

Atividade antimicrobiana por contato dinâmico de revestimentos anódicos.

Antimicrobial activity by dynamic contact of anodic coatings.

RESUMO

Taila Sabrina Mazzucatto
tailamazucatto@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Mariana de Souza Sikora
marianasikora@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Kauani Caldato
kauani96caldato@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

No presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia para determinar a atividade antimicrobiana de coatings de óxido suportados em seus substratos metálicos. A metodologia foi desenvolvida a partir da adaptação da norma ASTM E2149-13a, inicialmente desenvolvida para determinar a atividade antimicrobiana de agentes microbianos imobilizados em tecidos, papel, material granular ou outros sólidos tratados superficialmente. Para o desenvolvimento da metodologia utilizou-se coatings de alumina porosa (filmes de alumina crescidos eletroquimicamente sobre o alumínio) puros (Al_2O_3) e contendo prata imobilizada ($Ag-Al_2O_3$). Foram utilizados coatings sintetizados em tempos de 20 minutos e 1 hora. As amostras foram colocadas em agitação por contato dinâmico com a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os resultados obtidos demonstraram que a amostra com 1 hora de anodização sem a adição de prata promoveu maior inibição das bactérias quando comparadas as amostras de 20 minutos de anodização com e sem adição de prata. A metodologia se mostrou eficiente na determinação do teste microbiológico de óxidos imobilizados sobre substratos metálicos.

PALAVRAS-CHAVE: Coatings. Agentes microbianos. Alumina. Teste microbiológico.

ABSTRACT

In the presente paper it was developed a methodology to determine the antimicrobial activity of oxide coatings supported on their metallic substrates. The methodology was developed from the adaptation of the ASTM E2149-13a Standard, initially developed to determine the antimicrobial activity of microbial agents immobilized assets on fabrics, paper, granular material or other superficially treated solids. To develop this methodology it was used pure porous alumina coatings (Al_2O_3) (alumina films electrochemically grown on the aluminum) containing immobilized assets silver ($Ag-Al_2O_3$). Synthesized coating were used from 20 minutes to 1 hour periods. The samples were placed under agitation through dynamic contact with the gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria (ATCC 25923). The results obtained demonstrated that the sample under a 1 hour period of anodizing without the silver addition promoted a greater inhibition of bacteria when compared to the samples under a 20 minutes period of anodizing with and without the silver addition. The methodology proved to be efficient in determining the microbiological test of oxides immobilized assets on metallic substrates.

KEYWORDS: Coatings. Antimicrobial agents. Alumina. Microbiological test.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A utilização da prata como agente antimicrobiano teve início no século 19 com Herodot, romanos e gregos sabiam seu poderoso efeito bactericida utilizado para curar feridas. A prata tem propriedades antimicrobianas conhecidas, é comumente usada em revestimentos, desinfecção, bem como na forma iônica ou nanopartículas. O uso da prata incorporada ao óxido de alumínio proveniente da eletroquímica tem por finalidade produzir revestimentos resistentes à corrosão e bactericidas (CHERNOUSOVA, 2013, p. 1636; RODRIGUES, 2020).

Algumas vantagens importantes da atividade antimicrobiana a base de prata são a sua excelente estabilidade térmica e segurança ambiental. O efeito antimicrobiano da prata é amplamente utilizado na indústria têxtil, produtos plásticos moldados por injeção e em processos de revestimentos, incluindo bancadas e áreas de preparação de alimentos. A prata é tóxica para as bactérias em baixas concentrações (10^{-5} a 10^{-7} íons Ag por célula) (SAORIN, 2015, p. 171).

Recentes avanços em nanotecnologia demonstram que as partículas de prata metálica de tamanho nanométrico possuem fortes propriedades antimicrobianas, isto se deve à grande área superficial e reatividade elevada em comparação com a prata em partículas micrométricas (MORONES, 2005).

As nanopartículas de prata são um dos materiais mais estudados atualmente. São nanopartículas mais utilizadas graças as suas propriedades características, como área superficial elevada, estabilidade química e principalmente potente ação antimicrobiana frente a bactérias e fungos. São amplamente utilizadas por possuírem várias aplicações como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, catalisadores e anti-inflamatórios. Elas estão presentes em produtos agrícola, perfumaria, indústrias de alimentos e na área da medicina na preparação de materiais para o recobrimento de lesões cutâneas (DURÁN et al., 2019).

A metodologia foi desenvolvida para testar a atividade antimicrobiana dos óxidos suportados que foram crescidos eletroquimicamente a partir do metal. No presente trabalho utilizou-se coatings de alumina pura (Al_2O_3) e alumina nanoporosa incorporada com prata ($Ag-Al_2O_3$), adaptando-se a norma ASTM E2149-13a, a fim de verificar as propriedades antimicrobianas do material por ensaios de contato dinâmico.

O teste antimicrobiano desenvolvido garante um bom contato entre a bactéria e os filmes tratados através da agitação constante das amostras em uma suspensão bacteriana no período de uma hora, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de alumina puro e com a adição de prata, nos tempos de síntese anódica de 20 minutos e 1 hora, com o uso da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os coatings de alumina foram sintetizados em trabalhos de colaboração com a Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba. Para a realização dos ensaios microbiológicos, a presente metodologia foi realizada após os ensaios de difusão apresentarem resultados negativos para a inibição da bactéria, indicando que a prata é incapaz de ser lixiviada da superfície do filme de alumina. Sendo assim, a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo contato direto da bactéria com a superfície do coating contendo o agente bactericida.

A atividade antimicrobiana dos filmes de alumina frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi realizada de acordo com adaptações da norma ASTM E2149-13a que descreve o método padrão para determinação da atividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos não lixiviáveis sob condições de contato dinâmico.

Para eliminar qualquer agente microbiológico prévio, antes dos ensaios antimicrobianos as amostras de alumínio tratadas (1 X 0.5cm) foram esterilizadas em autoclave vertical a 121°C por 30 minutos e secas em estufa a 60°C.

Os ensaios foram realizados em solução tampão e o pH foi ajustado para 7,2. A bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi crescida em caldo Muller Hinton (Ion, 21 g L⁻¹), preparado de acordo com as instruções do fabricante, a 37°C por 48 h. Após o turvamento da solução, indicando o crescimento da bactéria, uma solução padronizada foi preparada pela diluição do inóculo em tampão fosfato previamente esterilizado. A padronização foi feita por espectroscopia UV-Vis considerando uma solução final com absorbância de 0,28 ± 0,02 a 475 nm que fornece uma concentração inicial de aproximadamente 1 – 3 X 10⁶ UFC mL⁻¹.

Em erlenmeyers previamente esterilizados foram adicionados 50 mL de solução tampão estéril e o volume da solução padronizada de bactéria a fim de se obter uma solução com concentração de 1 – 3 X 10⁵ UFC mL⁻¹ do microorganismo. Após a adição das soluções adicionou-se um filme de alumina em cada erlenmeyer, como controle uma solução contendo apenas as soluções (sem o filme de óxido) foi utilizada.

O ensaio de contato dinâmico das amostras com o microorganismo foi realizado por meio de agitação dos erlenmeyers em shaker por uma hora a 160 RPM e 37°C. Após este período, uma alíquota de 1 mL de cada solução onde estavam presentes o inóculo e o filme, foi retirada e diluída serialmente em tubos contendo solução salina 0,9% estéril. Para cada amostra, incluindo o controle, foram feitas diluições seriadas até a diluição 10⁻³, e em seguida uma alíquota de 100 µL de cada tubo foi plaqueada em ágar nutriente. O plaqueamento foi realizado em triplicata. Logo após as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica.

Após o tempo de crescimento, foi realizada a contagem do número de colônias formadas e o resultado foi expresso em UFC mL⁻¹. Para avaliar a atividade antimicrobiana da alumina sobre o microorganismo foi calculada a porcentagem de inibição por meio da Eq. 1 abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{B - A}{B} \times 100 \quad (1)$$

Onde B é a concentração de bactérias (CFU mL⁻¹) na amostra controle e A a concentração de bactérias em cada erlenmeyer após o contato dinâmico com os filmes de alumina. Determinou-se a significância estatística da % inibição por análise de variância uni-fatorial (ANOVA) usando nível de confiança de 95% com teste de significância (do inglês, Honest Significance Test - HSD) post-hoc de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a inibição da bactéria usando os diferentes filmes preparados. Como pode ser observado, as amostras 1 e 4

foram as que apresentaram maior atividade antimicrobiana pois promoveram maior inibição das bactérias. Como pode-se notar pela amostra preparada em 1 hora de anodização (1I), mesmo sem a adição de prata, o coating de alumina apresentou atividade antimicrobiana, sendo que a adição de prata não mostrou um aumento significativo na inativação do microorganismo. Já para as amostras preparadas com 20 minutos de anodização, a atividade antimicrobiana do coating puro é baixa (em torno de 7%) e adição de prata promove um aumento de 6 vezes na atividade antimicrobiana do material (de 7% para 43%), entretanto este valor ainda é significativamente inferior ao observado para as amostras preparadas com 1 h de anodização.

Tabela 1 – Média, desvio padrão e condições de síntese dos filmes de alumina.

| Amostras | Eficiência (Média \pm desvio padrão) | Condições de síntese |
|----------|--|------------------------|
| 1I | 86,33 \pm 6,73 ^a | 1 hora (sem prata) |
| 4N | 86,43 \pm 8,85 ^a | 1 hora (com prata) |
| 6D | 43,23 \pm 1,21 ^b | 20 minutos (com prata) |
| 3I | 7,00 \pm 2,79 ^c | 20 minutos (sem prata) |

Valores que compartilham a mesma letra não apresentam diferença estatística.

Fonte: Autoria própria, 2020.

Vale ressaltar que em ensaios anteriores por difusão em disco, não se observou atividade antimicrobiana em nenhuma das amostras analisadas. Sendo assim, a metodologia se mostrou satisfatória para a determinação da atividade antimicrobiana de agentes imobilizados. A metodologia tem potencial para a utilização em coatings crescidos em metais, não só o alumínio, mas também o titânio que tem aplicações como biomaterial.

CONCLUSÃO

A análise microbiológica mostrou-se eficaz na determinação da atividade antimicrobiana. Neste estudo a amostra com 1 hora de anodização sem a adição da prata foi a que apresentou maior atividade antimicrobiana. Podendo ser concluído que o tempo de anodização teve mais influência nesta propriedade do que a presença da prata no revestimento. Para as amostras com 20 minutos de anodização sem a presença da prata, a inativação do microorganismo foi baixa, havendo um aumento de 6 vezes na atividade antimicrobiana do material após a adição de Ag.

A metodologia desenvolvida se mostrou eficaz na determinação da atividade antimicrobiana de revestimentos imobilizados sobre substratos metálicos quando comparada à técnica de disco de difusão. Seu desenvolvimento mostra-se extremamente útil para a determinação da atividade antimicrobiana de coatings obtidos a partir da oxidação de substratos metálicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UTFPR campus Pato Branco pelos meios fornecidos possibilitando a realização deste trabalho e UFSCar - Sorocaba pela parceria no projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle and metal. Wiley Online Library, vol. 52, n. 6, p. 1636-1653, Dez. 2013. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201205923?casa_token=9ZVd3qP-xBYAAAAA%3A6UIJbdWjDe2ES2aS72vSXMgJQHkpZHdYj9fsm1UwjckXJNHfpZvmqF-F8Tn9f9WNU4vqi_L-PGuo1M. Acesso em: 20 ago. 20.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. *Química Nova*, São Paulo, vol. 42, n. 2, Feb. 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422019000200206. Acesso em: 20 ago. 20.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346- 2353, 2005. Disponível em: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/16/10/059/meta?casa_token=uxVcyZnJCGQAAAAA:IYKQd7eSaZT3y_Z7HhOMgq8_HEKx09e1bX7A18J-aV85TCtzQXxF49rxerR_4nKt0hTmeyv74zBlkq4. Acesso em: 20 ago. 20.

RODRIGUES, A. **Aplicação de plasma electrolytic oxidation (PEO) para síntese de óxidos anódicos sobre alumínio em eletrólito contendo íons Ag⁺**. Dissertação (Mestrado na Área de Ciência dos Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Sorocaba, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13179/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20corrigida_final.pdf?sequence=1. Acesso em: 20 ago. 20.

SAORIN, F. **Estudo de vida útil de alimentos acondicionados em embalagens com partículas de prata incorporadas na estrutura do material**. Dissertação (Mestrado na Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/158840/337257.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 ago. 20.