


Nanopartículas de prata: síntese, atividade antibacteriana e comparativo com um desinfetante comum[†]

Ronaldo Silveira ¹
Elidio Angioletto ^{1,2,3}
Sabrina Arcaro ^{1,3*} 
Thauan Gomes ^{1,2}

Resumo

O surgimento de microrganismos com resistência a antibióticos e/ou desinfetantes de uso comercial representa uma ameaça à saúde humana. Assim, o desenvolvimento de alternativas que possam ser utilizadas no combate a tais microrganismos é de grande importância. Neste cenário, destaca-se a ação de nanopartículas de prata (AgNPs) para eliminação microbiológica. As AgNPs impedem o desenvolvimento da resistência microbiana devido aos múltiplos mecanismos conhecidos pelos quais elimina os microrganismos. No entanto, o uso de AgNPs ainda é limitado devido à dificuldade de síntese, estabilização e custo de produção. Por essa razão o uso de desinfetantes comuns, tais como os fabricados com base em sais quaternários de amônio, tem sido preferido. Neste estudo, uma síntese rápida de uma solução de AgNPs foi desenvolvida por co-precipitação utilizando citrato de sódio como agente redutor. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis) e espalhamento dinâmico da luz (EDL). Os espectros obtidos mostraram pico de absorvância no comprimento de onda de 420 nm. Isso caracteriza nanopartículas com baixa agregação em suspensão. A análise de EDL indicou nanopartículas com tamanho médio de 40 nm. A solução de AgNPs obtida teve atividade antimicrobiana analisada pela formação de halo de inibição de crescimento utilizando cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Um comparativo com um desinfetante a base de quaternário de amônio mostrou que a solução de AgNPs é uma alternativa potencial para a desinfecção de superfícies.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata; Eliminação microbiana; Biocida; Desinfetante.

Silver nanoparticles: synthesis, antibacterial activity and comparison with a common disinfectant

Abstract

The emergence of microorganisms with resistance to antibiotics and/or commercially used disinfectants represents a threat to human health. Thus, the development of alternatives to be used against microorganisms is of great importance. In this scenario, the action of silver nanoparticles (AgNPs) for microbiological elimination is highlighted. AgNPs prevent the development of microbial resistance due to multiple known mechanisms capable of eliminating microorganisms. However, the use of AgNPs is still limited due to the difficulty of synthesis, stabilization and production cost. For this reason, the use of common disinfectants, such as those made from quaternary ammonium salts, has been preferred. In this study, a rapid synthesis of an AgNPs solution was developed by co-precipitation using sodium citrate as a reducing agent. The nanoparticles obtained were characterized by ultraviolet visible spectroscopy (UV-vis) and dynamic light scattering (DLS). The spectra obtained showed peak absorbance at a wavelength of 420 nm. This characterizes nanoparticles with low aggregation in suspension. DLS analysis indicated nanoparticles with an average size of 40 nm. The AgNPs solution

[†]Abreviações: AgNPs, nanopartículas de prata; UV-vis, ultravioleta visível; EDL, espalhamento dinâmico da luz; RPS, ressonância plasmônica de superfície; CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima.

¹Departamento de Engenharia Química, Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil.

²Laboratório de Desenvolvimento de Biomateriais e Materiais Antimicrobianos, LADEBIMA, Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil.

*Autor correspondente: sarcaro@unesc.net



obtained had antimicrobial activity analyzed by the formation of a growth inhibition halo using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains. A comparison with a quaternary ammonium-based disinfectant showed that the AgNPs solution is a potential alternative for surface disinfection.

Keywords: Silver nanoparticles; Microbial elimination; Biocide; Disinfectant.

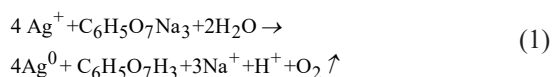
1 Introdução

O surgimento de cepas bacterianas multirresistentes têm sido recorrente, aumentando custos de tratamento e muitas vezes complicações clínicas [1]. Por isso, o uso de agentes antimicrobianos para aplicação em superfícies é de ampla importância. A ação antimicrobiana por meios alternativos tem sido especialmente valorizada e impulsionada pela pandemia do vírus SARS-Cov-2 [2].

O uso de nanopartículas de prata (AgNPs) é especialmente interessante pois a ação de AgNPs ocorre por meio de múltiplos mecanismos sinérgicos que confere baixíssima resistência microbiana nas superfícies [3]. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi a rápida síntese e caracterização de AgNPs seguida de testes microbiológicos para investigar a eficácia das nanopartículas frente a patógenos bacterianos, a saber: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A síntese de AgNPs foi realizada por meio de redução química com citrato de sódio. Ele foi escolhido, pois atua também como agente estabilizador. Além disso, ensaios microbiológicos comparativos com um desinfetante comercial foram desempenhados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Esta etapa objetivou comparar a ação antimicrobiana das AgNPs sintetizadas frente a um sanitizante comum.

2 Materiais e métodos

Neste trabalho, AgNPs foram sintetizadas utilizando a metodologia proposta por Dasaradhu e Arunachalam Srinivasan [4], com pequenas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução 0,001 mol/L de nitrato de prata (99,99% de pureza). A solução foi aquecida até a ebulição em pressão atmosférica. Uma solução de citrato de sódio dihidratado (1% (m/m), P.A) foi gotejada à vazão de 0,025 mL/s durante 320s (0,5 gotas/s), totalizando 8 mL. A coloração amarela característica, descrita por Mulfinger et al. [5], indicou a formação de AgNPs e consequente interrupção do gotejamento. A Equação 1 demonstra a reação química para formação das AgNPs.



A reprodutibilidade da síntese foi avaliada a partir da análise de 4 sínteses realizadas. A caracterização das dispersões formadas foi realizada por espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis (UV-1800 Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão)) e espalhamento dinâmico da luz

(EDL, Brookhaven NanoBrook OMNI Particle Size Analyzer (Brookhaven Instrument Corporation, EUA)).

O teste de eficiência bactericida da dispersão de AgNPs foi realizado frente às bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e gram-negativas do gênero *Escherichia coli* (ATCC 25922). Um comparativo com um desinfetante comercial a base de quaternário de amônio de 5ª geração, foi realizado devido ao amplo espectro de utilização para higienização de superfícies e ao uso já adotado em ambientes clínicos.

Os microrganismos foram cultivados em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 h em estufa bacteriológica (marca FANEM, Modelo A-LT) a 37 °C. O método de verificação da eficácia antimicrobiana foi por meio do halo de inibição em placa de ágar. As cepas foram espalhadas em uma placa contendo ágar Mueller-Hinton. Um orifício de 8 mm foi aberto no ágar. Isto foi realizado com um aro, para promover o corte em formato cilíndrico e facilitar e permitir a inserção de uma dosagem de 100 µL do bactericida testado (AgNPs e o desinfetante quaternário de amônio). As placas foram mantidas sob temperatura constante (37 °C) em estufa de cultivo bacteriológico (marca FANEM, Modelo A-LT) e após 24 h medidas do halo formado foram realizadas. Os ensaios foram feitos em triplicata. O esquema conceitual da metodologia empregada é apresentado na Figura 1.

3 Resultados e discussão

Dispersões de AgNPs apresentam o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS) e são coloridas. Neste sentido, podem ser monitoradas por UV-VIS. Nanopartículas de diferentes tamanhos e formas exibem diferentes fenômenos de RPS e, conseqüentemente, absorvem luz de diferentes comprimentos de onda (λ) [6]. A Figura 2A ilustra os espectros UV-vis das sínteses realizadas. Observa-se que as bandas são muito similares no que diz respeito ao comprimento de onda máximo, característico das nanopartículas de prata desejadas. Suaves variações no comprimento de onda máximo indicando que leves variações de tamanho ocorreram. A estimativa do tamanho das partículas pode ser efetuada de acordo com o indicado no trabalho de Mulfinger et al. [5]. As bandas de absorbância situadas entre 420 e 435 nm obtidos nas sínteses 1, 2 indicam AgNPs com tamanhos de 35 à 50 nm. Na síntese 3 a banda situada entre 415 e 421 nm indica a formação de partículas que variam entre 15 e 35 nm. A banda situada em um comprimento de onda menor (entre 395 e 410 nm) obtido na síntese 4, indica a formação de partículas de 10 a 14 nm. As diferenças nos espectros podem ser ocasionadas por alguns fatores, como

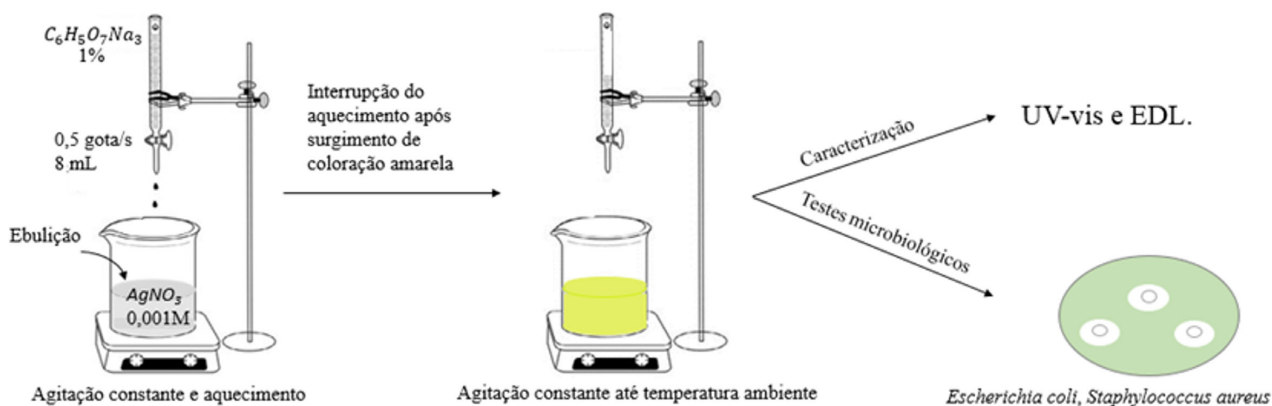


Figura 1. Esquema conceitual dos experimentos realizados

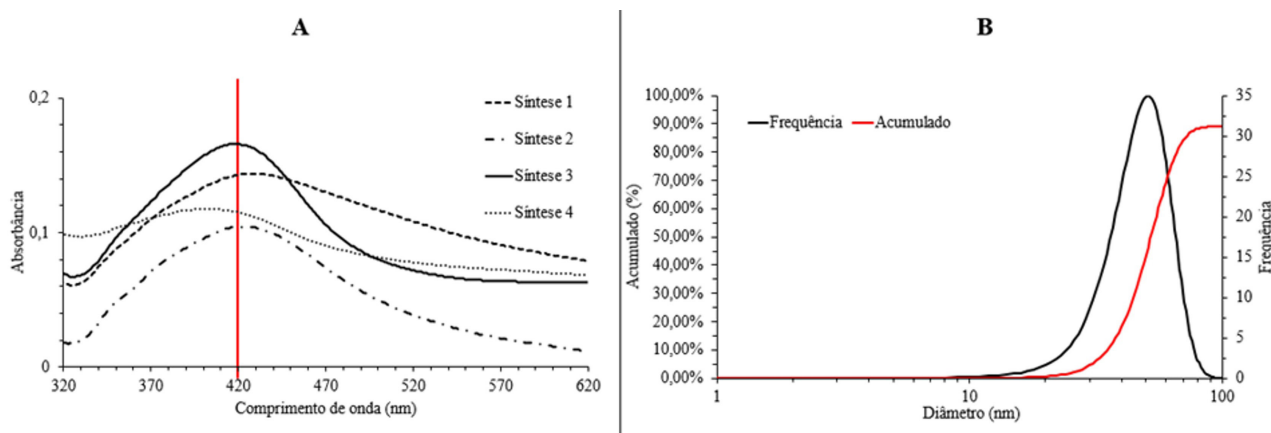


Figura 2. Espectro UV-vis (A) das soluções de AgNPs das sínteses de 1 a 4 e distribuição de tamanho de partícula (B) para a solução de AgNPs da síntese 2.

a sensibilidade na vazão de gotejamento do citrato de sódio, tempo de reação sob aquecimento e taxa de resfriamento da solução. A banda de absorbância característica para todas as sínteses indica boa reprodutibilidade no método de síntese adotado.

A Figura 2B ilustra a distribuição de tamanho de partícula para a síntese 2, obtida pela análise de EDL. Verifica-se tamanho médio de 40 nm, com 50% das partículas possuindo até 45 nm (d50). Além disso, 90% das partículas presentes em solução possuem tamanho de até 150 nm. Como apontado por Pryshchepa et al. [7], a análise por EDL apresenta uma superestimação do tamanho médio da partícula. Esse fenômeno é ocasionado porque o equipamento mede não apenas o núcleo metálico da nanopartícula, mas também o raio hidrodinâmico, definido como a esfera rígida hipotética que se difunde com a mesma velocidade do que a partícula analisada pelo EDL.

Além disso, na água com ausência de íons (água ultra-pura, utilizada nas sínteses) uma superestimação de até 10 nm ocorre devido às interações de longa distância entre as partículas. Assim, a análise por EDL corrobora com o

obtido por UV-vis, mostrando que foram sintetizadas AgNPs com tamanho de 30 à 50 nm.

Os resultados para os ensaios microbiológicos são ilustrados na Figura 3. Observa-se que a solução coloidal de AgNPs funciona como um bom agente bactericida para as cepas verificadas. Foi observado que o halo de inibição formado para a *Escherichia coli* e para a *Staphylococcus aureus* é de $4,5 \pm 0,5$ mm e $10,67 \pm 0,28$ mm, respectivamente. O desempenho das AgNPs foi superior nos testes realizados com *Staphylococcus aureus* em relação aos realizados com *Escherichia coli*, mostrando uma maior efetividade na eliminação de bactérias gram-positivas em relação a bactérias gram-negativas. Este comportamento é reportado em outros trabalhos [8,9] onde testes foram conduzidos com bactérias gram-positivas e gram-negativas representadas respectivamente por *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Como é descrito por Haixun Ji et al. [10], o mecanismo de atuação das AgNPs ocorre principalmente de 3 formas: (1) os nanomateriais podem ser adsorvidos na superfície das bactérias por interações eletrostáticas, causando destruição

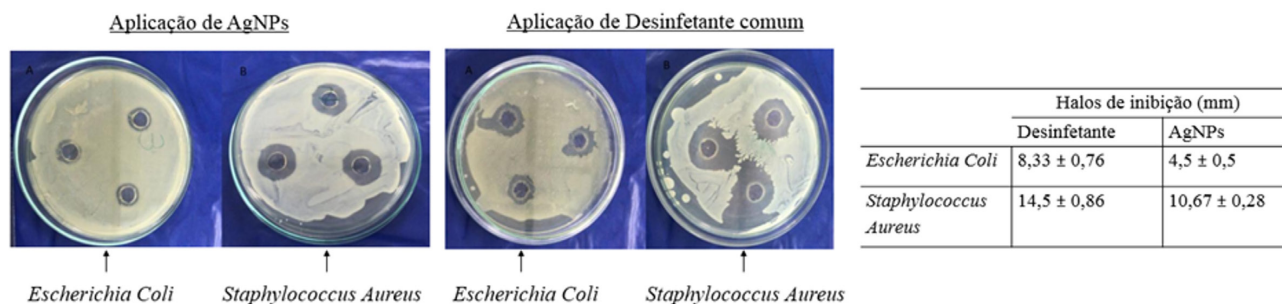


Figura 3. Halos de inibição formados nos testes microbiológicos após 24 h.

da membrana celular e subsequente perda das proteínas e inativação da bactéria. (2) Os nanomateriais podem produzir espécies reativas de radicais de oxigênio que podem desencadear o estresse oxidativo da estrutura da célula bacteriana e (3) as nanopartículas de tamanho reduzido podem penetrar no interior da célula, destruindo sua estrutura. Assim, o tamanho das nanopartículas sintetizadas tem grande importância no desempenho da solução de AgNPs como bactericida, de forma que quanto menor a distribuição das partículas, maior o efeito bactericida observado. Esse fenômeno pode ser atribuído ao aumento da área superficial das partículas [11].

Além disso, alguns trabalhos como o de Aref e Salem [9] fazem estimativas para a concentração inibitória mínima (CIM) e para a concentração bactericida mínima (CBM). Eles encontraram um CIM de 10 µg/ml para bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e 20 µg/ml para bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses valores de CIM corroboram o obtido neste trabalho, onde o desempenho frente à *Staphylococcus aureus* é superior ao obtido com *Escherichia coli*. No entanto não se pode adotar como válido um valor de CIM ou de CBM genérico para as AgNPs.

A atividade antimicrobiana obtida pela solução de AgNPs foi inferior à obtida pelo desinfetante à base de quaternário de amônio, que obteve halo de inibição de 8,33 ± 0,76 mm e 14,5 ± 0,86 mm para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* respectivamente. No entanto, destaca-se a diferença existente nas concentrações dos bactericidas utilizadas nos testes. O desinfetante foi utilizado na diluição de 1:100, conforme a indicação do fabricante. Isto

corresponde a 0,18% de ativo. A solução coloidal de AgNPs foi utilizada integralmente na forma em que foi sintetizada pela reação de co-precipitação, com uma concentração da ordem de 100 ppm. Então, a solução de AgNPs é uma solução bactericida que funciona em concentrações muito inferiores à de um desinfetante comum. Isto mostra que a síntese rápida de AgNPs seguida de aplicação em áreas de interesse representa uma potencial alternativa para a eliminação microbiana.

4 Conclusão

A análise de EDL e os espectros no UV-vis indicam que as AgNPs sintetizadas têm tamanho médio de partícula de 40 nm. Isso mostra que a síntese foi bem desenvolvida. A eficácia da solução de AgNPs como bactericida foi comprovada para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O comparativo com o desinfetante à base de quaternário de amônio, mostrou que as AgNPs têm atividade antimicrobiana inferior. No entanto as AgNPs estão em concentração muito menor, evidenciando que a solução de nanopartículas pode vir a ser uma alternativa para a descontaminação microbiológica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), a CAPES, o CNPq (307761 / 2019-3) pelo apoio a este trabalho e o laboratório LAPP da UNESC pelos ensaios de EDL.

Referências

- 1 Ning P, Liu CC, Wang YJ, Li XZ, Ranjithkumar R, Gan ZH, et al. Facile synthesis, antibacterial mechanisms and cytocompatibility of Ag–MnFe₂O₄ magnetic nanoparticles. *Ceramics International*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];46(12):20105-20115. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884220313730>
- 2 Souza HM, Savi GD, Gomes T, Cardoso WA, Cargini M, Angioletto E. Ozone application in COVID-19 triage areas and its efficiency of microbial decontamination. *Ozone Science and Engineering*. 2021;43(4):306-316. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2021.1908880>.
- 3 Navarro Gallón SM, Alpaslan E, Wang M, Larese-Casanova P, Londoño ME, Atehortúa L, et al. Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides.

- Materials Science and Engineering C. 2019 [acesso em 10 set. 2021];99:685-695. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118308130>.
- 4 Dasaradhu Y, Arunachalam Srinivasan M. Synthesis and characterization of silver nano particles using co-precipitation method. *Materials Today: Proceedings*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];33:720–723. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221478532034476X>
 - 5 Mulfingher L, Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*. 2007;84(2):322. <http://dx.doi.org/10.1021/ed084p322>.
 - 6 Lee C-F, You P-Y, Lin Y-C, Hsu T-L, Cheng P-Y, Wu Y-X, et al. Exploring the stability of gold nanoparticles by experimenting with adsorption interactions of nanomaterials in an undergraduate lab. *Journal of Chemical Education*. 2015;92(6):1066-1070. <http://dx.doi.org/10.1021/ed500819z>.
 - 7 Pryshchepa O, Pomastowski P, Buszewski B. Silver nanoparticles: synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];284:102246. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868620302943>
 - 8 Delgado-Beleño Y, Martínez-Nuñez CE, Cortez-Valadez M, Flores-López NS, Flores-Acosta M. Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications. *Materials Research Bulletin*. 2018 [acesso em 10 set. 2021];99:385-392. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025540817324388>
 - 9 Aref MS, Salem SS. Bio-callus synthesis of silver nanoparticles, characterization, and antibacterial activities via *Cinnamomum camphora* callus culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];27:101689. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881812030445X>
 - 10 Ji H, Zhou S, Fu Y, Wang Y, Mi J, Lu T, et al. Size-controllable preparation and antibacterial mechanism of thermo-responsive copolymer-stabilized silver nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Science and Engineering C*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];110:110735. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119327766>
 - 11 Ghosh T, Chattopadhyay A, Mandal AC, Pramanik S, Kuir PK. Optical, structural, and antibacterial properties of biosynthesized Ag nanoparticles at room temperature using *Azadirachta indica* leaf extract. *Zhongguo Wuli Xuekan*. 2020 [acesso em 10 set. 2021];68:835-848. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0577907320302884>

Recebido em: 10 Set. 2021

Acceto em: 10 Fev. 2022