síntese por auto-propagação em altas temperaturas (SCS) é um método usual quando se deseja obter materiais derivados de compostos intermetálicos. A técnica consiste em um processo autossustentado, que ocorre independentemente de fontes de aquecimento externas. O início da reação química geralmente é guiado através da mistura dos óxidos com um catalisador da reação, havendo, neste ponto, dois métodos de aquecimento distintos.

O primeiro método consiste no aquecimento ideal de apenas um pequeno volume da amostra, resultando na iniciação local de uma reação exotérmica de auto propagação para outras regiões da amostra na forma de uma onda de combustão. O rápido aquecimento é requerido de modo a assegurar que não haja tempo para que o calor gerado na área local da ignição se espalhe a outras áreas próximas, fato que poderia criar uma distribuição de temperatura irregular no material. Por consequência, caso a temperatura não seja uniforme, os produtos da síntese podem variar ao longo do volume (ROGACHEV et al, 2015). Uma grande vantagem desse método consiste no fato de as amostras tenderem a apresentar menor diâmetro médio com relação a outras técnicas de combustão.

O segundo método de ignição consiste em um lento aquecimento, de modo que a temperatura tenha tempo para se igualar em todo o volume. Neste caso a reação se desenvolverá simultaneamente e uniformemente em todos os pontos da amostra e, a uma temperatura específica, deve-se observar uma forte aceleração do processo, culminando na autoignição em todas as regiões do volume. Esse método é chamado de combustão volumétrica ou explosão térmica, ou, ainda mais geralmente, combustão homogênea. Esta técnica é muito comum em sinterizações de materiais em formato de pó, e constitui o processo base utilizado no presente trabalho.

As principais vantagens da síntese por combustão homogênea residem em sua extrema viabilidade por ser de fácil acesso e relativamente simples, visto que não requer elaborada preparação dos compostos químicos envolvidos, nem longos períodos de tempo até a obtenção do material final. A principal desvantagem é a falta de controle sobre a homogeneidade de composição da amostra.

Apesar disso, relativa homogeneização pode ser alcançada devido ao sistema em solução ser misturado em proporções estequiométricas, permitindo que a difusão seja então limitada à quantidade de líquido antes do processo de secagem (combustão). O sucesso do processo em si é devido à forte ligação entre os componentes, que utilizam um agente complexante (como ácido cítrico, uréia e glicina) em meio aquoso, levando a uma reação redox exotérmica entre o combustível e o agente oxidante (TONIOLO et al, 2007).

O procedimento executado neste trabalho consiste em submeter uma solução, formada por nitratos metálicos e glicina ($C_2H_5NO_2$) diluídos em água deionizada, ao aquecimento em $100^\circ C$ até que a reação de combustão ocorra homoganeamente em todo o volume de solução. Durante o processo, a temperatura de combustão atinge valores acima de $1300^\circ C$, podendo chegar, no ponto de pico exotérmico, a $2000^\circ C$ (FIGUEIREDO, 2007).

2.3 PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS FERRITAS

Nas substâncias magnéticas permanentes, os momentos magnéticos de seus átomos tendem naturalmente a se alinharem sob suas mútuas interações. Nesse contexto, as ferritas possuem propriedades magnéticas que dependem da orientação e das interações entre os spins eletrônicos dos metais que a compõem, induzindo um momento de spin total dado pelos íons metálicos (cátions). As interações de troca entre os átomos de um sólido metálico tendem a formar regiões de alinhamento dos spins, chamados de domínios magnéticos, conduzindo a um alinhamento paralelo dos spins eletrônicos, em interações do tipo ferromagnético, ou antiparalelo, nas interações de ordem antiferromagnética (GOMES, 2007).

Entretanto, nos óxidos do tipo espinélio, os íons metálicos sempre possuem um átomo de oxigênio (ânion) como vizinho, fazendo com que as interações de troca só sejam possíveis por meio dos elétrons do oxigênio. Essa interação dos spins dos cátions com um ânion intermediário é chamada de supertroca. As interações de supertroca podem se dar através das correspondências dos spins dos cátions situados em sítios de mesma simetria (chamadas interações AA e BB), bem como entre spins dos cátions em sítios de simetrias distintas (interações AB), o que favorece o alinhamento antiparalelo

dos spins, produzindo uma magnetização total nula e conduzindo a uma ordem anti-ferromagnética (CULLITY, GRAHAM, 2009). Contudo, nas ferritas, devido à diferença entre o número de cátions situados nos dois sítios, os momentos magnéticos atômicos em uma direção são diferentes dos orientados na direção oposta, não permitindo com que os spins se cancelem por completo e fazendo com que esses materiais apresentem uma magnetização total diferente de zero. Esse comportamento é chamado de ferrimagnético (ALONSO, FINN, 2015).

Outra característica interessante dos óxidos magnéticos é o alinhamento preferencial dos spins na direção de um campo magnético externo aplicado. Supondo um campo H aplicado sobre um material inicialmente desmagnetizado, o número de spins alinhados na direção do campo tenderá a aumentar, levando ao crescimento da densidade de fluxo magnético B do material

$$B = \mu_0(H + M) \quad (2.4)$$

onde M é a magnetização e μ_0 é a permeabilidade do vácuo ($\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{H/m}$).

2.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A difração de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização conhecidas e amplamente utilizada para investigação em materiais cristalinos, resultando em informações importantes sobre natureza do material, tais como estrutura cristalina, determinação do tamanho de cristalito, orientação na rede, densidade e fases presentes no material. A técnica é baseada na interação da radiação eletromagnética com a estrutura cristalina, onde as dimensões do espaçamento interatômico (da ordem de 10^{-10} m ou 1 Å) se assemelham aos comprimentos de onda da radiação incidente.

Dessa forma, a incidência de um feixe de radiação monocromática na amostra produzirá um padrão de linhas espectrais, chamado de padrão de difração, que resulta em um gráfico da intensidade (geralmente medida em contagens de fótons por segundo) em função da posição angular. Para amostras policristalinas utilizadas em formato de pó, a geometria mais utilizada é a de Bragg-Brentano, onde a radiação monocromática incide em uma amostra descrevendo um ângulo θ enquanto os dados são coletados por um detector que varia em 2θ . As informações referentes à qualidade da amostra e suas propriedades cristalográficas são obtidas a partir da análise das intensidades e largura dos picos de difração gerados pelas interações do feixe com os elétrons do material (GOMES, 2007).

2.4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Quando raios X passam através de um cristal, a intensidade dos raios espalhados ou difratados é resultado da interferência, ao longo da direção de observação, das ondas emitidas por cada átomo ou molécula. O arranjo tridimensional da rede cristalina distribui os centros de difração ao longo do espaço, o que faz com que um feixe sofra interferência construtiva em ângulos de difração 2θ . A lei de Bragg estabelece a relação entre o comprimento de onda λ da radiação e as distâncias interplanares d_{hkl} da estrutura

$$2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda \quad (2.5)$$

onde n corresponde à diferença de fase ou ordem da interferência.

Os valores de n são limitados pela condição $\sin\theta < 1$. Pela geometria mostrada na FIG. 2.2, para raios como 1 e 2, espalhados por átomos no mesmo plano, a diferença de fase é nula ($n = 0$) e interferem construtivamente para qualquer ângulo θ de incidência.

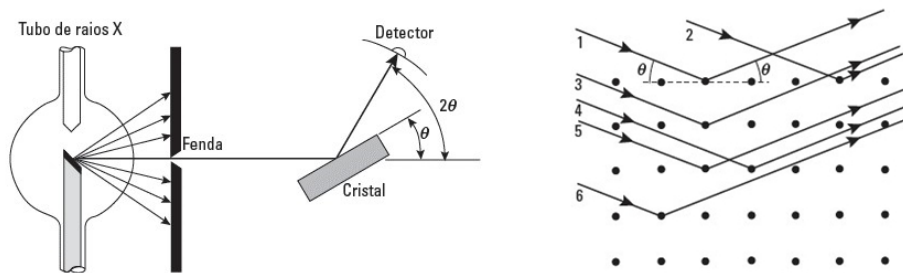


FIG. 2.2: Geometria de difração θ - 2θ e os planos paralelos de difração em um cristal.
Fonte: ALONSO, 2015.

Por extensão, raios oriundos de planos sucessivos, interferem construtivamente em reflexões de ordem superior dando origem a um máximo muito intenso. Dessa forma, a condição de Bragg expressa um tipo de efeito coletivo, no qual os raios espalhados por todos os átomos em certos planos paralelos interferem construtivamente. Para planos com equidistantes, a mudança do ângulo de incidência produz alternadamente posições de intensidade máxima e mínima, correspondendo à interferência construtiva ou destrutiva (ALONSO, FINN, 2015).

Em cristais de simetria cúbica, como as ferritas com estrutura de espinélio, a distância interplanar pode ser calculada diretamente por meio da EQ. 2.5 com $n = 1$, ou por meio de uma relação com os índices de Miller

$$d_{hkl} = \frac{a}{(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}}. \quad (2.6)$$

Combinando ambas as equações, vem que

$$\text{sen } \theta = \frac{\lambda}{2a} (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}. \quad (2.7)$$

Conhecendo o comprimento de onda particular incidente, essa equação permite calcular todos os ângulos de Bragg possíveis para um cristal cúbico ou ainda determinar o parâmetro de rede a da estrutura cristalina.

Quando o cristal é composto por mais do que uma classe de átomos, cada tipo de átomo contribui de um modo diferente para o espalhamento da radiação. Considerando um cristal como sendo uma repetição de uma base, a amplitude do espalhamento resultante pelo plano hkl é chamado de fator de estrutura, que descreve o modo com que o arranjo atômico afeta o feixe espalhado (CULLITY, 2001). Esse fator pode ser obtido pela junção de todas as ondas espalhadas por átomos individuais,

$$F_{hkl} = \sum_{n=1}^N f_n e^{2\pi i(hu_n + kv_n + lw_n)} \quad (2.8)$$

onde a soma se estende até o n -ésimo átomo do plano, u , v e w são as coordenadas do n -ésimo átomo e f_n representa seu fator de espalhamento.

A intensidade difratada por um cristal simétrico em seu arranjo cristalográfico, corresponde a um alargamento do pico de difração na medida que suas dimensões são reduzidas. Essa relação foi primeiramente observada por Scherrer em 1918, e conduz à chamada fórmula de Scherrer (EQ. 2.9) que calcula o tamanho médio dos cristalitos em uma amostra a partir de medidas de difração de raios X baseando-se na largura dos picos característicos de difração:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2.9)$$

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 (pico de Bragg). O parâmetro K é chamado de fator de correção ($0,7 \leq K \leq 1,7$) que depende da forma da partícula, dos índices cristalográficos dos planos refletores, da definição particular para a largura do feixe e a relativa à dimensão da partícula. No caso de partículas aproximadamente esféricas, como as ferritas analisadas aqui, o valor adotado para a constante é $K = 0,9$.

2.4.2 O MÉTODO DE REFINAMENTO DE RIETVELD

O método de Rietveld, publicado em 1969 inicialmente para o estudo de difração de nêutrons, utiliza um modelo matemático para o refinamento de estruturas cristalinas,

analisando os dados de padrões de difração gerados. O princípio básico do refinamento consiste em ajustar uma curva teórica aos picos do difratograma experimental, minimizando a diferença entre o padrão de pontos experimentais e o padrão de pontos calculados. O tratamento desses dados possibilita obter informações quantitativas e qualitativas com ótima precisão e confiabilidade na determinação de parâmetros de rede, tamanho médio de cristalitos, além da análise quantitativa de amostras polifásicas (MELO, 2017).

Existem diversos softwares que possibilitam compilar os dados coletados e efetuar os cálculos dos parâmetros da amostra analisada, como o HighScore da PanAlytical, utilizado neste trabalho. No método de Rietveld, a intensidade teórica calculada de uma fase é determinada pelo somatório sobre todas as fases cristalinas presentes no difratograma

$$I_i^c = I_i^b + S \sum_k L_k P_k F_k^2 \varphi A(2\theta_i - 2\theta_k) \quad (2.10)$$

onde I_i^c e I_i^b são as intensidades respectivas do pico e da radiação de fundo calculadas na i -ésima interação, S representa o fator de escala, L_k , P_k e F_k são respectivamente o fator Lorentz-polarização, a função de orientação preferencial e o fator de estrutura, φ é a função do perfil do pico, A é o fator de absorção, $2\theta_i$ e $2\theta_k$ são as posições do pico na i -ésima interação e na k -ésima reflexão de Bragg.

Um indicador importante, e que certamente afere a confiabilidade do refinamento, é o fator de qualidade χ^2 chamado de *goodness of fit* (e comumente abreviado por GOF), consistindo em uma distribuição estatística que busca avaliar quantitativamente a qualidade do ajuste. Este tipo de distribuição é frequentemente utilizado para se estipular a relação entre um resultado experimental observado e a distribuição esperada ou teórica das variáveis analisadas, e é apresentado na EQ. 2.11

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad (2.11)$$

onde O_i e E_i correspondem, respectivamente, à distribuição experimental observada e ao total de variáveis teóricas esperadas para o intervalo $i = 1, 2, \dots, n$.

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em qualquer área da ciência que necessite avaliar rápida e graficamente a estrutura de compostos sintéticos ou biológicos

com precisão incomparável aos instrumentos ópticos usuais.

Com isso, o microscópio eletrônico se consolida como um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise, em alta resolução, de características microestruturais de objetos sólidos. Aparelhos modernos, como o Thermo Scientific Quanta FEG utilizado neste trabalho, permitem aumentos da ordem de 10^5 vezes para grande parte dos materiais sólidos, o que conserva a profundidade de campo muitas vezes essencial para a observação de superfícies irregulares.

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto de sua grande profundidade de campo. Permite também o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, de extrema utilidade para se complementar as informações dadas pela imagem óptica.

2.5.1 PRINCÍPIOS DE OPERAÇÃO

O princípio operacional de um MEV consiste na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro visando explorar a superfície da amostra por linhas sucessivas, transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica ajustada à varredura do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação.

A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento aquecido de tungstênio ou hexaboreto de lantânio, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. Essa fonte de partículas, ou canhão de emissão de campo (*field emission gun*, FEG), aquece o filamento causando uma emissão termiônica dos elétrons. O feixe é então acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o anodo, sendo então direcionado sobre os pontos de análise da amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas. Ao interagir com a amostra, o feixe produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em sinal captado por um sistema de aquisição de vídeo.

Ao incidir na amostra, o feixe primário direciona parte dos elétrons que se difundem, constituindo um volume de interação que depende principalmente da tensão de aceleração e do peso atômico da amostra. Neste volume, as partículas produzidas são utilizadas na formação das imagens e nas análises físico-químicas. Para serem detectadas, tais partículas, resultantes da interação do feixe eletrônico com a amostra, devem retornar à superfície do material e então atingirem o detector. A energia com que a radiação atingirá o detector irá fornecer parâmetros como a resolução espacial, que limita a profundidade máxima de detecção das partículas através da captura eletrônica.

Todavia, a imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície poderá apresentar diferentes características, tendo em vista que a visualização gráfica irá resultar da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Assim, dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários (*secondary electrons*, SE) ou dos elétrons retroespalhados (*backscattered electrons*, BSE).

Os elétrons secundários são gerados como produtos da ionização provocada pela interação da radiação primária com o material da amostra. São partículas de baixa energia (menores que 50 eV), formam imagens com alta resolução, na faixa de 3 a 5 nm e possuem um livre caminho médio de 2 a 20 nm. Já os elétrons retroespalhados resultam das interações ocorridas no interior da amostra e são provenientes de uma região do volume de interação que abrange um diâmetro maior que o do feixe primário. Os detectores de BSE operam em faixas de energia mais altas, tendo em vista que esses elétrons são mais energéticos e fornecem informações em relação ao contraste, como uma melhor determinação do relevo (imagem topográfica) ou a análise dos elementos presentes na amostra (imagem de composição).

Um efeito interessante observado na análise de partículas magnéticas, sugere que quando o número de elétrons incidentes é maior do que o número de elétrons que escapam da amostra, forma-se um poço de carga negativa no ponto em que o feixe atinge a amostra, provocando uma série de efeitos indesejados tais como contraste anormal, deformação da imagem e movimento. Esse efeito de carregamento é originado pela grande acumulação de elétrons na amostra, devido tanto aos efeitos de ionização quando à exposição da amostra ao feixe. Como o nível de carga é relacionado com a energia dos elétrons e o fluxo de elétrons por região da amostra, efeitos como este podem ser evitados com procedimentos relativamente simples, como a redução da tensão de operação ou a diminuição das condições de vácuo.

3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A determinação da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos constitui fator essencial para o êxito no gerenciamento das infecções bacterianas e para análise comparativa de agentes antimicrobianos. A eficácia dos antibióticos pode ser avaliada pela sua capacidade de suprimir o crescimento das bactérias (efeito bacteriostático) ou pela capacidade plena de eliminá-las (BONEV et al, 2008). O teste de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) é geralmente o método padrão utilizado nas análises de sensibilidade a antibióticos, já que permite obter informações pertinentes com o uso de dosagens mínimas. A CIM irá fornecer a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, sendo geralmente expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Como formas de investigação da atividade biocida das partículas estudadas, podem ser realizadas diversas metodologias, sendo a escolha adequada à necessidade de se obter resultados mais precisos numericamente ou mais visualmente interpretáveis e, portanto, imediatos. Neste capítulo serão abordados três métodos tradicionalmente utilizados, de difusão em meio semissólido, que oferece resultados essencialmente qualitativos, espectrofotometria, que constitui método semi-quantitativo para a análise de efeito antibiótico, e espectroscopia citofluorimétrica, onde a bioatividade pode ser quantitativamente analisada.

Como bactérias são organismos complexos, torna-se necessário entender seus mecanismos de síntese de nutrientes e sua estrutura celular de modo a melhor compreender os possíveis efeitos induzidos pelos materiais biocidas. Nas seções a seguir serão apresentadas as principais formas de identificação das bactérias, sendo detalhadamente discutidas as particularidades dos testes de bioatividade em cada caso.

3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Bactérias (do grego *bakterion*, significando bastão) são agrupamentos de microrganismos unicelulares e procariontes, que estão entre as formas mais simples de vida conhecidas e, portanto, possuem características comuns tanto a espécies de plantas quanto animais. São amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas no solo, ar, água, alimentos, na matéria em decomposição, na superfície do corpo, no interior do trato intestinal animal etc., estando entre os organismos mais antigos, com evidência encontrada em rochas de 3,8 bilhões de anos (CRAPEZ, 2002). Como alterações nas condições ambientais produzem mudanças na flora bacteriana, a ocorrência comum de uma espécie em determinada região depende da flora natural desse ambiente

particular.

O ambiente aquático contém, em grande parte, alta quantidade de organismos bacterianos. Os números podem variar significativamente dependendo da fonte da água, por exemplo, de poços profundos ou rasos, fontes, rios, lagos, lagoas, córregos etc. A água poluída com esgoto pode conter milhões de organismos por centímetro cúbico, com algumas espécies constantemente presentes e constituindo a flora natural dessa água. Geralmente, menos espécies de bactérias se reproduzem no mar com relação ao solo, o que pode ser explicado pelas pobres qualidades da água salgada como meio de cultura (FAIRBROTHER, TAYLOR, 1962).

Muitas doenças causadas por bactérias possuem origem em uma falha de adaptação dos organismos ao ambiente. Organismos bem-adaptados podem levar a patologias sob condições especiais - por exemplo, quando presentes em grandes e incomuns proporções, se as defesas do hospedeiro forem deficientes (como nos casos de AIDS e tratamento quimioterápico) ou se existirem condições anaeróbicas. Contudo, cabe ressaltar que as bactérias patogênicas constituem apenas uma pequena proporção de espécies bacterianas. Muitas bactérias não patogênicas são benéficas e úteis na melhoria da qualidade de vida humana, essenciais para a flora intestinal e produção da vitamina K, além de participar de processos essenciais como fixação de nitrogênio, quebra de resíduos, produção de alimentos, preparação de medicamentos e biorremediação ambiental (ROHILL, 2010).

Na flora ambiental, os processos promovidos pelas bactérias são ainda mais cruciais. Restos de plantas, folhas e frutos incididos sobre o solo, são convertidos em compostos solúveis pelos organismos ali presentes e disponibilizado para o crescimento de novas plantas. Enxofre e fósforo, dois elementos necessários para o crescimento vegetal, também são transformados em compostos inorgânicos solúveis por meio da atividade dos organismos e absorvidos pelas raízes das plantas. No tratamento de esgoto, bactérias são fundamentais na conversão das proteínas insolúveis, gorduras e carboidratos, em compostos inodoros solúveis, que podem ser descartados de forma inofensiva no ambiente (SALLE, 1943).

3.1.1 DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DA CÉLULA BACTERIANA

Organismos unicelulares geralmente são encontrados de forma isolada ou em colônias, que podem diferir com relação ao ambiente natural ou laboratorial. Na natureza, as bactérias geralmente são encontradas interagindo com outros microrganismos e sempre interagem com seu ambiente físico-químico. Essas condições são usualmente muito diferentes das utilizadas em laboratório para cultivar organismos em culturas puras (ZINDER, SALYERS, 2001). Esses organismos podem viver na presença de ar

(chamadas aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias) ou ainda ser anaeróbias facultativas (CRAPEZ, 2002).

As células bacterianas possuem dimensões micrométricas, variando em tamanhos que vão de células grandes, como *Bacillus anthracis* (3 a 10 μm), a células diminutas, como *Pasteurella tularensis* (0,2 a 0,7 μm). Possuem formas características, podendo ser classificadas morfológicamente de acordo com a forma da célula e o grau de agregação.

Morfologias microscópicas comuns são: a) cocos (células redondas ou elipsoidais), como *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus*, respectivamente; b) bastões ou hastes, como *Bacillus* e espécies de *Clostridium*; c) longas e filamentosas células ramificadas, como espécies de *Actinomyces*; e d) células em forma de vírgula e espirais, como *Vibrio cholerae* e *Treponema pallidum*, respectivamente (SALLE, 1943).

3.1.2 MEIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Bactérias são organismos quase incolores e, portanto, difíceis de se observar em leituras microscópicas cotidianas. Um grande problema com a observação microscópica de células procariontes é que estas, com certas exceções, são morfológicamente indistinguíveis aos olhos humanos, portanto impossíveis de identificar macroscopicamente mesmo com os poderosos recursos da microscopia eletrônica (ZINDER, SALYERS, 2001). Um dos métodos mais viáveis para se identificar diferentes populações de organismos é através da marcação das colônias, sendo fundamental para revelar sua estrutura e fornecendo a base para a classificação de muitos organismos.

Quando bactérias são marcadas com certas substâncias corantes, como o violeta de genciana (cloreto de pararosanilina), e posteriormente tratadas com iodo, algumas espécies podem ser facilmente descoloradas com solventes orgânicos, como etanol ou acetona, enquanto outras resistem à descoloração. Essas características foram observadas primeiramente por Hans Christian Joachim Gram (1853-1938), bacteriologista dinamarquês, no final do século XIX.

O princípio descritivo chamado de coloração de Gram fornece a classificação dos diferentes grupos de bactérias. Embora o pesquisador dinamarquês tenha falhado ao reconhecer o valor taxonômico do seu procedimento de caracterização por coloração, até o final do século XIX já havia sido percebido que as características de coloração se correlacionavam com importantes características fisiológicas e químicas da célula. Atualmente, o método de reação de Gram ainda é tratado com importância fundamental na classificação e identificação das diferentes classes de bactérias, e constitui um dos métodos de identificação mais importantes na bacteriologia (CLAUS, 1992).

Através da adição de contra corantes (safranina ou fucsina) torna-se possível uma análise precisa dos microrganismos presentes no meio. A partir desse método de

classificação, dois grupos principais podem ser reconhecidos: Gram-positivo e Gram-negativo. As diferenças entre essas bactérias residem na densidade da membrana celular dos microrganismos, responsável pela sintetização de nutrientes, e na estrutura da parede celular da bactéria. Assim, se a estrutura celular for simples, a coloração indicará o grupo positivo, ao passo que, quando estruturalmente complexa, a coloração retribuirá o grupo negativo.

A principal característica das bactérias Gram-negativas consiste em sua membrana plasmática ser estruturada em dupla camada, formada por uma membrana interna rica em fosfolipídios e uma membrana externa rica em fosfolipídios e lipopolisacarídeos (LPS). Vários grupos de proteínas estão associados a essas membranas, como as porinas, associadas à membrana externa, a qual permite a passagem de nutrientes, as lipoproteínas, associadas a também a membrana externa por uma calda lipídica na subunidade N-terminal, as proteínas integrais, que atravessam a membrana externa em várias regiões, as periplasmáticas e as associadas à membrana interna, envolvidas com ligação a ATPs, transporte de íons e pequenas moléculas (COSTA, 2013). Por outro lado, bactérias Gram-positivas são estruturalmente mais simples e possuem composição singular da parede celular, o que indica maior susceptibilidade à toxicidade com aditivos químicos e destruição da parede celular, permitindo a entrada de antibióticos através da célula.

Estas diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são características determinantes na resistência ou susceptibilidade à entrada de um determinado antibiótico no interior da célula. Em comparação com as Gram-positivas, bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos tratamentos antibióticos devido à possibilidade de a parede celular ser de 40% a 100% mais densa. Essas bactérias produzem uma variedade de polissacarídeos, que podem formar barreiras físicas, como os biofilmes, fortalecendo a resposta imunológica.

3.2 MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SEMISSÓLIDO

A técnica de disco-difusão em ágar é comumente utilizada para a determinação da CIM em meios sólidos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia.

Este método tradicionalmente envolve a aplicação de soluções antibióticas de diferentes concentrações em finos discos de papel colocados na superfície de placas de ágar contendo a população teste de bactérias. A difusão do material antibiótico para o meio ágar conduz à inibição do crescimento bacteriano nas vizinhanças da fonte levando à formação de zonas de inibição, onde não haverá presença das bactérias.

Na FIG. 3.3 é mostrado um exemplo desse ensaio, onde a ferrita de cobalto $\text{Co}_{1-x}\text{M}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ é dopada com diferentes metais de transição, quantificando seu efeito antibiótico pela reação com a bactéria *Escherichia coli*.

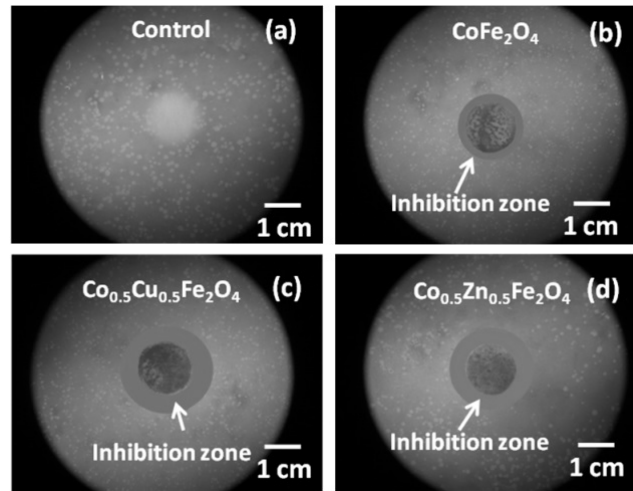


FIG. 3.3: Método de difusão ágar-disco do $\text{Co}_{1-x}\text{M}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$.
Fonte: SANPO et al, 2013.

Nesse caso, resultados de concentração inibitória mínima podem ser estimados através do aumento dessas zonas de contato, à medida que se aumenta a concentração do material. Os diâmetros dos halos de inibição podem ser relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e velocidade da difusão do antimicrobiano no meio ágar. Essa análise se baseia na solução da equação diferencial de difusão em uma dimensão,

$$D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} - \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = 0 \quad (3.1)$$

sendo D o coeficiente de difusão e $\partial c / \partial x$ o gradiente de concentração de antibióticos na fonte de material.

Em estudo complementar, Bonev et al (2008) propuseram uma ligeira modificação da equação de livre difusão em uma dimensão ao considerar a difusão em amostras de alguns bactericidas naturais, observando a possibilidade desses antibióticos difundirem no meio ágar de forma mais lenta do que previsto teoricamente pela EQ. 3.1. Nesse modelo, considerou-se que algumas das moléculas dos antibióticos poderiam interagir com a matriz de difusão ou serem perdidas através de outro mecanismo de dissipação, o que levou à necessidade de se introduzir um termo de dissipação na equação principal, tornando-se

$$D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} + V \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} - \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = 0 \quad (3.2)$$

sendo V o coeficiente característico da taxa de dissipação.

Dessa forma, a aproximação da difusão para a variação espacial mostra o processo como decaimento exponencial, que pode ser descrito para o caso de um meio semi-infinito,

$$\ln(c) = \ln(c_m) + (2D)^{-1} \left(V \pm \sqrt{V^2 - 4D} \right) x \quad (3.3)$$

onde c representa a dependência espacial da concentração e c_m caracteriza a mínima concentração inibitória desde a fonte.

O resultado da EQ. 3.3 define a redução exponencial da quantidade de material relacionada à concentração de cepas inicialmente no volume de controle. Em resumo, quando o termo de dissipação $V^2 \gg 4D$, observa-se um decréscimo exponencial relacionado à taxa de variação da concentração com a distância. Já nas vizinhanças de $V^2 = 4D$, a solução da equação da difusão sugere que o termo de dissipação seja suprimido, obtendo a solução definida pela equação da difusão livre.

A interpretação dos resultados de difusão e consequente formação das regiões de inibição são estabelecidas para cada bactéria testada. Os diâmetros dessas regiões podem ser correlacionados aos valores logarítmicos da CIM, onde os halos de inibição serão inversamente proporcionais à CIM do antimicrobiano. Desta forma, as bactérias podem ser categorizadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias (ANVISA, 2004).

Em muitos estudos e situações clínicas cotidianas, o teste qualitativo abrange grande parte das expectativas na solução de resultados e orientações por ser de rápida recorrência e fácil interpretação, não necessitando de equipamentos sofisticados. Contudo, em situações em que há necessidade de maior acurácia na quantificação da resposta inibitória do material antimicrobiano deve-se recorrer a métodos quantitativos, conforme será abordado nas seções seguintes.

3.3 MÉTODO DE MACRODILUIÇÃO EM TUBOS

Uma das primeiras técnicas a ser utilizada para avaliação da sensibilidade aos agentes antimicrobianos consiste na preparação de diluições seriadas de material antibiótico em meio de crescimento líquido.

As etapas de realização do ensaio consistem na preparação de soluções com a concentração de antimicrobianos juntamente do meio de cultura, inoculação dos tubos contendo os antimicrobianos com a suspensão bacteriana (entre 10^5 e 10^8 UFC/ml) e avaliação do crescimento bacteriano analisado após o período de incubação. Nessa última etapa a análise pode ser conduzida pela turbidez aparente da solução.

Segundo reportado por Lin et al (2013), fibras nanométricas de $\text{Ag-CuFe}_2\text{O}_4$ inibiram o crescimento de bactérias quando dispostas na concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após o tratamento é possível observar a mudança na coloração da solução, acompanhada pela sedimentação das bactérias eliminadas.

A quantificação de bactérias inibidas ou mortas após o contato com as partículas pode ser feita pela análise de densidade óptica/espectro de absorbância na faixa UV.

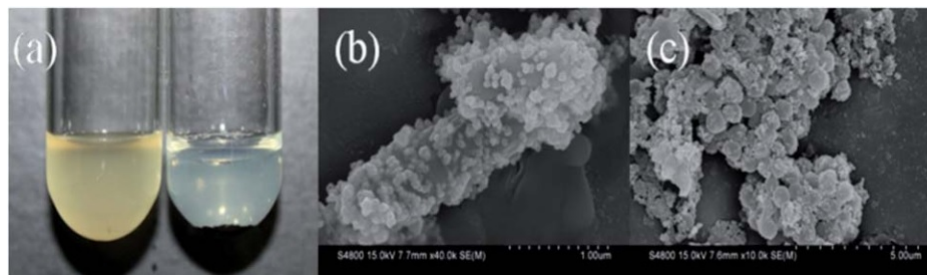


FIG. 3.4: (a) Tubos contendo concentração de *E. coli* antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento com fibras de $\text{Ag-CuFe}_2\text{O}_4$. Imagens de MEV em (b) *E. coli* e (c) *S. aureus* após o tratamento antibacteriano.

Fonte: LIN et al, 2013.

Algumas vantagens dessa técnica residem na determinação de um resultado semi-quantitativo, além da avaliação de um número substancial de bactérias no volume controlado. As principais desvantagens estão na necessidade de um grande número de recipientes para avaliação de um mesmo antibiótico e a possibilidade de erros associados à preparação das concentrações antimicrobianas (ANVISA, 2004).

3.4 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV/VIS)

A espectroscopia no ultravioleta visível é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. Envolve a espectroscopia de fótons, chamada de espectrofotometria, utilizando o comprimento de onda da fonte luminosa da região do ultravioleta até a região do visível, compreendendo a faixa entre 200 e 800 nm do espectro eletromagnético. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos.

3.4.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A absorção da região visível e ultravioleta depende sobretudo do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de

absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada.

O método utilizado na determinação quantitativa da concentração em solução de substâncias absorventes de radiação é dado pela lei de Beer-Lambert, que relaciona a intensidade da luz incidente (I) com a intensidade transmitida (I_0) pela amostra analisada,

$$A = \log \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon c L \quad (3.4)$$

onde A é a absorbância medida, ϵ é a constante de absorvidade molar, c é a concentração da amostra e L é a distância percorrida pela radiação.

Os instrumentos capazes de registrar dados de absorbância ou transmitância são chamados de espectrofotômetros, que mensuram a quantidade de fótons refratados (em % T) em função do comprimento de onda. Este registro é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão, segundo o dado registrado seja de absorbância ou transmitância, respectivamente, e é característico para cada espécie química.

3.4.2 PRINCÍPIOS OPERACIONAIS

Na obtenção da informação sobre a absorção de uma amostra, esta é inserida no caminho óptico do equipamento por meio de um recipiente não absorvedor (geralmente cubas retangulares de vidro ou quartzo), fazendo com que a radiação na faixa de comprimentos de onda UV-Visível incida sobre a solução. O espectrofotômetro então medirá a transmitância por meio da razão I/I_0 , convertendo a quantidade de luz absorvida pela amostra por meio da teoria mostrada na EQ. 3.4.

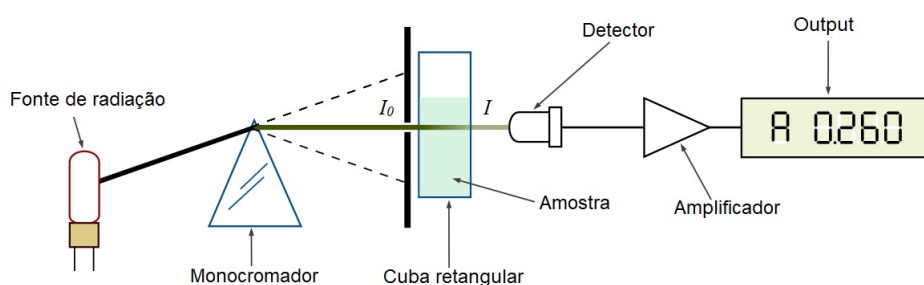


FIG. 3.5: Diagrama esquemático dos componentes de um espectrofotômetro UV/Vis.

A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a ultravioleta/visível, são necessários

componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros contém, em geral, cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal, representados na FIG. 3.5.

3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo fornece um rápido e confiável método para determinar a viabilidade de bactérias numa suspensão. A determinação da viabilidade celular é crítica quando se avalia uma resposta às drogas ou outros fatores citotóxicos. Essa técnica permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e químicas de células, individualmente ou em coletivo.

3.5.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Um feixe de luz (gerado por um ou mais lasers) de um comprimento de onda específico é direcionado a um meio líquido em fluxo. À medida que o fluxo de amostra passa pelos feixes luminosos, alguns detectores (sistema óptico-eletrônico) registram a forma como as estruturas dispersam a luz do laser incidente, captando as fluorescências emitidas. Esses detectores são posicionados na linha do feixe de luz (*forward scatter*, FSC) e perpendicularmente ao feixe (*side scatter*, SSC), além de diversos detectores de fluorescência. Os detectores FSC correlacionam-se com o volume celular e os detectores SSC dependem da complexidade interna da partícula analisada, como forma do núcleo, tamanho relativo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana.

As partículas suspensas que passam através do feixe dispersam a radiação de formas características, com o auxílio dos corantes químicos fluorescentes (fluorocromos) juntos ao material, que podem ser excitados emitindo luz de menor frequência com relação à fonte. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores, sendo possível explorar informações sobre a estrutura física e química de cada partícula individualmente. Em alguns equipamentos modernos, como o BD FACSCanto II ou CytoFLEX, é possível ainda realizar a separação das células analisadas, procedimento conhecido como *cell sorting*, estudando a morfologia de vários tipos celulares simultaneamente.

3.5.2 PRINCÍPIOS OPERACIONAIS

A grande vantagem da técnica é a capacidade de avaliar em curto espaço de tempo um grande número de células com alta sensibilidade e especificidade, proporcionando em seus resultados informações suficientes para diagnósticos precisos sem a necessidade de outros exames. Apesar de ter sido desenvolvido em 1934, este exame foi introduzido no Brasil em novembro de 1988, no Instituto Oswaldo Cruz, com a chegada do primeiro aparelho em território nacional.

O princípio básico de operação consiste em inserir a amostra, previamente preparada em suspensão, no canal de fluxo, onde esta é varrida a uma taxa constante (em $\mu\text{L}/\text{min}$). O material então é analisado para uma série de comprimentos de onda (nas faixas do violeta, azul e vermelho, por exemplo) que excitam o fluorocromo e são coletados pelos canais de fluorescência para esses comprimentos de onda. No sistema eletrônico, os parâmetros são determinados por uma série de câmaras fotomultiplicadoras, responsáveis por converter o sinal óptico em eletrônico. A aquisição dos dados de fluorescência é feita por meio de um software específico, que relaciona a intensidade de fluorescência com a contagem de células presentes em uma determinada região.

O diagrama representativo da análise por citometria de fluxo, mostrando os detalhes de um citômetro comercial, é apresentado na FIG. 3.6

Um método importante, utilizado neste trabalho, para acessar a viabilidade celular é o da exclusão do iodeto de propídio (*propidium iodide*, PI). Por ser um intercalante de pares de base do DNA o PI não é incorporado pelas células vivas, que possuem suas membranas intactas, o qual facilmente penetra nas células não viáveis e cujas membranas se apresentam danificadas e permeáveis. A partir disso o fluorocromo é excitado pelo laser em 488 nm, sendo detectado em um comprimento de onda de 617 nm.

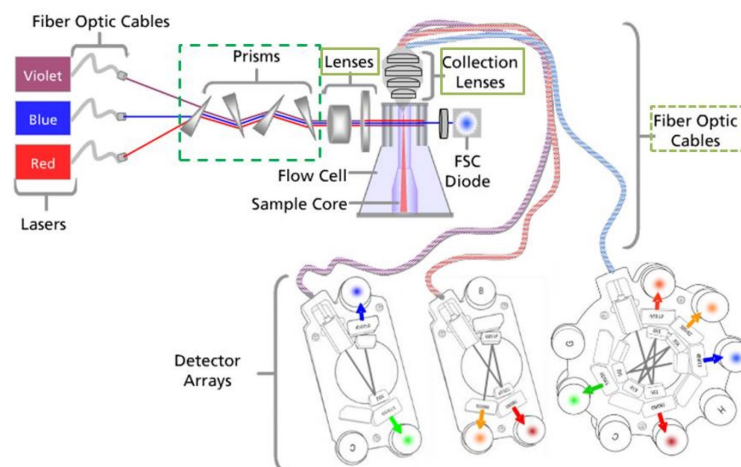


FIG. 3.6: Diagrama esquemático dos componentes de um citômetro de fluxo comercial.

Fonte: ROMAGNOLI, 2013.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O método investigado neste trabalho consiste na síntese e caracterização de partículas de ferrita ($\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$), com x representando o parâmetro de concentração em peso de íons de prata, de modo a viabilizar aplicação na eliminação ou inibição potencial de microrganismos em determinados volumes de controle. Nas seções a seguir, serão apresentados os métodos de síntese, preparo e seleção das amostras utilizadas nos ensaios biológicos.

4.1 SÍNTESE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras de ferrita $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ foram inicialmente preparadas com a mistura estequiométrica de nitrato cúprico tri-hidratado ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) com 99% de pureza, da marca Vetec, nitrato férrico nona-hidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) com 98% de pureza e glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) com 98,5% de pureza, ambos reagentes da marca Sigma-Aldrich. Para as amostras que carregam em sua estequiometria frações em peso de prata, foram adicionados à solução inicial o nitrato de prata (AgNO_3) com pureza $\geq 99\%$ da marca Sigma-Aldrich.

Na estequiometria das ferritas o controle dos componentes da reação é altamente sensível, tendo em vista que os nitratos atuam como agentes oxidantes na reação de combustão enquanto a glicina atua como agente redutor e combustível para a reação. O efeito da razão equivalente combustível-oxidantes (g/n), a taxa da valência total do elemento redutor com relação às valências dos óxidos dos nitratos metálicos, no controle do tamanho de partícula e microestrutura do produto de combustão foi investigada por Toniolo et al (2007). De acordo com Mangalaraja et al (2004) a razão g/n desempenha um papel crucial na determinação da exotermia da reação de combustão, que por sua vez afeta a coloração e propriedades da partícula derivada dos produtos de combustão. As quantidades em massa de cada reagente foram definidas para a composição desejada do produto final e na estequiometria exata para o consumo completo dos óxidos pelo agente complexante.

Primeiramente foram aferidas as massas requeridas dos nitratos metálicos, adicionadas diretamente no recipiente de mistura. A composição inicial da solução contendo nitrato férrico, nitrato cúprico, nitrato de prata e glicina deriva do cálculo de estequiometria da reação redox entre o combustível e os oxidantes. Assim, carbono, hidrogênio, ferro, cobre e prata são considerados elementos redutores com valências respectivas +4, +1, +3, +2 e +1 (HWANG et al, 2004).

A valência calculada do elemento combustível glicina é dada como +9; o oxigênio, considerado um elemento oxidante, possui valência -2 e a valência do nitrogênio é comumente considerada como zero (TAILLADES et al., 2016).

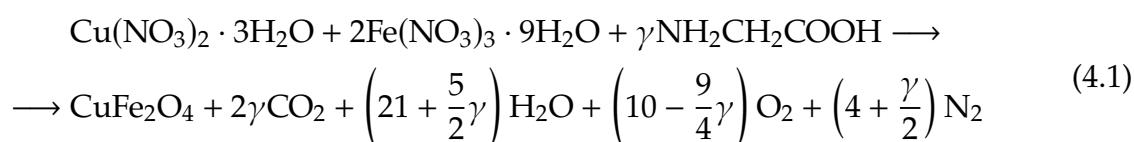
Foram então adicionadas as quantidades relativas ao elemento combustível, calculada por meio da estequiometria equivalente da reação, para cada amostra. Os cálculos das quantidades molares dos reagentes foram tomados por base na literatura, onde foram avaliadas duas proporções entre o agente redutor e os agentes oxidantes, resultando na razão entre o número de mols de glicina e o número total de mols dos nitratos de cobre, prata e ferro em 0,7 e 1,0. Foram utilizadas ainda duas concentrações em peso entre os óxidos de cobre e prata, com $x = 0,02$ e $x = 0,05$. Nesta fase do trabalho, efeitos de retenção de O_2 e N_2 diretamente do ar não serão levados em consideração na estequiometria do produto.

Os cálculos estequiométricos correspondentes às reações, tal como as informações das aferições realizadas com precisão de 10^{-1} mg, são mostrados agora para cada caso.

(a) Ferrita de cobre $CuFe_2O_4$: O cálculo da valência total dos nitratos metálicos foi feito por somatório aritmético simples, obtendo resultado -16. A estequiometria da reação redox exige uma quantidade molar estimada de glicina, necessária no balanceamento das valências oxidantes e redutoras totais, calculada como:

$$(-16) + 9n = 0 \therefore n = 16/9 \text{ mols.}$$

Assumindo a completa combustão dos reagentes após o processo de ignição, a reação geral para a ferrita de cobre pode ser descrita segundo a EQ. 4.1 e na TAB. 4.1 são apresentadas as relações percentuais das massas aferidas.



onde γ representa o valor relativo aos mols de glicina.

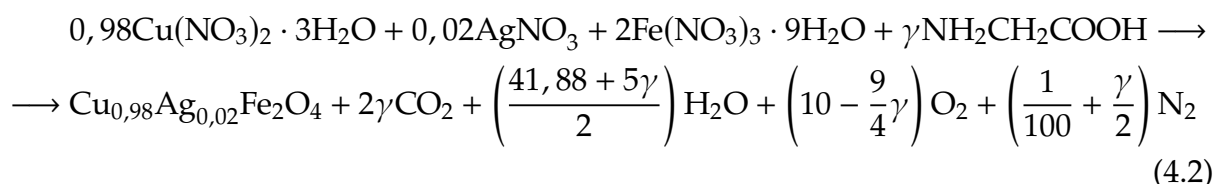
TAB. 4.1: Fração das massas aferidas por reagente para a amostra $CuFe_2O_4$.

Razão g/n	Reagentes (fração percentual de massa)			
	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	$AgNO_3$	$C_2H_5NO_2$
g/n=1,0	63,39%	18,95%	-	17,66%

(b) Ferrita $Cu_{0,98}Ag_{0,02}Fe_2O_4$: em $Cu_{1-x}Ag_xFe_2O_4$, com $x = 0,02$, o cálculo da valência total dos nitratos metálicos retribui resultado -21. Calculou-se o número estimado de mols da glicina para esta amostra: $(-21) + 9n = 0 \therefore n = 7/3$ mols.

A EQ. 4.2 representa a relação geral de balanceamento dos elementos reagentes e na TAB. 4.2 são apresentadas as respectivas medidas das massas dos nitratos de ferro,

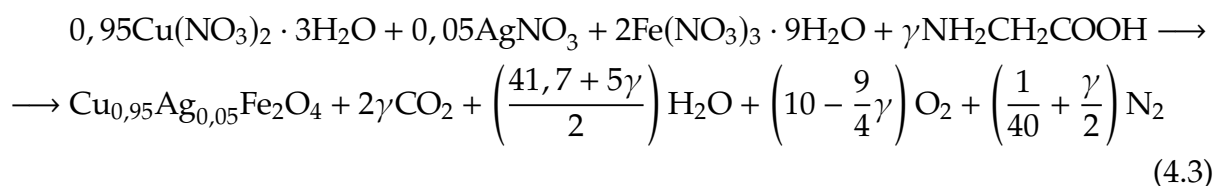
cobre e prata.



TAB. 4.2: Fração das massas aferidas para a amostra $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

Razão g/n	Reagentes (fração percentual de massa)			
	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	AgNO_3	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$
g/n=1,0	63,46%	18,59%	0,27%	17,68%
g/n=0,7	67,02%	19,63%	0,28%	13,07%

(c) **Ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$** : em $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$, com $x = 0,05$. A EQ. 4.3 representa a relação de balanceamento dos elementos reagentes e na TAB. 4.3 são apresentadas as respectivas medidas das massas dos nitratos de ferro, cobre e prata.



TAB. 4.3: Fração das massas aferidas para a amostra $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

Razão g/n	Reagentes (fração percentual de massa)			
	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	AgNO_3	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$
g/n=1,0	63,56%	18,06%	0,67%	17,71%
g/n=0,7	67,13%	19,07%	0,71%	13,09%

De modo a obter a solução reagente, todos os componentes foram diluídos diretamente em 10 mL de água deionizada, com objetivo de evitar que as propriedades higroscópicas dos óxidos introduzissem erros nas medidas.

Consequentemente, a solução formada pela diluição dos nitratos e glicina foi homogeneizada manualmente e em temperatura ambiente em um béquer de 100 mL, onde fora levada ao aquecimento em uma placa aquecedora que induz à evaporação de toda a água excedente a uma temperatura controlada de 100°C e pressão ambiente. Com objetivo de reduzir as possíveis interferências de temperatura e dispersão dos resíduos tóxicos resultantes do processo de combustão, utilizou-se a capela de exaustão existente no Laboratório de Síntese de Nanopartículas e Preparação de Amostras do Instituto Militar de Engenharia para esta etapa.

Completado o ciclo de secagem, observou-se o momento da ignição da combustão seguido pela queima autossustentada em todo o volume do material. O resultado é um fino pó de grande volume e aparência escura definida pela quantidade de óxidos metálicos presente nas amostras.

4.2 SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FERRITA

As amostras de ferrita utilizadas neste trabalho tiveram como objetivo a investigação do processo inibidor de crescimento bacteriano e a relação da quantidade do íon prata em tal processo. Para tal, os materiais sofreram modificações moleculares na etapa de síntese, ajustando uma quantidade maior de oxidantes por reagente (razões g/n iguais a 1,0 e 0,7) de forma a investigar os possíveis efeitos induzidos pelas modificações na estequiometria da reação no processo de mitigação da atividade bacteriana.

De forma a facilitar a leitura de dados, as amostras de ferrita produzidas foram separadas em rótulos conforme sua estrutura química e elencadas na TAB. 4.4.

TAB. 4.4: Amostras de ferrita cobre-prata avaliadas neste trabalho.

Código/ Amostras	Razão g/n
C010 - CuFe_2O_4	1,0
C210 - $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	1,0
C207 - $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	0,7
C510 - $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	1,0
C507 - $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	0,7

4.3 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL

4.3.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro marca PANalytical, modelo X'Pert Pro, do Laboratório de Difração de Raios X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Os dados de varredura foram: tensão da fonte 40 kV, corrente da fonte 40 mA, ângulo inicial 15°, ângulo final 110°, incremento angular 0,05°, velocidade de varredura 160 segundos/ângulo. Este equipamento utiliza uma fonte de cobre ($\lambda = 0,154$ nm) para a radiação incidente.

O difratograma da ferrita foi ajustado pelo método de Rietveld utilizando o software HighScore Plus 3.0. As fichas de ajuste foram extraídas do banco de dados Inorganic Crystal Structure Database (ICSD).

Por não haver fichas cristalográficas das ferritas Cu-Ag, as caracterizações dos difratogramas desses materiais foram realizadas por comparação dos picos cristalográficos com as fichas do banco de dados JCPDS. Utilizou-se também espectros de difração publicados na literatura para as aproximações referentes às partículas analisadas.

4.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Micrografias por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio eletrônico marca ThermoFisher Scientific, modelo Quanta FEG 250, equipado com detector de elétrons retroespalhados marca Bruker, modelo EBSD e⁻ Flash HD, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Militar de Engenharia. Os dados de operação durante as análises foram: tensão de aceleração dos elétrons na faixa de 5 kV a 30 kV, distância de trabalho de 5 a 10 mm e *spot size* 5,0.

Devido às amostras se apresentarem em formato de pó, estas foram simplesmente compactadas em uma fita de carbono no suporte. Não houve necessidade de preparação ou conformação das amostras para ajuste no microscópio.

4.4 TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

4.4.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Todos os procedimentos de preparo das amostras para realização dos ensaios biológicos foram feitos utilizando-se como base o protocolo de procedimentos operacionais para o teste de macrodiluição em tubos do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, introduzindo as modificações necessárias para a natureza dos experimentos.

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 Ágar Mueller-Hinton¹. Após o período de 24 horas de incubação, 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 de ensaio contendo 1,0 mL de formol 10%. A leitura da quantidade de colônias foi feita por meio da medida de absorbância na faixa de comprimento de onda $\lambda = 625$ nm em espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S.

¹Meio de cultura normalmente utilizado para realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), proporciona ao desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico.

Em sequência, ajustou-se a concentração da suspensão bacteriana presente no inóculo inicial para a faixa entre 10^6 a 10^7 UFC/mL em tubos contendo 5,0 mL de meio caldo Mueller-Hinton por meio da EQ. 4.4.

$$C_i \text{ (UFC/mL)} = \frac{10^8 \lambda_{do}}{\lambda_{id}} \quad (4.4)$$

onde: λ_{do} corresponde à distribuição de densidade observado no espectrofotômetro e λ_{id} representa ao valor ideal da densidade óptica (0,08 - 0,1) para a concentração de 10^8 UFC/mL.

4.4.2 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Foram selecionadas para os bioensaios as cepas padrão Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), para análises semiquantitativas frente às amostras de ferrita.

Dez frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de meio caldo Mueller-Hinton foram utilizados para os ensaios com cada bactéria, sendo selecionadas massas das amostras nas quantidades de 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$. Seis frascos adicionais foram separados, contendo as concentrações bacterianas de controle sem adição das ferritas. Uma suspensão volumétrica inicial de 5 μL de cultura bacteriana a 5×10^6 UFC/mL foi adicionada aos recipientes, ajustada por meio da EQ. 4.5, que relaciona a densidade de crescimento em cada cultura.

$$V_i \text{ (mL)} = \frac{10^7 V_f}{2C_i} \quad (4.5)$$

onde: V_f corresponde ao volume final de solução e C_i representa a concentração real de suspensão bacteriana dada na EQ. 4.4.

Cada amostra foi homogeneizada três vezes junto ao meio de cultura para eliminação de grandes agregados, sendo então mantidas em condições de incubação em uma câmara incubadora marca Edmund Bühler, modelo TH 30, sob agitação de 110 rpm na faixa de temperatura de 36°C a 37°C pelo período *overnight*. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas para garantir sua total reprodutibilidade e confiabilidade.

Após o período de incubação, os dados da absorbância do feixe foram adquiridos por meio da leitura da densidade de colônias no espectrofotômetro UV-Vis da Thermo Scientific, através do protocolo estipulado neste trabalho. De forma a estabilizar as culturas, transferiu-se 1 mL de cada frasco para tubos de ensaio convencionais contendo

1 mL de formol 10%. Foram feitas as aquisições da absorvância nos tubos de controle positivo, correspondentes ao máximo crescimento das bactérias durante a incubação, e comparadas às leituras das soluções com as amostras de ferrita, estimando-se estatisticamente a eficiência antibacteriana das amostras.

4.4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Foram selecionadas para os bioensaios por citometria de fluxo as cepas padrão Gram-positiva *Enterococcus faecalis* (CCBH 5069) e Gram-negativa *Escherichia coli* (CCBH 3860). A preparação da suspensão inicial das bactérias selecionadas foi feita seguindo o protocolo dos testes de macrodiluição em frascos, descrito na seção 4.4.1.

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo meio caldo Mueller-Hinton e solução tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*, PBS)², pH 7,2, para os ensaios com cada bactéria, sendo selecionadas massas das amostras nas quantidades de 100 µg/mL e 200 µg/mL. Foram preparados dois frascos de controle para cada bactéria, sendo o controle negativo, correspondente às bactérias mortas por imersão em água comum a 60°C por 15 minutos, e controle positivo, correspondente à solução de bactérias crescidas. Uma concentração volumétrica de cultura bacteriana a 10⁷ UFC/mL, calculada por meio da EQ. 4.5 foi adicionada aos recipientes.

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira análise (FIG. 4.7), foram verificadas as atuações das cinco amostras de ferrita nas concentrações predefinidas em um volume de crescimento bacteriano contendo 5 mL de MHB com 1 mL de PBS, incubadas em período de 16 horas, *overnight*.

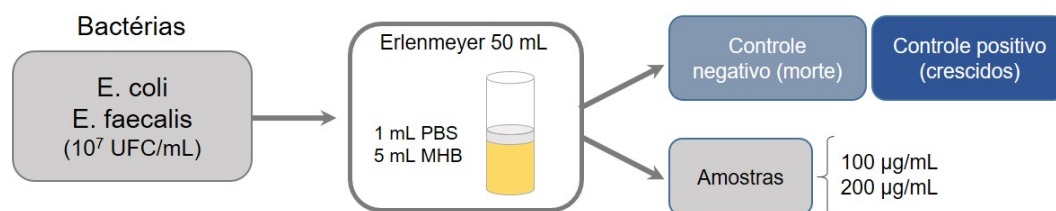


FIG. 4.7: Diagrama esquemático dos materiais para citometria de fluxo com todas as amostras de ferrita, nas concentrações 100 µg/mL e 200 µg/mL.

Na segunda análise (FIG. 4.8), foram verificadas as respostas de duas amostras de ferrita, em dois volumes de solução (5 mL de MHB com 1 mL PBS e 2 mL de MHB com 1 mL de PBS), incubadas em período de uma hora.

²Solução salina comumente utilizada em bioquímica, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio. Têm como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios.

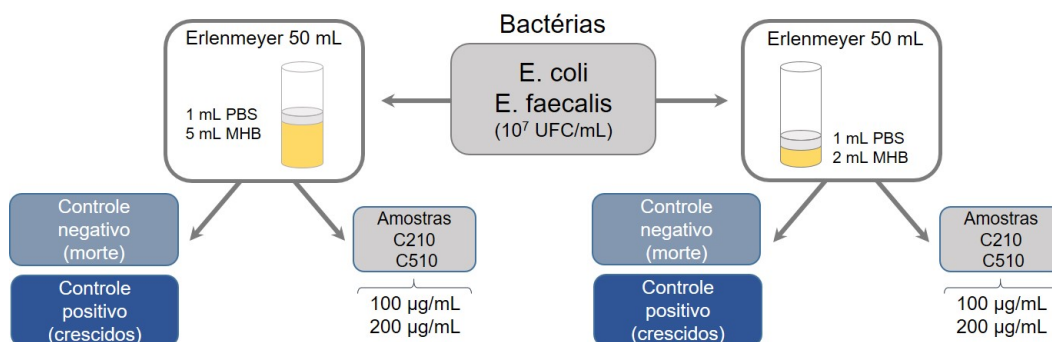


FIG. 4.8: Diagrama esquemático dos materiais para citometria de fluxo com as amostras $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510), nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$.

As bactérias obtidas e preparadas foram então ressuspensas em 200 μL e submetidas ao protocolo citofluorimétrico de marcação com PI. Foram adicionados 5 μL de PI em cada tubo de amostra e então incubados no gelo (4°C), no escuro por 15 minutos. Após o preparo, as amostras foram imediatamente submetidas à aquisição e análise por citometria de fluxo de forma individual, enquanto as demais amostras permaneceram sob proteção da luminosidade.

4.4.4 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após a incubação com PI, 50.000 eventos foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo CytoFLEX da marca Beckman Coulter através do protocolo representado na FIG. 4.9.

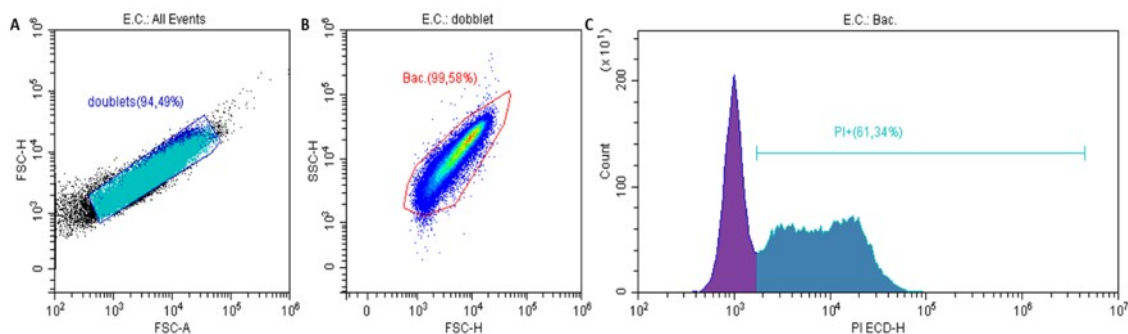


FIG. 4.9: Protocolo citofluorimétrico representativo.

Na FIG. 4.9(a) é mostrado um *dot plot* de altura versus área (FSC-H vs. FSC-A), onde foi criada uma região ou *gate* (doublets) para exclusão de debris e doublets. A FIG. 4.9(b), representa um *dot plot* morfológico biparamétrico de tamanho (FSC) versus granularidade (SSC), no qual foi criada uma região (*gate* Bac) englobando a população

bacteriana a ser avaliada. Já na FIG. 4.9(c) é representado um histograma de intensidade de fluorescência relativo à incorporação de PI pelos microrganismos não-viáveis.

As análises foram feitas através do software CytExpert, versão 1.1 (Beckman Coulter). O laser 488 nm foi utilizado para a excitação do PI, cuja emissão da fluorescência foi captada pelo filtro 610/20 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PROPRIEDADES MICROESTRUTURAIS

5.1.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os espectros de DRX das ferritas analisadas são apresentados nas figuras seguintes e conferem resultados que confirmam os dados apresentados na literatura para as ferritas de cobre com a presença de uma fase de óxido de prata (Ag_2O).

Na ferrita de cobre CuFe_2O_4 , para os ângulos de difração $18,33^\circ$, $30,16^\circ$, $35,53^\circ$, $37,17^\circ$, $43,19^\circ$, $47,29^\circ$, $53,59^\circ$, $57,13^\circ$, $62,74^\circ$, $65,97^\circ$, $71,18^\circ$, $74,23^\circ$, $75,24^\circ$ e $79,22^\circ$ são indexados os picos (111), (220), (311), (222), (400), (331), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) e (444) característicos da ferrita de cobre, indicando sua estrutura cristalina cúbica de espinélio. A análise demonstrou a formação de 84,6% de formação da fase ferrita, 11,6% de óxido de cobre (CuO) e 3,8% de magnetita (Fe_3O_4) que consiste em um óxido de ferro com propriedades ferrimagnéticas. O difratograma obtido para esta amostra é mostrado na FIG. 5.1.

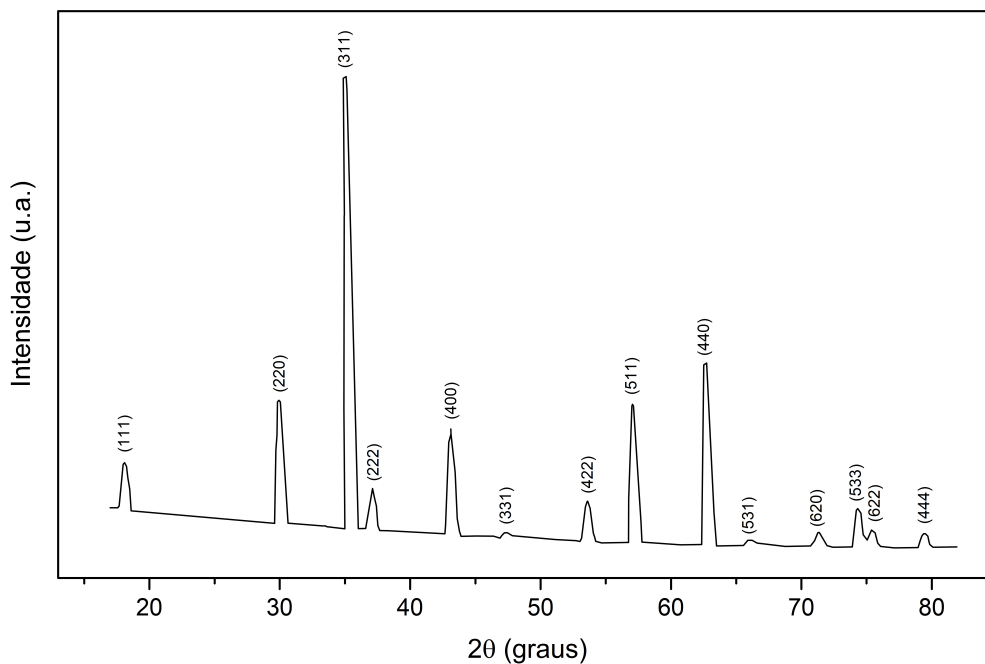


FIG. 5.1: Padrão de difração da ferrita de cobre CuFe_2O_4 .

Para as ferritas de cobre-prata $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ os ângulos de difração e respectivos picos característicos das fases formadas são indicados na TAB. 5.2 e seus difratogramas são apresentados comparativamente na FIG. 5.2. As fichas utilizadas para as análises foram ICSD 24872 para a fase ferrita de cobre, ICSD 27667 o óxido de prata, ICSD 16025 para o óxido de cobre e ICSD 65339 para a fase magnetita.

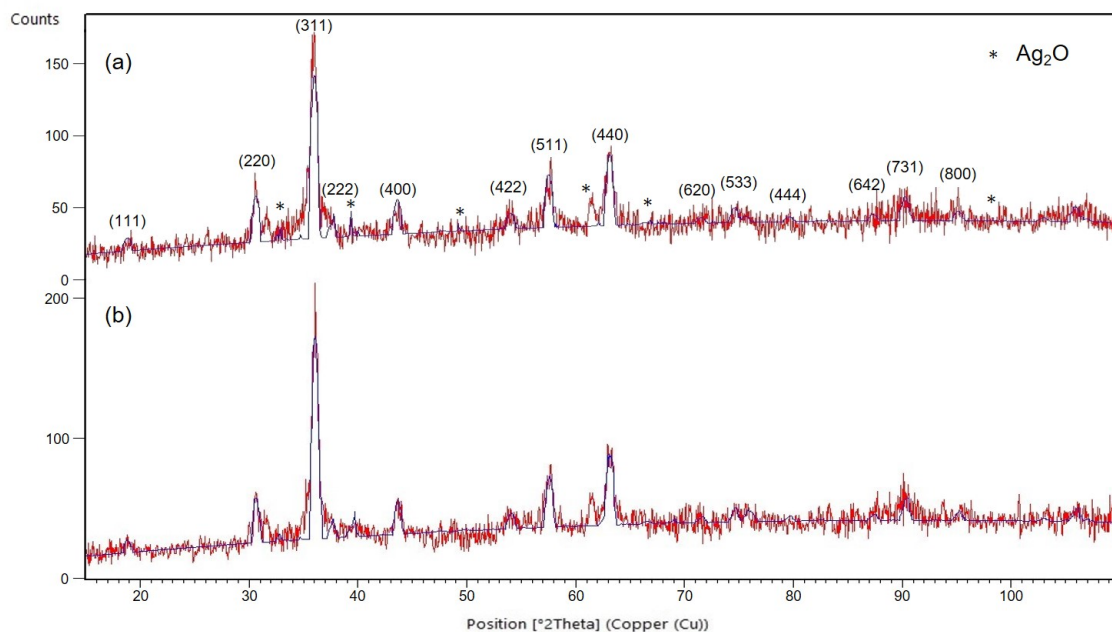


FIG. 5.2: Padrão de difração das ferritas (a) $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e (b) $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

Na TAB. 5.1 são apresentados os resultados do percentual de fases presentes nas amostras, tamanho de cristalito (D), em nanômetros, e *goodness of fit* (GOF) para as estruturas CuFe_2O_4 , $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

TAB. 5.1: Parâmetros estruturais das ferritas Cu-Ag estudadas.

Amostras	Fases analisadas (%)				D (nm)	GOF
	CuFe_2O_4	CuO	Ag_2O	Fe_3O_4		
CuFe_2O_4	84,6	11,6	-	3,8	23,32	1,17
$\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$	81,5	-	13,6	4,9	15,83	1,19
$\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$	83,2	-	13,1	3,7	14,05	1,12

O tamanho médio de cristalito foi calculado através da média dos tamanhos de cristalitos calculados pelos três picos mais intensos dos difratogramas. A equação de Scherrer (EQ. 2.9) foi utilizada para confirmar os resultados obtidos pela análise no software HighScore, demonstrando plena consonância entre as duas abordagens.

O espaçamento interplanar d_{hkl} e o parâmetro de rede a foram calculados usando a relação da Lei de Bragg (EQ. 2.6) por meio da posição média dos picos de difração. Na TAB 5.2 é feita a análise cristalográfica dos parâmetros fornecidos pelo padrão de difração das estruturas estudadas, sendo possível notar relativa variação angular dos picos de difração com adição do óxido de prata.

TAB. 5.2: Parâmetros cristalográficos das nanopartículas Cu-Ag analisadas.

CuFe ₂ O ₄				Cu _{0,98} Ag _{0,02} Fe ₂ O ₄				Cu _{0,95} Ag _{0,05} Fe ₂ O ₄			
2θ	hkl	d _{hkl} (Å)	a (Å)	2θ	hkl	d _{hkl} (Å)	a (Å)	2θ	hkl	d _{hkl} (Å)	a (Å)
18,33	111	4,835	8,3753	17,95	111	4,938	8,5530	17,94	111	4,939	8,5554
30,16	220	2,960	8,3727	30,18	220	2,958	8,3674	29,82	220	2,994	8,4673
35,53	311	2,524	8,3721	33,62	010	2,663	2,6632	32,70	010	2,736	2,7361
37,17	222	2,417	8,3719	35,74	311	2,510	8,3245	35,31	311	2,540	8,4234
43,19	400	2,093	8,3715	36,28	200	2,400	8,3139	36,98	222	2,428	8,4125
47,29	331	1,920	8,3712	37,44	222	2,474	4,9478	37,43	200	2,401	4,8013
53,59	422	1,709	8,3709	38,48	110	2,337	3,3055	37,94	110	2,369	3,3508
57,13	511	1,611	8,3707	43,68	400	2,070	8,2816	43,15	400	2,095	8,3796
62,74	440	1,480	8,3705	47,94	331	1,896	8,2642	47,35	331	1,918	8,3618
65,97	531	1,415	8,3704	50,79	210	1,796	4,0163	51,02	210	1,788	3,9989
71,18	620	1,323	8,3703	54,49	422	1,682	8,2425	53,80	422	1,702	8,3396
74,23	533	1,276	8,3702	58,18	511	1,584	8,2323	57,44	511	1,603	8,3292
75,24	622	1,262	8,3702	61,05	011	1,517	2,1447	59,28	011	1,558	2,2027
79,22	444	1,208	8,3701	64,04	440	1,453	8,2182	63,21	440	1,470	8,3149
				67,42	531	1,388	8,2112	66,53	531	1,404	8,3077
				67,71	301	1,383	4,3725	68,85	301	1,363	4,3088
				72,89	620	1,297	8,2009	71,91	620	1,312	8,2972
				73,67	211	1,285	3,1471	72,79	211	1,298	3,1799
				75,08	102	1,264	2,8267	73,12	102	1,293	2,8914
				76,09	533	1,250	8,1955	75,06	533	1,264	8,2918
				77,15	622	1,235	8,1938	76,10	622	1,250	8,2900
				81,35	444	1,182	8,1874	80,21	444	1,196	8,2835

Fase Ag₂O

Um fator importante observado na análise dos picos cristalográficos das amostras avaliadas, é a redução do parâmetro de rede a com o aumento da quantidade de prata. Uma das possibilidades investigadas e relatadas por Kooti et al (2013) e Gao et al (2013) se deve à compressão da rede do espinélio pela fase metálica de prata formada nos limites da partícula. Essa tensão compressiva promove o deslocamento angular de 2θ com relação aos picos de CuFe₂O₄ e se reflete ainda no tamanho médio de cristalito observado, que tende a ser estatisticamente menor para maiores distribuições de íons de prata monovalentes (considerando a faixa de distribuição $0 < x_{\text{Ag}} < 0,1$).

5.1.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Micrografias de MEV das nanopartículas Cu-Ag são mostradas na FIG. 5.3. O tamanho médio obtido das partículas Cu_{0,98}Ag_{0,02}Fe₂O₄ e Cu_{0,95}Ag_{0,05}Fe₂O₄ obtido pelas micrografias foi em torno de 69 ± 17 nm e 75 ± 13 nm, respectivamente.

Segundo resultados publicados por Gong et al (2007) em amostras de magnetita dopada com prata (Fe₃O₄@Ag) sintetizadas por coprecipitação, os íons Ag⁺ inicialmente tendem a se agrupar na superfície das nanopartículas, resultando em partículas

maiores e mais esféricas.

Pela análise da morfologia feita pelo MEV nas nanopartículas de ferrita de cobre CuFe_2O_4 estimou-se o diâmetro médio das partículas em 68 ± 18 nm. Esse resultado, ainda que comparado com um material estruturalmente diferente, corrobora o fato de que as partículas $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$, quando sintetizadas com maiores quantidades de prata, demonstram uma tendência crescente de se formarem mais homogeneamente esféricas e com diâmetro maior do que na ferrita de cobre usual, sem adição de prata.

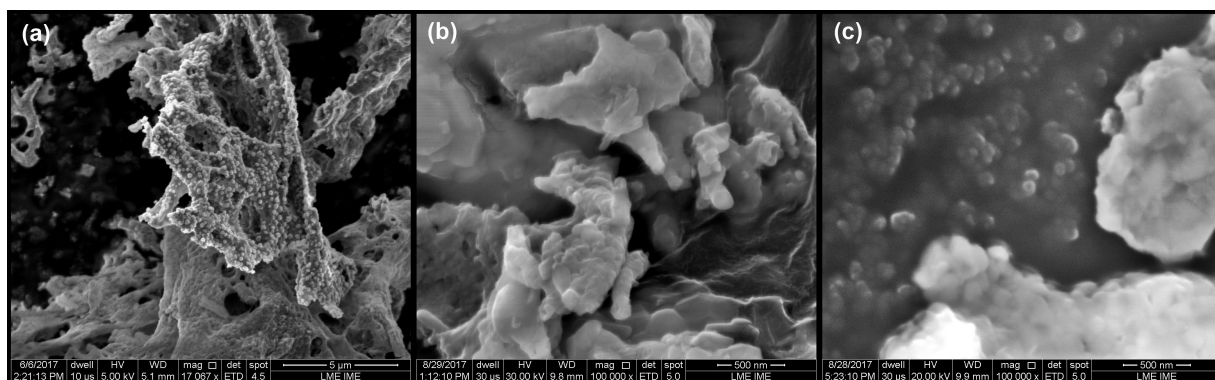


FIG. 5.3: MEV das ferritas (a) CuFe_2O_4 , (b) $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e (c) $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

5.2 PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS

5.2.1 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE POR ESPECTROFOTOMETRIA

No teste de susceptibilidade utilizando macrodiluição em frascos, a análise dos dados coletados na saída do espectrofotômetro foi relevante para se associar o caráter do potencial inibitório das partículas frente às classes de bactérias avaliadas. As medidas de absorvância das soluções contendo diferentes quantidades de nanopartículas permitiram obter a contagem das colônias prévias e restantes, determinando as taxas das células viáveis após o contato com as bactérias. Esses dados são tabulados na TAB. 5.3, mostrando o caráter inibitório, bacteriostático ou bactericida, das amostras estudadas.

Os resultados apresentados mostram que após a incubação *overnight*, observa-se um aumento no número de células viáveis ou reprodutíveis, acima do valor inicial de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, para concentrações de amostra menores que 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir deste ponto, a quantidade inicial de células decresce gradualmente com o aumento da concentração dos nanopós de ferrita Cu-Ag, mostrando a tendência antibacteriana do material. É possível verificar ainda que para esta concentração, as amostras analisadas são capazes de interromper, na maioria dos casos, a replicação celular das bactérias, onde o número de células após a incubação é igual ao número de bactérias presente no inóculo inicial, o que é chamado de efeito bacteriostático.

TAB. 5.3: Número de células após incubação *overnight* com as nanopartículas.

Amostras	Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Gram positivas (UFC/mL)			Gram negativas (UFC/mL)		
		S. aureus	B. subtilis	E. faecalis	P. aeruginosa	E. coli	K. pneumoniae
C207	0	$5,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
	250	$5,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$8,7 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$
	500	$4,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
C210	0	$9,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$
	250	$9,0 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$
	500	$5,5 \times 10^5$	$8,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,6 \times 10^3$
C507	0	$5,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
	250	$9,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$9,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
	500	$2,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5$
C510	0	$9,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$
	250	$3,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$
	500	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$	$9,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$

Número inicial de células bacterianas (antes da incubação) = $5,0 \times 10^6$ UFC/mL

Em concentrações mais baixas (até $250 \mu\text{g}/\text{mL}$), percebe-se que as amostras de $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C207 e C210) não apresentam alto potencial bactericida para nenhuma classe de bactérias analisadas, o que se pode observar por meio dos gráficos comparativos na FIG. 5.4. O máximo alcance antibiótico nessa concentração foi em cerca de $32 \pm 4 \%$ para a amostra C207.

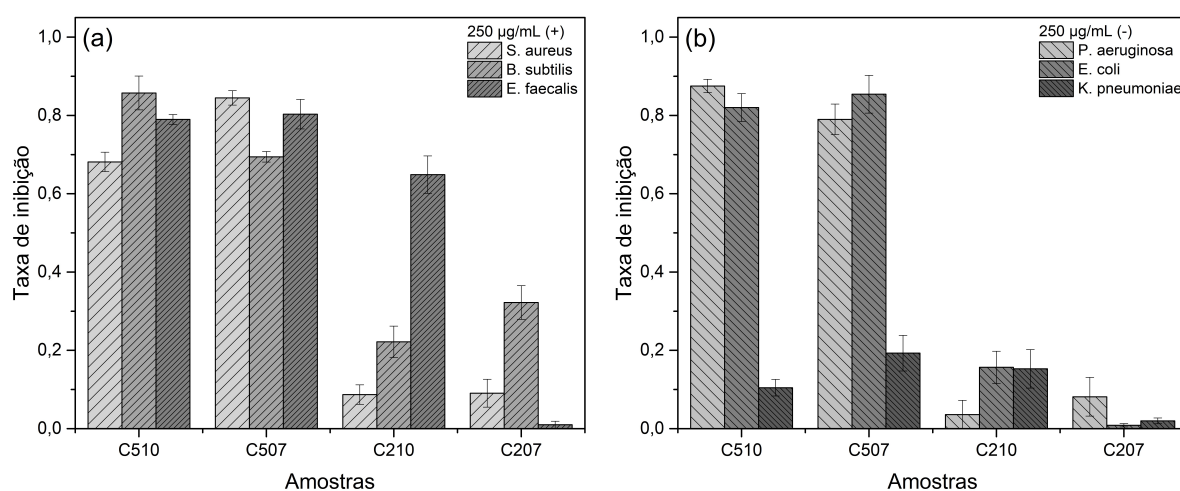


FIG. 5.4: Taxas de inibição das amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C207 e C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C507 e C510) na concentração $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ em bactérias (a) Gram positivas e (b) Gram negativas.

Contudo, quando são adicionadas partículas acima da concentração de $250 \mu\text{g}/\text{mL}$, o número de células disponíveis após a incubação sofre um decréscimo com relação à quantidade inicial. Dessa forma, ao se aumentar a concentração das amostras no meio

para 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIG. 5.5) estas atuam de forma significativa na contenção da replicação celular para a maioria das cepas bacterianas estudadas, inibindo o crescimento e eliminando as bactérias Gram positivas em torno de 93% e Gram negativas por volta de 82%.

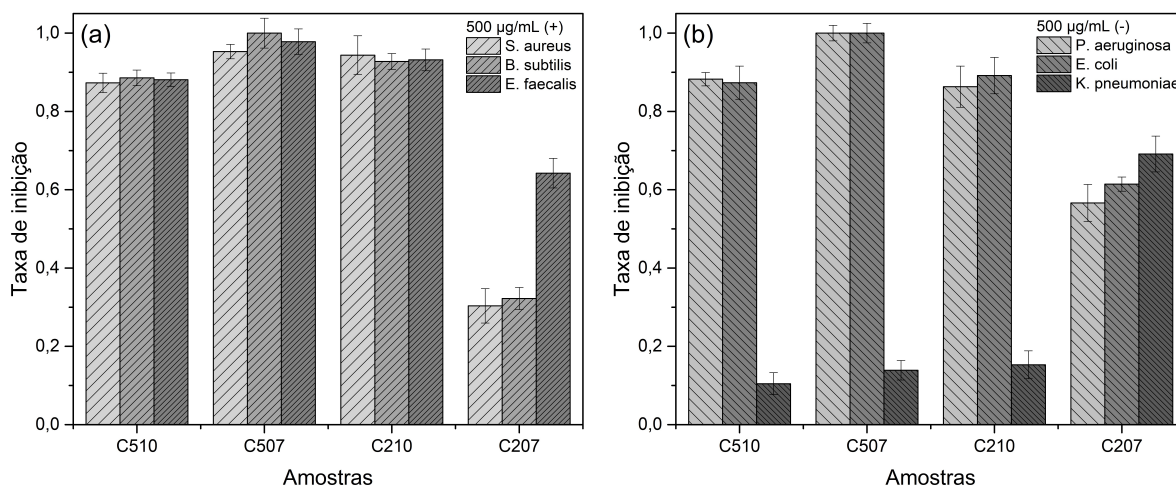


FIG. 5.5: Taxas de inibição das amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C207 e C210) e $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C507 e C510) na concentração 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em bactérias (a) Gram positivas e (b) Gram negativas.

Para ambas as classes de microrganismos, percebe-se alto potencial antibiótico na amostra C507. Um forte efeito bactericida é observado nessa concentração da ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com razão $g/n = 0,7$, onde a quantidade de células após 24 horas de incubação é reduzida entre 95% a 99% frente às bactérias *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Esse resultado fornece grande indicativo que as nanopartículas de ferrita cobre-prata atuam com eficácia em meios biológicos, criando um ambiente inviável à reprodução celular dos microrganismos a partir de determinada concentração.

Ferritas de cobre (CuFe_2O_4) sem adição da fase prata também foram submetidas ao teste, constatando que estas por si não foram suficientes para inibir o crescimento dos microrganismos avaliados permitindo a replicação celular durante o período de incubação. Tal fator é forte indicativo que a afinidade dos íons de prata, em conjunto com as fortes propriedades magnetostáticas das nanopartículas de cobre, atuam com clara influência nos parâmetros antibióticos das amostras.

Pode-se ainda avaliar que mudanças 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 aumentar suas propriedades antibacterianas, principalmente em concentrações acima de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esse efeito pode ser entendido pelo aumento da relação de área superficial de contato entre as amostras e os microrganismos, submetendo-os a uma maior quantidade de agente por volume de solução.

Diversos estudos recentes (LIN, 2013; SANPO, 2013; KOOTI, 2013; KUMAR, 2012) mostraram que nanopartículas metálicas possuem características de comportamento antibacteriano dependentes da distribuição e do tamanho dos aglomerados.

5.2.2 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise por citometria de fluxo fornece resultados quantitativos confiáveis da densidade populacional de bactérias que foram atingidas e eliminadas pelo contato com os antimicrobianos. Geralmente, células vivas com membranas plasmáticas intactas não absorvem o iodeto de propídio, que age como um intercalante de DNA, penetrando nas células mortas que exibem fluorescência em comprimento de onda específico coletado pelo canal do citômetro.

Dessa forma, a comparação entre os gráficos das amostras com um controle positivo permite afirmar a taxa relativa de mortalidade celular em comparação com as células intactas.

A FIG. 5.6 e FIG. 5.7 mostra um histograma de taxa de mortalidade da bactéria *E. coli* após o período *overnight* de 16 horas de tratamento com as nanopartículas, ambas incubadas a 37°C e agitação de 100 rpm nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL.

O valor representado pela barra horizontal em todos os gráficos, corresponde à quantidade de células danificadas presentes na região positiva, marcada pelo gráfico de distribuição no lado superior direito.

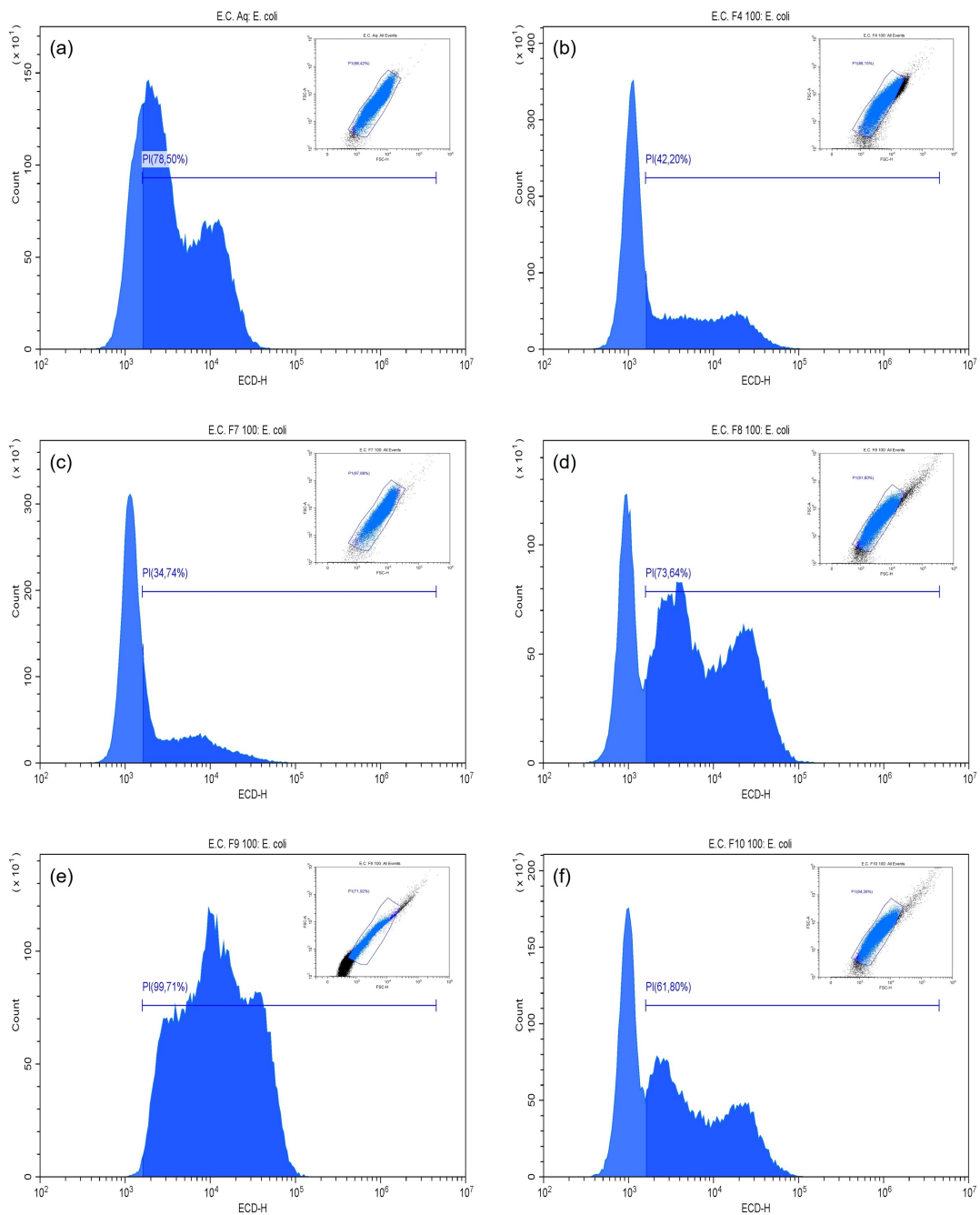


FIG. 5.6: Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas na concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *E. coli* em incubação *overnight*. (a) Células mortas por calor; (b) tratamento com partículas CuFe_2O_4 (C010); (c) e (d) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507); (e) e (f) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207).

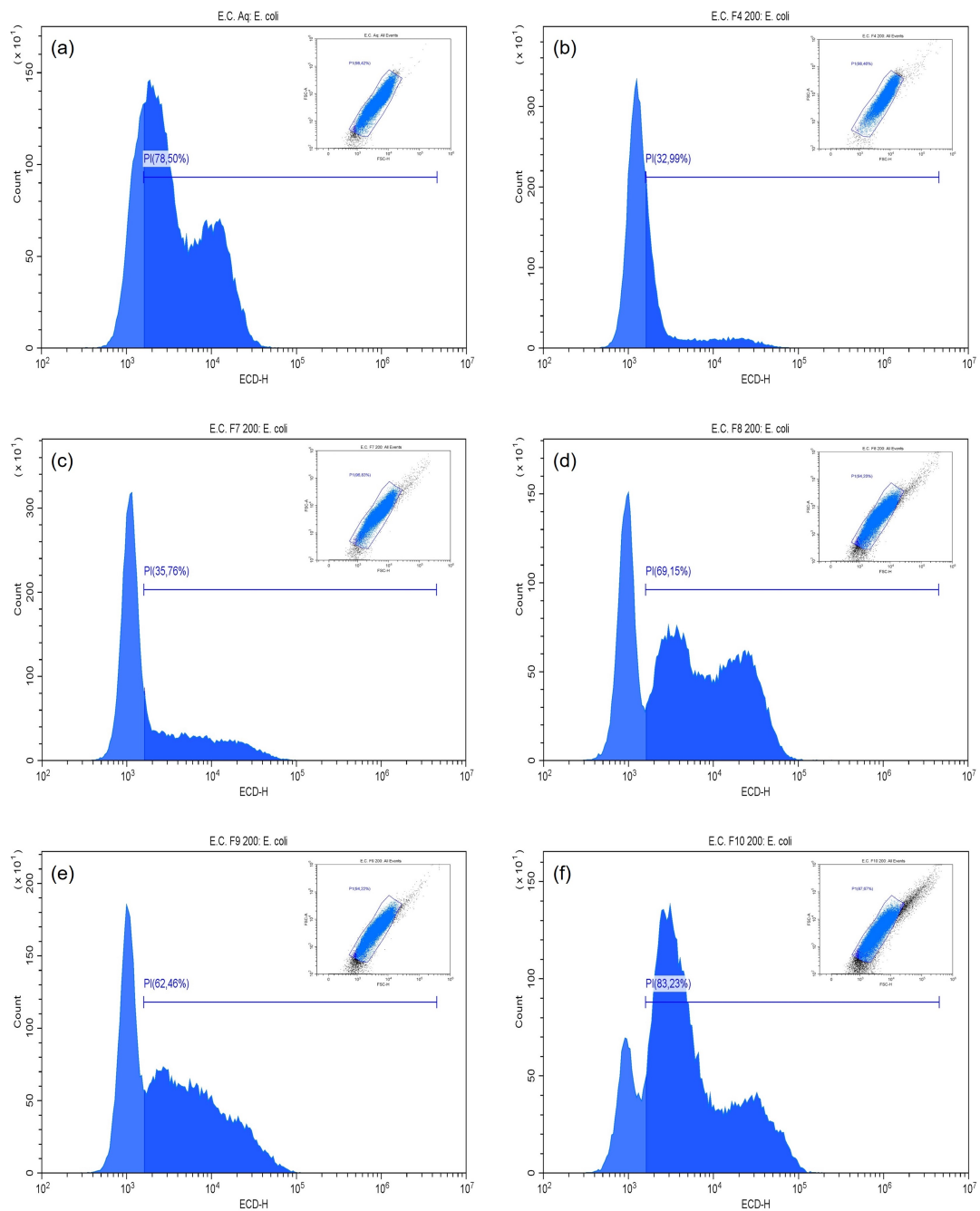


FIG. 5.7: Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas na concentração 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *E. coli* em incubação *overnight*. (a) Células mortas por calor; (b) tratamento com partículas CuFe_2O_4 (C010); (c) e (d) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507); (e) e (f) tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210 e C207).

Pode-se perceber nas figuras uma região de pontos de dispersão em todos os gráficos, correspondente à maior densidade de bactérias com determinada área e tamanho. Essa região de espalhamento (*scatter gate*) foi escolhida de forma a separar a população de bactérias das nanopartículas, de forma a remover possíveis resultados (debris e doublets) que não correspondessem exclusivamente às bactérias.

Como é possível notar nos histogramas de fluorescência da FIG. 5.6(a) e FIG. 5.7(a), as células mortas pelo calor foram permeabilizadas com PI apresentando forte fluorescência, portanto marcadas como controle positivo. Quando *E. coli* é tratada com concentrações maiores de elemento antibiótico, percebe-se uma tendência inibitória crescente para grande parte das amostras estudadas, corroborando com os resultados da análise por espectrofotometria UV.

Contudo, após um período de 16 horas de incubação a morte natural das células bacterianas pode se tornar um problema, já que não permite obter a certeza dos agentes responsáveis pela extinção de parte das colônias. Ainda assim, entre todos os casos analisados, cerca de 32% a 99% das bactérias se encontravam na região positiva determinada pelos controles, o que indica que as nanopartículas de ferrita Cu-Ag podem destruir a permeabilidade da membrana celular e levar a célula à morte, atuando como agente antibacteriano eficaz.

Visando investigar o efeito do tempo de incubação na resposta dos microrganismos frente às partículas, utilizaram-se os procedimentos descritos por Gong et al (2007) e Chatterjee et al (2011), reduzindo o tempo de interação para uma hora, onde as bactérias iniciam o seu processo de divisão celular e crescem exponencialmente. Dessa forma, mostra-se na FIG. 5.8 os histogramas citofluorimétricos para bactéria *E. coli* após o período de incubação de uma hora de tratamento com duas amostras Cu-Ag, mantidas as mesmas concentrações e condições de incubação.

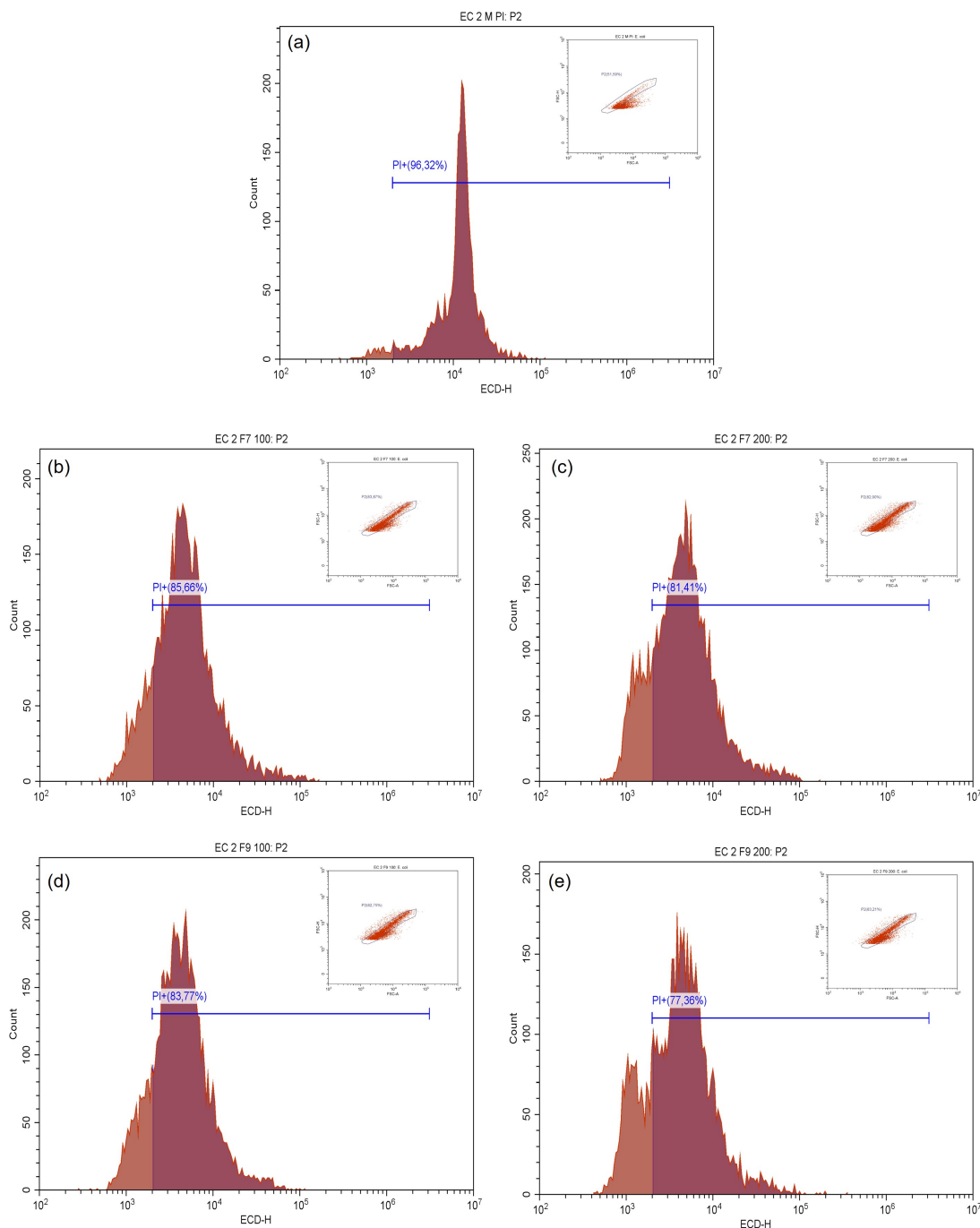


FIG. 5.8: Histogramas de fluorescência mostrando a atividade bactericida das ferritas estudadas contra *E. coli* em incubação por 1 hora. (a) Células mortas por calor; tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510) na concentração (b) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (c) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tratamento com partículas $\text{Cu}_{0,98}\text{Ag}_{0,02}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C210) na concentração (d) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (e) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na análise com as partículas C210 e C510, cerca de 77% a 85% das bactérias se encontravam na região positiva do controle na FIG. 5.8(a), demonstrando que as nanopartículas de ferrita Cu-Ag interagem fortemente com as células mesmo em um tempo muito menor de incubação. A ocorrência de um duplo pico, notável em alguns histogramas, pode ser devido à agregação das nanopartículas Cu-Ag na região marcada com

PI, que acabaram por ser coletadas como sinal celular. Ademais, de acordo com Gong et al (2007), a diferença no mecanismo de morte entre as células mortas por calor e as tratadas com prata, ou ainda a interferência de nanopartículas de ferrita com as células permeáveis à absorção do fluorocromo, podem também ser fatores da ocorrência dos dois picos.

Em ambas as análises, os resultados obtidos correspondentes às bactérias *E. faecalis* apresentam valores de mortalidade estatisticamente maiores do que os dados das bactérias *E. coli* em todas as amostras avaliadas. Embora esse fato possa ser verdadeiro, tendo em vista que bactérias Gram negativas possuem menor susceptibilidade à entrada de antimicrobianos devido a sua membrana lipídica em dupla camada, há de se considerar que os tubos de amostra referente à *E. faecalis* foram analisados no citômetro após 3 horas de incubação com PI, o que pode interferir na confiabilidade dos resultados para este tipo de bactéria. Como na fase de crescimento exponencial as bactérias se reproduzem rapidamente devido à grande atividade metabólica com nutrientes do meio de crescimento, parte do fluorocromo pode ter sido absorvido como nutriente induzindo alterações celulares ou ocultando as taxas reais na coleta de dados.

Contudo, embora o PI possua limitações para confirmar quantitativamente o percentual de morte celular, a emissão de sua fluorescência em maior grau na região positiva de controle confirma a atuação das nanopartículas como antibióticos eficientes.

5.2.3 DISCUSSÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO BIOCIDA

De acordo com Raffi et al (2010) e Sanpo et al (2013) uma série de mecanismos podem afetar a eficiência da ação antibacteriana das nanopartículas de cobre, como as tratadas neste trabalho. Embora as razões ainda não sejam completamente compreendidas, os estudos sugerem que quando *E. coli* é tratada com nanopartículas de cobre, as mudanças principais ocorrem na morfologia de sua membrana celular, que é predominantemente composta por moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) altamente empacotadas, proporcionando uma barreira de permeabilidade muito eficaz. Como células bacterianas possuem carga global negativa devido ao excesso de grupos carboxílicos presentes nas lipoproteínas da superfície celular, estes ligam os íons de cobre Cu^{2+} liberados pelas nanopartículas em meio de crescimento líquido, permitindo a aderência na superfície da parede bacteriana por adsorção e penetrando através da membrana celular.

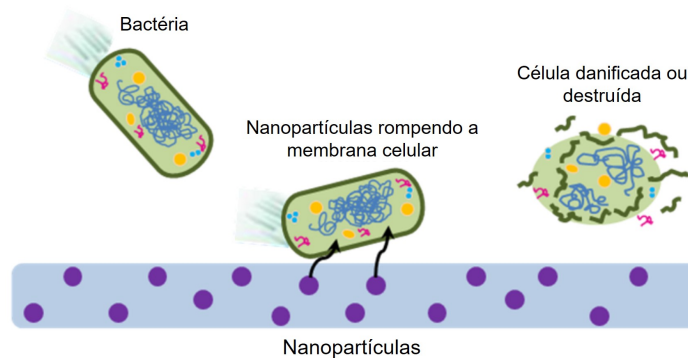


FIG. 5.9: Representação de um dos mecanismos de ação das nanopartículas frente às bactérias. Fonte: SANPO et al, 2013.

Recentemente, Gao et al (2013) e Gong et al (2007) sugeriram que os óxidos de prata liberados no processo, se ligam à membrana celular bacteriana e liberam íons de prata que alteram a permeabilidade da membrana celular, rompendo sua estrutura e levando a célula à morte. Outro mecanismo que contribui para a ocorrência da relevante bioatividade das nanopartículas Cu-Ag é a liberação de espécies de oxigênio reativo (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o superóxido (O_2^-), gerados a partir da superfície das nanopartículas (HASHIM et al, 2013). Além disso, pelo que se observa nos resultados apresentados, a taxa de penetração de um óxido ativo através da parede celular dos microrganismos é fundamental no decréscimo exponencial do tamanho das células, resultando em uma alta taxa de morte celular nas bactérias quando tratadas com os nanopós (SAWAI, 2003).

No caso de bactérias Gram negativas, como a *P. Aeruginosa* ou *E. coli* adotadas aqui, a estrutura celular pode permitir que mais íons Cu^{2+} atinjam a membrana plasmática, contudo geralmente são menos suscetíveis a agentes antibacterianos em comparação com bactérias Gram positivas. O crescimento celular bacteriano aumenta a turbidez do meio líquido de nutrição devido aos micróbios terem um índice de refração maior que a água, espalhando a luz incidente. Tal fator se evidencia na comparação entre a solução de máximo crescimento bacteriano e a solução tratada com as nanopartículas (FIG. 5.10).

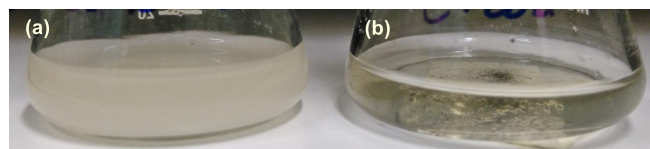


FIG. 5.10: Solução de bactérias (a) sem nanopartículas e (b) com nanopartículas Cu-Ag após 16h de incubação.

Verificou-se, portanto, que o espectro de absorvância do meio de cultura diminui na comparação entre a solução de controle com a crescente concentração de nanopartículas $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$. O mecanismo de ação ocorre ao se elevar as concentrações das nanopartículas de ferrita cobre-prata, causando um atraso no crescimento bacteriano e um efetivo efeito bactericida. Em menores concentrações de partículas, é notável apenas um atraso na fase de reprodução exponencial, enquanto em maiores concentrações o crescimento tende a cessar.

Tais resultados sustentam a teoria de que a inibição do crescimento das bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* depende da liberação de uma concentração apropriada dos íons metálicos em meio de crescimento líquido. De acordo com Hu e Xia (2006), como a ligação das nanopartículas de cobre-prata à superfície da célula bacteriana depende da área disponível para interação, e considerando o fato de nanopartículas possuírem grande área superficial, a eficácia biocida das ferritas Cu-Ag reside no aumento da relação superfície-volume de amostra em comparação com outros tipos de partículas morfologicamente maiores. Segundo Stoimenov et al (2002), essa relação é crucial para o entendimento de que as nanopartículas de óxidos metálicos possuem capacidade de transmitir citotoxicidade em microrganismos.

Conforme relatado por Xavier et al (2014), como o peróxido de hidrogênio gerado na superfície das nanopartículas pode penetrar facilmente na parede celular das bactérias e causar a destruição celular, estima-se que o tamanho nanométrico dos pós de ferrita resulte na grande liberação de espécies ativas de oxigênio reativo. Essa característica das nanopartículas, em especial das ferritas de cobre-prata, aliado aos efeitos de reação à difusão dos nanocompostos junto às células, pode resultar em fator crucial no caráter antibacteriano desses materiais.

6 CONCLUSÕES

Nanopartículas de ferrita mista Cu-Ag produzidas pelo método de combustão em solução, exibem estrutura de espinélio com tamanhos médios de cristalito na faixa de 14 a 23 nm.

A ação antibacteriana testada contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentou tendência inibitória crescente com o aumento da quantidade de prata em duas concentrações, sugerindo que o mecanismo de interação das ferritas com a membrana das células bacterianas tem forte ligação com a entrega dos íons de cobre e prata, sendo fundamentais na potencialização da ação biocida das ferritas. A eficácia biocida das ferritas Cu-Ag reside também no aumento da relação superfície-volume de amostra em comparação com outros tipos de partículas morfologicamente maiores.

Os resultados apresentados por espectrofotometria e citofluorimetria concordam que as amostras de ferrita $\text{Cu}_{0,95}\text{Ag}_{0,05}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (C510 e C507) possuem alta bioatividade contra maior parte das bactérias testadas no estudo, chegando a inibir por completo o crescimento das colônias em concentrações maiores de amostra.

Devido ao reduzido tamanho, as partículas de ferrita cobre-prata conseguem atravessar as microparedes das células das bactérias e depositam íons de prata no interior das células, levando à mudança de permeabilidade da membrana e causando a morte das células bacterianas. A taxa de penetração dos óxidos através da parede celular das bactérias pode contribuir para o aumento da inibição produzida pelas nanopartículas contra os microrganismos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesta seção, são propostas algumas medidas para continuidade e extensão do atual trabalho de pesquisa desenvolvido nesta tese.

- a) Identificar outras relações molares das ferritas $\text{Cu}_{1-x}\text{Ag}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ para diferentes concentrações nos ensaios de bioatividade;
- b) Analisar o potencial antimicrobiano das nanopartículas de cobre-prata frente à outras classes de microrganismos, como fungos e leveduras, além de outras espécies de bactérias resistentes;
- c) Verificar a possibilidade de reutilização do material utilizando remoção magnética e lavagem química, realizando estimativas quanto à eficiência antimicrobiana ao longo de vários bioensaios;
- d) Utilizar outro método de síntese, como co-precipitação e sol-gel combustão, para a fabricação de nanopartículas de cobre-prata, comparando seu potencial biocida com os materiais já desenvolvidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, K., IQBAL, A., AHMAD, M. R. et al. Structural Characterization of CuFe_2O_4 nanocomposites and synthesis by an economical method. **Science International (Lahore)**, v. 23, p. 21-25, 2011.
- ALONSO, M., FINN, E. J. **Física: um curso universitário. Vol. II: Campos e Ondas.** 2ª ed. São Paulo: Blucher, 2015.
- ASLIBEIKI, B. **Nanostructural, magnetic and electrical properties of Ag doped Mn-ferrite nanoparticles.** *Current Applied Physics*, v. 14, p. 1659-1664, 2014.
- BONEV, B., HOOPER, J., PARISOT, J. **Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 1295–1301, 2008.
- CALLISTER, W. D., RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: an introduction.** 9th ed. John Wiley & Sons, Inc, 2014.
- CIOFFI, N., TORSI, L., DITARANTO, N. et al. Copper nanoparticles/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 5255–5262, 2005.
- CLAUS, D. A standardized Gram staining procedure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, ed. 4, p. 451-2, 1992.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard.** 8 ed, CLSI document M07-A8, Wayne, 2009.
- COSTA, F. T. **Síntese, caracterização e o estudo do efeito de nanopartículas de CoFe_2O_4 @ γ - Fe_2O_3 em bactérias patogênicas.** Universidade de Brasília, Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais). Brasília, 2013.
- CRAPEZ, M. A. C. Bactérias Marinhas. In: PEREIRA, R. C. (Eds.). **Biologia Marinha.** Rio de Janeiro: Interciência. p. 83-101. vol. 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2002.
- CROFT, W. J., TOMBS, N. C., ENGLAND, R. E. Crystallographic data for pure crystalline silver ferrite. **Acta Crystallographica**, v. 17, p. 313, 1964.
- CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-Ray Diffraction.** Prentice Hall, New Jersey, 2001.
- CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials.** 2nd ed. Wiley, New Jersey, 550 p., 2009.

- DEPEYROT, J., DA SILVA, G. J., ALVES, C. R., et al. Static magneto optical birefringence of new electric double layered magnetic fluids. **Brazilian Journal of Physics**, v. 31, n. 3, p. 390-397, 2001.
- FAIRBROTHER, R. W., TAYLOR, G. **A text-book of bacteriology**. 9th ed. Londres: William Heineman, 1962.
- FIGUEIREDO, A. B. S. **Estudo comparativo dos métodos de combustão e sol-gel para obtenção de nanopartículas de CoFe_2O_4** . Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Historic evolution of infection concept. **Medicina Intensiva**, v. 28, p. 866 -872, 1995.
- GAO, M., SUN, L., WANG, Z., ZHAO, Y. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 397-404, 2013.
- GAO, N., CHEN, Y., JIANG, J. Ag@ Fe_2O_3 nanocomposites prepared by a phase transfer method with long-term antibacterial property. **Applied Materials and Interfaces**, v. 5, p. 11307-11314, 2013.
- GONG, P., LI, H., HE, X., WANG, K., et al. Preparation and antibacterial activity of Fe_3O_4 @Ag nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, 2007.
- GUO, Z., TAN, L. **Fundamentals and Applications of Nanomaterials**. Artech House, 2009.
- HWANG, C. C., WU, T. Y., WAN, J., TSAI, J. S. Development of a novel combustion synthesis method for synthesizing of ceramic oxide powders. **Materials Science and Engineering B**, v. 111, p. 49–56, 2004.
- GOMES, J. A. **Estudo das propriedades estruturais locais de fluidos magnéticos: da nanopartícula à dispersão**. Tese (Doutorado em Física). Universidade de Brasília e Université Paris VI, 2007.
- 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**, v. 333, p. 138–143, 2013.
- KUMAR, G. R., KUMAR, K. V., VENUDHAR, Y. C. Synthesis, structural and magnetic properties of copper substituted nickel ferrites by sol-gel method. **Materials Sciences and Applications**, v. 3, 87-91, 2012.
- KUZNETSOV, M. V., MOROZOV, Y. G., BELOUSOVA, O. V. Synthesis of copper ferrite nanoparticles. **Inorganic Materials**, v. 49, n. 6, p. 606–615, 2013.

- LIN, L., CUI, H., ZENG, G. et al. Ag–CuFe₂O₄ magnetic hollow fibers for recyclable antibacterial materials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 2719-2723, 2013.
- MANGALARAJA, R.V., ANANTHAKMAR, S., MANOHAR, P., GNANAM, F.D. Characterization of Mn_{0.8}Zn_{0.2}Fe₂O₄ synthesized by flash combustion technique. **Materials Science and Engineering A**, v. 367, p. 301–305, 2004.
- MELO, G. B. M. **Nanopartículas de ferrita de manganês dispersas em parafina**. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília, 2004. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>> [capturado em 17 ago. 2016]
- MURTHY, Y. L. N., KONDALARAO, T., KASIVISWANATH, I. V., SINGH, R. Synthesis and characterization of nano silver ferrite composite. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, p. 2071–2074, 2010.
- NAKHJAVAN, B., TAHIR, M. N., PANTHÖFER, M. et al. Synthesis, characterization and functionalization of nearly mono-disperse copper ferrite Cu_xFe_{3-x}O₄ nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 6909, 2011.
- OLIVEIRA, L. H. **Antibióticos versus bactérias: a corrida do século**. Revista Super Interessante, São Paulo, v. 81, junho 1994.
- PATIL, K. C., HEGDE, M. S., RATTAN, T., ARUNA, S. T. Chemistry of nanocrystalline oxide materials: Combustion synthesis, properties and applications. **World Scientific Publishing Co**, 2008.
- PIKSOVÁ, K., WEISEROVÁ, M., JEDLICKOVÁ, A., FOJTÍK A. Silver nanoparticles and their bactericidal effect. **International Conference on Nanomaterials: Research & Application**, República Checa, 2009.
- PRINCE, E., TREUTING, R. G.. The structure of tetragonal copper ferrite. **Acta Crystallographica**, v. 9, p. 1025-1028, 1956.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antibacterials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76–8, 2009.
- RAFFI, M., MEHRWAN, S., BHATTI, T. M. Investigations into the bacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 75–80, 2010.
- ROHILL, A. **Handbook of Bacteriology**. Nova Delhi: Oxford Book Company, 2010.

- ROGACHEV, A. S., MUKASYAN, A. S. **Combustion for Material Synthesis**. CRC Press, Florida, 2015.
- ROMAGNOLI, G. G. **Notas de aula em imunologia**. Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNESP, 2013.
- SALAVATI-NIASARI, M., MAHMOUDI, T., SABET, M. et al. Synthesis and characterization of copper ferrite nanocrystals via coprecipitation. **Journal of Cluster Science**, v. 23, p. 1003–1010, 2012.
- SALLE, A. J. **Fundamental Principles of Bacteriology**. 2nd ed. Londres: McGraw-Hill Book Company, 1943.
- SANPO, N., WEN, C., BERNDT, C. C., WANG, J. Antibacterial properties of spinel ferrite nanoparticles. In: **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Formatex Research Center, 2013.
- SANPO, N., BERNDT, C. C., WEN, C., WANG, J. Transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v.9, p. 5830–5837, 2013.
- SINGH, G.; PRAKASH, S. Virulence of novel nanolarvicide from *Trichoderma atroviride* against *Aedes aegypti* (Linn.): a CLSM analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 12559–12565, 2015.
- STOIMENOV, P.K., KLINGER, R.L., MARCHIN, G.L., KLABUNDE, K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v. 18, p. 6679-86, 2002.
- TAILLADES, G., BRIOIS, P., DAILLY, J., MARRONY, M., SATAD, N. Synthesis and Processing Methods: Low Cost and Easy Industrial? In: **Proton Conducting Ceramics: From Fundamentals to Applied Research**. Mathieu Marrony (Ed.), Pan Stanford Publishing, 2016.
- TONIOLO, J., TAKIMI, A. S., ANDRADE, M. J. et al. Synthesis by the solution combustion process and magnetic properties of iron oxide (Fe_3O_4 and $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) particles. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 4785–4791, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: Global report on surveillance**. Geneva, 256 p, 2014.
- XAVIER, S., CLEETUS, H., NIMILA, P. J. et al. Structural and antibacterial properties of silver substituted cobalt ferrite nanoparticles. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical**. India, 2014.
- XU, C., SUN, W., CAO, L., YANG, J. Highly efficient Pd-doped ferrite spinel catalysts for the selective catalytic reduction of NO with H_2 at low temperature. **Chemical Engineering Journal**, v. 289, p. 231-238, 2016.

ZINDER, S. H., SALYERS, A. A. Microbial Ecology: New Directions, New Importance.
In: BOONE D. R., CASTENHOLTZ R. W., GARRITY G. M. (eds). **Bergey's Manual
of Systematic Bacteriology**. Springer, Nova York, 2001.