



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS – UEG  
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – CCET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS  
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

SUÉLLEN KELCYA GOMES DA SILVA

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO CÍTRICO NO CRESCIMENTO DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Anápolis - GO

2018

SUÉLLEN KELCYA GOMES DA SILVA

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO CÍTRICO NO CRESCIMENTO DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rebelo Guilherme  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Plínio Lázaro Faleiro Nunes

Anápolis - GO

2018

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SSU944  
e  
SILVA, SUÉLLEN KELCYA GOMES DA  
EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO CÍTRICO NO CRESCIMENTO DE  
Pseudomonas aeruginosa / SUÉLLEN KELCYA GOMES DA SILVA;  
orientador LUCIANA REBELO GUILHERME; co-orientador PLÍNIO  
LÁZARO FALEIRO NAVES. -- Anápolis, 2018.  
63 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado  
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) --  
Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.

1. Nanotecnologia. 2. Antibiótico. 3. Ácido orgânico. 4. Microbiologia. I.  
REBELO GUILHERME, LUCIANA , orient. II. LÁZARO FALEIRO  
NAVES, PLÍNIO , co-orient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo agradeço ao Pai Celestial e a Nossa Senhora Aparecida, que me concebeu a graça da vida, força e saúde para realizar mais essa etapa.

Agradeço principalmente a minha mãe Selma Gomes Pais da Silva, que nos momentos que titubeei sempre esteve pronta a me apoiar e nunca me permitiu desistir. Que sempre com todo amor e carinho cuidou dos meus dias difíceis e com sua oração me ajudou a chegar até aqui.

Ao meu pai Waldemar Rodrigues da Silva, que sempre me estendeu a mão e contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

A minha irmã Joyce Kelly Gomes da Silva pelo apoio e incentivo.

Ao meu companheiro Ronaldo Martins Nascimento Filho pela compreensão e pelos momentos de descontração.

A minha orientadora Luciana Rebelo Guilherme por seus conhecimentos e ensinamentos que possibilitaram a realização da etapa físico-química deste trabalho.

Ao meu co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves por seus conhecimentos e ensinamentos que possibilitaram a realização da etapa microbiológica.

Ao Francisco Nunes de Souza Neto, que com sua bondosa ajuda possibilitou a realização das técnicas de caracterização na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

Ao meu amigo Marcos Rodrigues de Oliveira que me ajudou ativamente.

A Cleciane Souza Sales que disponibilizou seu tempo para auxiliar na realização da técnica de absorção atômica.

Ao CAPS que me permitiu realizar este mestrado.

Aos professores da banca examinadora, que aceitaram participar, e são peças fundamentais para a concretização desta tese.

Muito obrigada!

“Até aqui me ajudou o senhor!”

*Ebenézer*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO (NPF) .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1. Síntese das NPF.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2. Síntese das NPF pelo método de coprecipitação .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. FUNCIONALIZAÇÃO DAS NPF COM ÁCIDO CÍTRICO.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3. IMPACTO DAS NPF EM CÉLULAS BACTERIANAS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 O papel da parede celular bacteriana na interação entre células bacterianas e NPF .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. DETERMINAÇÃO DA DL<sub>50</sub> .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6. CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. ETAPA FÍSICO-QUÍMICA.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.1. Síntese das NPF.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.2. Funcionalização com ácido cítrico e esterilização das NPF .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.3. Determinação da concentração de ferro.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.4. Técnicas de caracterização .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.4.2. Difratomia de raios X .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.4.3. Potencial Zeta.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. BIOENSAIOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.1. Determinação da DL<sub>50</sub>.....</b>	<b>37</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. OBTENÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NPF.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.2. Difratomia de raios X .....</b>	<b>45</b>

<b>5.3.3. Potencial Zeta.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4. DETERMINAÇÃO DA DL<sub>50</sub> .....</b>	<b>49</b>
<b>5.5. AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de formação das NPF pelo método de coprecipitação.....	19
Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido cítrico .....	21
Figura 3 – Esquema dos possíveis modos de ação antimicrobiano das NPF .....	22
Figura 4 – Esquema das estruturas celulares diferenciais em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	25
Figura 5 – Esquema com as fases da curva de crescimento bacteriano .....	31
Figura 6 – Esquema da metodologia empregada na funcionalização das NPF e NPFF.....	34
Figura 7 – Esquema da metodologia empregada no teste da determinação da DL <sub>50</sub> .....	37
Figura 8 - Esquema com as concentrações das dispersões de NPF e NPFF testadas para a avaliação da DL <sub>50</sub> .....	38
Figura 9 - Esquema da metodologia empregada na manutenção e reativação das cepas bacterianas .....	39
Figura 10 - Esquema da metodologia empregada na determinação da curva de crescimento bacteriano.....	40
Figura 11 – Dispersão das NPF (coloração marrom) e NPFF (coloração negra) representadas da esquerda para a direita. ....	42
Figura 12 - NPF e NPFF (sólidas) representadas da esquerda para a direita submetidas a um campo magnético com ímã de neodímio .....	43
Figura 13 - Espectro de infravermelho obtido a partir de NPF, NPFF e ácido cítrico.....	44
Figura 14 - Esquema do processo de ligação do ácido cítrico às NPF .....	45
Figura 15 - Difratoograma de raios X das NPFF em contraste com padrões tabelados de maghemita e magnetita disponíveis em bancos de dados “ <i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i> ” .....	46
Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão de NPF e NPFF e histograma da distribuição da tamanho das nanopartículas .....	48
Figura 17 - Visualização microscópica de <i>Artemia salina</i> em solução de dicromato de potássio (ampliação de 60x) .....	50

Figura 18 - Visualização microscópica de <i>Artemia salina</i> com NPF em seu sistema digestório (ampliação de 10x, 40x e 60x, respectivamente).....	50
Figura 19 - Curva de crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 e ATCC 9027 em água deionizada.....	51
Figura 20 - Curva de crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 e ATCC 9027 em TSB....	51

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do PZ das amostras de NPF e NPFF .....	47
Tabela 2 - Resultados da determinação da $DL_{50}$ para NPF, NPFF e dicromato de potássio ...	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Espectroscopia de absorção atômica de chamas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> - Tipo de Coleção de Cultura Americana
Atm	Atmosfera
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Mediana
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difratometria de raios X
COOH <sup>-</sup>	Carboxila
EIV	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro tetrahidratado
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro hexahidratado
FTIR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
Nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas
NPF	Nanopartículas de Óxido de Ferro
NPFF	Nanopartículas de Óxido de Ferro Funcionalizadas com Ácido Cítrico
OH <sup>-</sup>	Hidroxila
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
SFE	Solução Fisiológica Estéril
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> - Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## RESUMO

Os nanomateriais possuem propriedades únicas relacionadas ao seu tamanho. Por essa razão, a nanotecnologia tem atraído muita atenção da comunidade científica. Neste contexto, nanomateriais de óxido de ferro, em especial, têm sido explorados para diversos fins, incluindo cosméticos, tintas, plásticos, têxteis e inclusive como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas.

Nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por coprecipitação, funcionalizadas com ácido cítrico e foram caracterizadas por difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de absorção atômica de chamas, potencial Zeta e microscopia eletrônica de transmissão. Bem como foi avaliado a dose letal mediana para o microcrustáceo *Artemia salina* e avaliado a atividade antimicrobiana contra bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

As nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas e as nanopartículas de óxido de ferro sem funcionalizar apresentaram diâmetro médio de 10 nm, e concentração de íons ferro por mL de 23 mg para as nanopartículas de óxido de ferro não funcionalizadas e 7 mg de íons para as nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas, bem como carga superficial de +33 e -9 mV, respectivamente, pelo potencial Zeta. Ambas nanopartículas de óxido de ferro apresentaram atóxicas para o teste de determinação letal mediana para *Artemia salina*, e demonstraram efeito antimicrobiano contra bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027, observados na inibição média de cerca de  $7,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> do crescimento destas bactérias em água deionizada e em meio caldo soja tripticaseína. Mostrando ser agentes antimicrobianos efetivos podendo ser consideradas uma alternativa inovadora contra o desenvolvimento de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

**Palavras-chave:** nanotecnologia, antibiótico, ácido orgânico, microbiologia.

## ABSTRACT

Nanomaterials have unique properties related to their size. For this reason, nanotechnology has attracted much attention from the scientific community. Iron oxide nanomaterials have been used for various purposes including cosmetics, paints, plastics, textiles and even as antimicrobial agents against pathogenic bacteria.

Iron oxide nanoparticles were synthesized by coprecipitation, functionalized with citric acid and characterized by X-ray diffraction, infrared spectroscopy, flame atomic absorption spectroscopy, zeta potential and transmission electron microscopy. As well as determined the median lethal dose by the microcrack *Artemia salina* and evaluated the antimicrobial activity of these nanomaterials against bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Iron oxide nanoparticles functionalized and iron oxide nanoparticles no functionalized had a mean diameter of 10 nm, and iron ion concentration per mL of 23 for iron oxide nanoparticles functionalized and 7 mg of ions for iron oxide nanoparticles no functionalized as well as surface charge of +33 and -9 mV, respectively, by zeta potential. Both iron oxide nanoparticles were no toxic for the median lethal determination test for *Artemia salina* and showed an antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, observed in the mean inhibition of about  $7.0 \cdot 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup> of the growth of these bacteria in deionized water and in trypticasein soy broth medium . This way it shows to be effective antimicrobial agents and can be considered an innovative alternative against the development of *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** nanotechnology, microorganisms, organic acids, antimicrobial.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca de novas estratégias para terapia de doenças infecciosas associadas a agentes patogênicos resistentes a multidrogas tem recebido crescente atenção no meio científico (JAMIL; IMRAN, 2017). Neste contexto, Nanopartículas de óxido de ferro (NPF) estão sendo elencadas como uma alternativa promissora no combate ao crescimento microbiano (ARAKHA *et al.*, 2015).

NPF são comumente utilizadas na comunidade científica devido a vantagem que possuem quanto a facilidade e versatilidade de modificação da superfície, a qual ocorre devido à presença de grupos hidroxila na superfície desses óxidos. Bem como à baixa toxicidade *in vivo* que NPF apresentam (BECK *et al.*, 2011), associada ao fato de NPF serem metabolizadas e utilizadas na formação da hemoglobina sanguínea (WEISSLEDER *et al.*, 1989).

A atividade antimicrobiana das NPF ocorre devido a capacidade de interagirem com a membrana celular bacteriana, através de interações eletrostáticas, que levam a indução do estresse oxidativo na célula e à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando a morte bacteriana (WU *et al.*, 2015).

A produção de ERO, ocorre devido a influência de foto ou quimio ativação, é um mecanismo comum de estresse/toxicidade que ocorre em bactérias quando estão expostas a algum óxido metálico, como as NPF. ERO é um termo generalizado que engloba formas radicais e não- radicais de espécies químicas de alta energia, tal como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radicais superóxidos ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (SALEH *et al.*, 2015).

Em decorrência ao exposto, NPF apresentam atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, esta bactéria por sua vez é um bacilo Gram-negativo, que mais acomete pacientes imunocomprometidos, podem causar dermatites, infecções urinárias e até infecções sistêmicas. Possuem alta patogenicidade devido à capacidade de sintetizarem fatores de virulência quando expostas a condições inóspitas, habilidade de se desenvolverem em dispositivos médicos como implantes, cateteres, próteses, tecidos corporais e ainda de persistirem em tratamentos antimicrobianos (AKBARI; ALI, 2017).

Quando organizadas em biofilme (forma séssil) tornam-se mais resistentes ao tratamento antimicrobiano do que quando em forma planctônica (vida livre). Esta resistência ocorre devido

a difícil penetrabilidade dos fármacos pela barreira de exopolissacarídeos formada ao redor do biofilme (BRIDIER *et al.*, 2010; DAMACENO; FARIAS, 2016). Esta barreira de exopolissacarídeos também chamada de matriz extracelular, possui composição complexa e heterogênea. Serve como uma barreira de proteção ao biofilme, tendo como constituinte principal os polissacarídeos, e também componentes próprios do ambiente como proteínas, fosfolípídios e matéria inorgânica (SUTHERLAND, 2001).

O desenvolvimento do biofilme destas bactérias pode ser inibido por interações específicas com NPF, pois no geral o tamanho das células bacterianas está na faixa micrométrica, enquanto as membranas celulares externas têm poros na faixa de nanômetros (AKBARI, ALI, 2017). Uma vez que as NPF são menores em tamanho do que os poros bacterianos, possuem uma capacidade única de atravessarem a membrana celular (BEYTH *et al.*, 2015).

Assim, o presente trabalho propôs avaliar as potenciais propriedades antimicrobianas de NPF junto às do ácido cítrico, através da funcionalização, e observar o efeito que estes apresentam no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Nanopartículas de óxido de ferro (NPF)

Nos últimos anos a utilização da nanotecnologia vem ganhando destaque na comunidade científica, fato que tende a aumentar ainda mais. É estimado que a nanotecnologia será empregada por mais de 6 milhões de pessoas em todo o mundo em estudos científicos e em aplicações tecnológicas até o final desta década (KAUR *et al.*, 2014). As NPF são um dos principais materiais que se enquadram dentro desta perspectiva, pois possuem ampla aplicabilidade e são exploradas na comunidade científica desde 1980 (KHALAFALLA; REIMERS, 1980).

A crescente utilização de NPF se deve ao leque de aplicações que elas oferecem (LU; SALABAS; SCHUTH, 2007). Podem ser empregadas em diversas áreas, como na administração de fármacos e genes (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007) em odontologia (HAMOUDA, 2012) em diagnósticos clínicos (KOO *et al.*, 2005), e principalmente em alternativas antimicrobianas (JAMIL; IMRAN, 2017).

Sua ampla aplicabilidade ocorre principalmente devido ao nanotamanho que apresentam e ao efeito magnético. Em aplicações microbiológicas o diâmetro médio das NPF são considerados um poderoso aliado, já que circundam entre 1 a 100 nanômetros (nm). Considerando que 1 nm corresponde a 1 bilionésimo de metro ( $1.10^{-9}$  m), logo, são NP extremamente diminutas (ALI *et al.*, 2016).

São consideradas altamente reativas e devido a sua nanoestrutura apresentam alta reatividade (HUA *et al.*, 2012). Estas áreas superficiais são inversamente proporcionais ao tamanho, pois são estruturas altamente diminutas, mas em contrapartida possuem grande área de contato quando agrupadas. Assim, quanto maiores as áreas superficiais disponíveis, maior a reatividade que estas NPF apresentam (ALI *et al.*, 2016; BERRY; CURTIS, 2003).

Além das NPF existem outros variados tipos de NP inorgânicas, que podem conter íons de ferro, de zinco, de manganês, entre outros, os quais dependendo de seu material de composição podem fornecer elementos minerais essenciais para as células humanas (ARAKHA *et al.*, 2015). Todavia dentre estas NP inorgânicas citadas, as de óxido de ferro são consideradas as mais utilizadas em aplicações biomédicas e microbiológicas, fato que se deve às vantagens

que NPF apresentam relacionadas a baixa toxicidade, facilidade de síntese, boa biocompatibilidade e ao baixo custo de produção (AKBAS; KOKUMER, 2015).

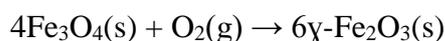
NPF podem ser encontradas em diversas formas na natureza, sendo as mais comuns na forma de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Estas formas apresentam grande importância para a área científica (ARAKHA *et al.*, 2015). A hematita é o tipo de óxido de ferro conhecido há mais tempo, é geralmente encontrado em rochas e solos. A magnetita por sua vez apresenta destaque quanto ao magnetismo inerente. Já a maghemita ocorre nos solos como um produto do intemperismo da magnetita, ou como produto do aquecimento de outros óxidos de ferro, e é mais estável em relação às demais formas (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). Dentre estas formas citadas, a magnetita e a maghemita serão melhor discutidas, pois são as de interesse do presente trabalho.

Quanto à composição, a magnetita é um óxido de ferro formado por íons ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na proporção de 1:2 cuja fórmula molecular pode ser escrita como  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$  ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (GUPTA; GUPTA, 2005). A sua reação de precipitação ocorre em meio aquoso e é dada pela equação 1 abaixo (WU *et al.*, 2015).



Equação 1 - reação de obtenção da magnetita

Por outro lado, a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) é o equivalente oxidado da magnetita e ambas possuem propriedades físicas semelhantes. A maghemita por sua vez pode ser obtida pela oxidação da magnetita conforme a equação 2 abaixo (HARRYS, 2002).



Equação 2 – reação de obtenção da maghemita

### 2.1.1. Síntese das NPF

Tem sido um desafio científico e tecnológico a obtenção de NPF com tamanho e forma controlados. Por isso a escolha do método de síntese é uma importante questão na obtenção do tamanho final das NPF. Diversos métodos foram estudados e desenvolvidos incluindo métodos bastante elaborados como condensação por gás, redução por aerosol (LAURENT *et al.*, 2008), e ablação por laser (ISMAIL *et al.*, 2015). No entanto, mesmo se bem elaborados, estes métodos nem sempre são a melhor escolha, pois não permitem o controle das propriedades morfológicas

das NPF. É possível obter melhores resultados por métodos de síntese mais simples que incluem rotas úmidas (APHESTEGUY *et al.*, 2015), como o método de síntese por microemulsão, o sol-gel, as reações hidrotérmicas e método de coprecipitação (GRIGORIE *et al.*, 2015; KEERTHANA *et al.*, 2015). Dentre os métodos citados, o de coprecipitação foi o de escolha para o presente trabalho e será melhor discutido logo adiante.

### 2.1.2. Síntese das NPF pelo método de coprecipitação

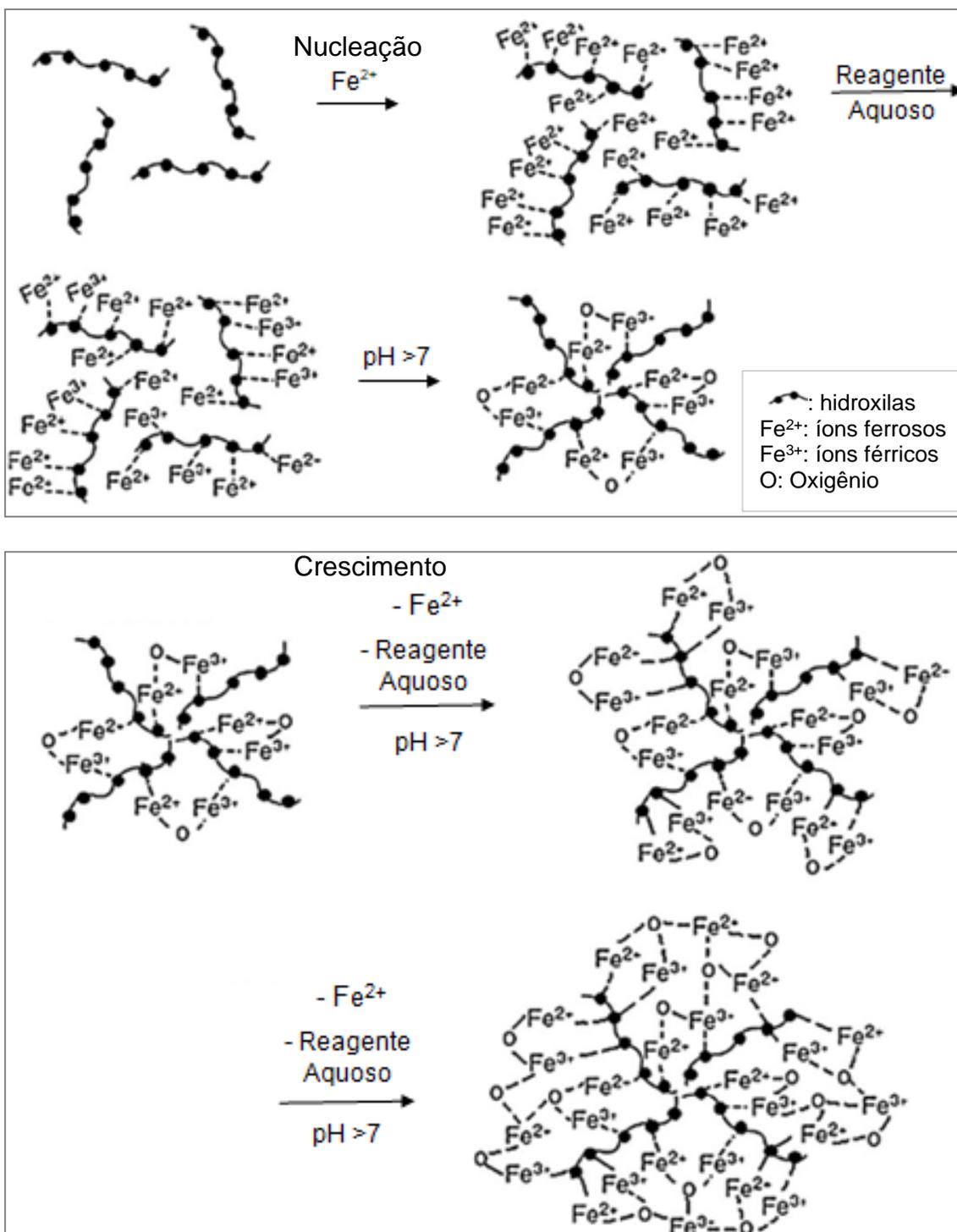
A síntese pelo método de coprecipitação consiste em misturar sais de ferro divalente ou também chamado de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e sais de ferro trivalente, comumente chamado de íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (HARRIS, 2002). Essa mistura tem que ocorrer em uma razão estequiométrica de 1:2 em solução aquosa com posterior adição de uma base para que ocorra a precipitação (CHEN *et al.*, 2005).

Neste método, a razão estequiométrica de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  influencia diretamente na obtenção de NPF com alto grau de pureza, sendo que são necessários 2 mols de íons  $\text{Fe}^{3+}$  para cada mol de íon  $\text{Fe}^{2+}$ . Essa proporção se deve a tendência da redução da concentração dos íons  $\text{Fe}^{3+}$  ao longo da reação devido à instabilidade que apresentam na presença do oxigênio atmosférico, reduzindo-se para  $\text{Fe}^{2+}$  (HARRIS, 2002).

De forma geral o método de coprecipitação é considerado vantajoso devido à facilidade de síntese, à homogeneidade química, ao alto rendimento (BABES *et al.*, 1999), ao tempo de reação rápido, à boa reatividade e uniformidade, à baixa temperatura de reação, à obtenção de partículas finas e puras e ao baixo custo de síntese (CHEN *et al.*, 2005).

No processo de coprecipitação, ocorre duas etapas: a nucleação e o crescimento (Figura 1). Na etapa da nucleação ocorre uma rápida reação, em que os núcleos são criados quando há a supersaturação dos íons ferro no meio, e em seguida, estes núcleos crescem lentamente através da combinação de difusão de átomos para o núcleo (JOLIVET; CHANÉAC; TRONC, 2004).

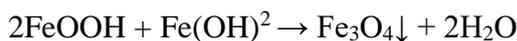
Figura 1 – Esquema do processo de formação das NPF pelo método de coprecipitação



Fonte: GORDON *et al.*, 2011.

No processo de nucleação ocorre a hidroxilação dos íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  em pH básico entre 8 a 14. Nessa reação é observável a formação de um precipitado negro após a adição de uma base, cuja equação está apresentada abaixo (Equação 3) (JOLIVET; CHANÉAC; TRONC, 2004).

Nesta etapa a fase de nucleação é baseada inicialmente na complexação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  com as hidroxilas, seguida de oxidação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (GORDON *et al.*, 2011).



Equação 3 – Reação de hidroxilação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$

A hidroxilação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  e a nucleação das NPF são reações rápidas que apresentam alto rendimento. Nelas, os cristais de magnetita são vistos instantaneamente após a adição da base a fonte de ferro (OCANA; RODRIGUEZ-CLEMENTE; SERNA, 1995).

Logo após a nucleação, ocorre o crescimento dos núcleos, lentamente por difusão, em que os solutos se incorporam lentamente na superfície dos cristais (OCANA; RODRIGUEZ-CLEMENTE; SERNA, 1995). Assim se o processo de nucleação se sobressair em relação ao do crescimento, as NPF obtidas serão em sua maioria pequenas. Caso contrário, será obtido maior quantidade de NPF de diâmetro maiores (LAURENT *et al.*, 2008).

Neste método de coprecipitação a temperatura influencia diretamente na formação das NPF. Visto que temperaturas mais elevadas (acima de 80 °C) contribuem para a formação da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), enquanto temperaturas mais baixas (abaixo de 60 °C) favorecem a formação da maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (KAUR *et al.*, 2014). Outro fator que também influencia na formação das NPF é a presença da velocidade de agitação, que contribui para a obtenção de NPF com menores diâmetros de tamanho (LAURENT *et al.*, 2008).

No processo de síntese das NPF, medidas podem ser adotadas para contribuir na estabilização e no controle do tamanho das NPF sintetizadas. Um fator bastante empregado para essa finalidade, é o processo de funcionalização (MASSART; ROGER; CABUIL, 1995). Este processo se baseia na adição de grupos funcionais ligantes às NPF (KEERTHANA *et al.*, 2015).

Há diversos grupos ligantes que podem ser empregados na funcionalização, como ânions orgânicos quelantes, citrato, ácido oleico, entre outros (LU; SALABAS; SCHUTH, 2007). Os citratos, por sua vez, contribuem no controle do tamanho das NPF deixando-as mais diminutas (LAURENT *et al.*, 2008), devido a reação de quelação. Esta reação é uma interação química que ocorre através de ligações covalentes entre os íons citrato com os íons ferro. Deste modo é

evitado que ocorra a etapa de crescimento das NPF pós nucleação (BEE; MASSART; NEVEU, 1995).

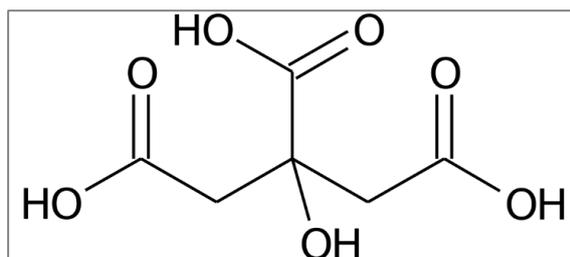
Também há outro provável mecanismo que coopera no controle do tamanho das NPF, o qual se deve a adsorção de citrato nos núcleos das moléculas de ferro. Essa adição leva à hidrólise da molécula e à inibição do crescimento das NPF, resultando então na obtenção de NPF de menor diâmetro (BEE; MASSART; NEVEU, 1995).

## 2.2. Funcionalização das NPF com ácido cítrico

A funcionalização das NPF auxilia a estabilizar as cargas superficiais e conseqüentemente a formação da dispersão coloidal (ALI *et al.*, 2016). Estes fatores para auxílio da estabilização são de grande valia pois as NPF quando estão em dispersão coloidal possuem forte tendência a agregação natural e se depositam no fundo do recipiente (GUPTA; GUPTA, 2005). Essa deposição ocorre devido a tendência que possuem de alcançar um ponto mínimo de energia termodinâmica, que se deve ao tamanho reduzido, bem como, a forte atração magnética, as forças de Van der Waals e as superfícies altamente carregadas que apresentam (SELVAKUMAR *et al.*, 2014).

Neste contexto, o agente funcionalizante de escolha do presente trabalho foi o ácido cítrico. Este ácido por sua vez inibe as células bacterianas através da desnaturação do DNA, é um ácido orgânico, agente químico, antimicrobiano que apresenta atividade contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* pré-formados (AKBAS; KOKUMER, 2015). Possui três grupos carboxilas, fórmula química  $C_6H_8O_7$  e estrutural representada na Figura 2. Sua atividade antimicrobiana pode ser relacionada à acidez que apresenta ocorrente devido aos três grupos carboxilas ( $COO^-$ ) da cadeia (AKBAS; KOKUMER, 2015).

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido cítrico



Fonte: Autoria própria, 2018

O uso do ácido cítrico foi utilizado na efetivação da eliminação de biofilme em tubulações de máquinas de hemodiálise. Que quando combinada com ácido cítrico apresentou maior eficiência na esterilização dos equipamentos (HOLMES *et al.*, 2004).

### 2.3. Impacto das NPF em células bacterianas

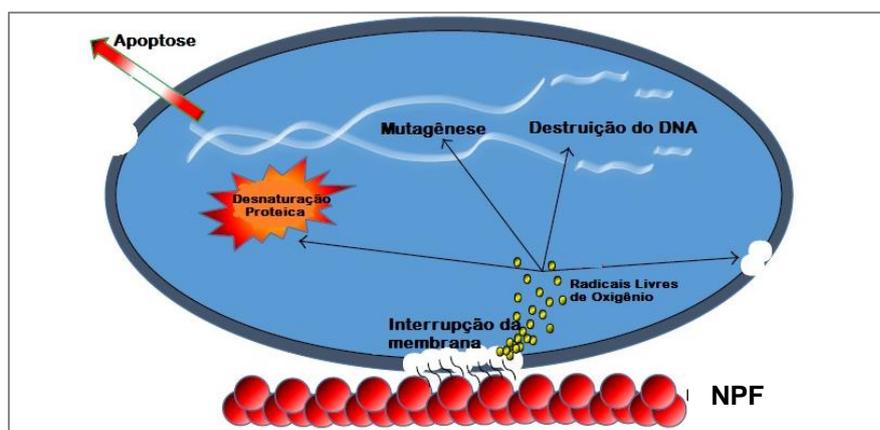
Diversas pesquisas têm sido realizadas para explicar a eficácia dos mecanismos antibacteriano das NPF (CHANG *et al.*, 2012; DJURIŠIĆ *et al.*, 2015; MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013; NEL *et al.*, 2006; REIDY *et al.*, 2013; SALEH, *et al.*, 2015), porém a literatura existente ainda é um pouco controversa e incompleta quanto a estes efeitos.

Dentre os mecanismos propostos mais citados, estão o da formação de ERO, o da liberação de íons de ferro, o da internalização de partículas em bactérias e o da destruição mecânica direta da membrana celular bacteriana (STANKIC *et al.*, 2016).

Entre estes mecanismos, o mais discutido é o da produção de ERO (ISMAIL *et al.*, 2015), mediado por estresse oxidativo com peroxidação lipídica da membrana bacteriana. O mecanismo por ERO provoca danos à membrana secundária da célula, prejudica a função do DNA e leva à destruição da bactéria (STANKIC *et al.*, 2016).

A Figura 3 ilustra os mecanismos de ação das NPF na produção de ERO em células bacterianas (STANKIC *et al.*, 2016). ERO são caracterizados como compostos químicos oriundos do processo de ativação ou redução do oxigênio molecular. São moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem (BEYTH *et al.*, 2015).

Figura 3 – Esquema dos possíveis modos de ação antimicrobiano das NPF



Fonte: BEYTH *et al.*, 2015.

Estes radicais livres de oxigênio, são gerados em grandes quantidades quando ocorre algum estresse oxidativo na célula, afetam os mais variados tipos de moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, fato que leva a desnaturação do DNA microbiano e conseqüentemente morte celular (SALEH *et al.*, 2015).

ERO podem atuar em diversos locais na célula bacteriana. Quando atuam extracelularmente podem perturbar o equilíbrio entre o estresse oxidativo e a defesa antioxidante das células, o que resulta na peroxidação lipídica da membrana ou na oxidação proteica, causando a ruptura da membrana. Quando intracelular levam a ruptura do DNA e da membrana lipídica da bactéria, ocasionando a necrose e a apoptose da célula bacteriana (BEYTH *et al.*, 2015).

No mecanismo em que ERO provoca a peroxidação lipídica na célula bacteriana, ocorre a degradação oxidativa dos lipídios, através da captura de elétrons dos lipídios nas membranas celulares o que leva a desnaturação da membrana e conseqüente morte bacteriana (SOARES *et al.*, 2016).

Outro mecanismo também bastante discutido é o mecanismo da liberação de íons ferro (MAHDAVI *et al.*, 2013), que ocorre quando íons ferro provenientes das NPF reagem com a membrana celular bacteriana e com outros componentes celulares, e catalisam a produção de ERO fora da célula (Equação 4), dentro ou entre a membrana celular causando efeito tóxico na bactéria (WU *et al.*, 2015).



Equação 4 – Reação de formação de ERO por íons ferro

Com a liberação dos íons de ferro na célula bacteriana, pode ocorrer o aumento da permeabilidade da membrana celular que leva a indução do extravasamento do conteúdo celular e causa a ruptura celular e do DNA, levando a morte bacteriana (BEYTH *et al.*, 2015).

Em um estudo passado foi comprovado que NPF foram capazes de promoverem o aumento da permeabilidade de bactérias Gram-positivas *Rhodococcus eritropolis* levando ao extravasamento celular (ANSARI *et al.*, 2009) assim como promoveram alterações morfológicas nas estruturas bacterianas (CHATTERJEE; BANDYOPADHYAY; SARKAR, 2011) comprovando o potencial efeito antimicrobiano destas NPF.

Sobretudo, os mecanismos antimicrobianos das NPF dependem do tipo específico da bactéria, pois determinadas bactérias apresentam diferentes sensibilidades em suas particularidades. Neste quesito diversos gêneros de bactérias foram estudados para avaliar o efeito das NPF sobre elas (DJURIŠIĆ *et al.*, 2015; NEL *et al.*, 2006; REIDY *et al.*, 2013; SALEH *et al.*, 2015). Entre estes estudos, bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*) tiveram seu crescimento inibido quando foram combinadas com NPF (CHATTERJEE; BANDYOPADHYAY; SARKAR, 2011; EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2015; RAMTEKE *et al.*, 2010).

Por outro lado há relato na literatura que cita que NPF promoveram o crescimento de células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* em indivíduos imunocomprometidos. Em que os resultados estão correlacionados à propensão de NPF em dissolver mais facilmente e gerar  $Fe^{3+}$  (aq) em solução, deste modo, podendo agir dependendo do tamanho das NPF como uma fonte de ferro exógena. No entanto neste mesmo relato há a informação de que estudos posteriores devem ser avaliados para confirmar esta afirmação (BORCHERDING *et al.*, 2014).

Mesmo que existam ambiguidades quanto aos efeitos antimicrobianos das NPF, na literatura encontram-se pesquisas que comprovam os efeitos antimicrobianos das NPF tanto contra bactérias Gram-positivas quanto contra Gram-negativas (CHATTERJEE; BANDYOPADHYAY; SARKAR, 2011; EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2015; RAMTEKE *et al.*, 2010). Dentre estes efeitos antimicrobianos, NPF podem provocar efeitos bacteriostáticos e/ou bactericidas. Em caso de efeito bacteriostático, as bactérias em contato com NPF não morrem mas param de se reproduzir. Em caso de efeito bactericida as colônias bacterianas não se desenvolvem, e se extinguem as já desenvolvidas (STANKIC *et al.*, 2016).

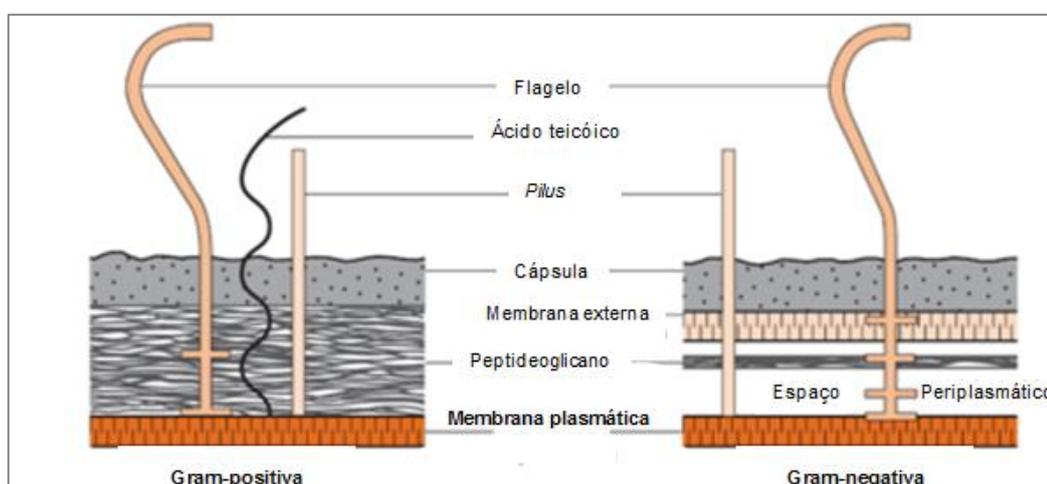
Ainda sobre o efeito antimicrobiano das NPF, foi estudado que quanto maior a concentração de NPF maior o efeito que exercem contra bactérias. Em um estudo passado foram testadas concentrações de 12,5 mg/mL; 25 mg/mL e 50 mg/mL de NPF contra seis bactérias, incluindo três Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e três Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que a inibição no crescimento das bactérias testadas foi dependente da concentração utilizada, e que o efeito antibacteriano foi melhor observado em concentrações mais altas (RAFI *et al.*, 2015).

### 2.3.1 O papel da parede celular bacteriana na interação entre células bacterianas e NPF

Para o claro entendimento do efeito antibacteriano das NPF contra os variados tipos bacterianos é importante considerar que existem dois tipos de bactérias: as Gram-positivas e as Gram-negativas. Estas por sua vez se diferem quanto a estrutura da parede celular, que influenciam nas interações com as NPF (SCOTT; BARNETT, 2006).

A parede celular é uma estrutura rígida que envolve as bactérias. Confere proteção a elas, isolando-as das influências ambientais externas (Figura 4) (LEVINSON, 2016), bem como confere às bactérias cargas superficiais, as quais influenciam na adesão, atração e repulsão eletrostática das células bacterianas com as NPF (ISMAIL *et al.*, 2015).

Figura 4 – Esquema das estruturas celulares diferenciais em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas



Fonte: LEVINSON, 2016

As bactérias Gram-positivas possuem cargas superficiais negativas, são compostas por uma grossa camada de peptidoglicano (15-30 nm), que está ligada a ácidos teicóicos (LEVINSON, 2016). Estes componentes formam um conjunto de moléculas ávidas por prótons que contribuem para a carga negativa da célula (ROMLING; BALSALOBRE, 2012).

Geralmente bactérias Gram-positivas tendem a ser mais susceptíveis devido possuírem apenas uma camada externa de peptidoglicano, que não é uma barreira de permeabilidade efetiva (ISMAIL *et al.*, 2015). Esta observação é evidenciada em um estudo de Azam *et al.*, (2012), que avaliaram que a atividade antibacteriana de nanomateriais testados (NPF, NP de zinco e de cobre) foram mais eficazes contra cepas bacterianas Gram-positivas em comparação com estirpes bacterianas Gram-negativas, não excluindo a efetivação contra estas últimas.

As bactérias Gram-negativas possuem espaço periplasmático e membrana externa, estruturas conferem maior resistência às bactérias Gram-negativas, pois dificultam de certa forma a penetração das NPF no interior da célula (ISMAIL *et al.*, 2015). Além do mais, a membrana externa das Gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas. Esta composição torna a parede celular delas estruturalmente e quimicamente mais complexa (ARUGUETE; HOHELLA, 2010).

Desse modo, a parede celular, a presença da membrana externa e suas estruturas intrínsecas fazem com que a carga negativa da membrana celular das bactérias Gram-negativas seja aumentada, o que provoca a impermeabilidade aos compostos lipofílicos, e também geralmente limitam a penetração de radicais livres carregados negativamente (HAJIPOUR *et al.*, 2012).

Existem outras questões-chaves que influenciam na interação entre células bacterianas e NPF, tais como as propriedades intrínsecas das NPF, como as cargas superficiais que tendem a ser negativas, o tamanho das NPF, entre outros, que desempenham um papel importante na determinação da toxicidade das NPF (EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2016).

O padrão da interação entre células bacterianas e NPF também desempenha um papel fundamental na determinação da atividade antimicrobiana das NPF. A ligação das NPF às superfícies das células bacterianas é governada por interações hidrofóbicas ou interações eletrostáticas (EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2015). Estas interações são mediadas pelo processo de atração que ocorre pela diferença da carga superficial presente nas moléculas (DJURIŠIĆ *et al.*, 2015).

Quando NPF estão no seu estado puro apresentam cargas superficiais negativas devido à presença de grupos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) ligadas a elas (ISMAIL *et al.*, 2015). Estes grupos são oriundos da solução aquosa em que estão fluidizadas (DJURIŠIĆ *et al.*, 2015). Portanto, ocorre a repulsão eletrostática entre as cargas negativas de NPF com as membranas das células bacterianas, o que dificulta a interação entre elas (EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2015).

Assim, NPF revestidas com grupos carregados positivamente interagem mais facilmente com a superfície bacteriana, resultando em uma interação mais forte, levando a produção de ERO. Deste modo, a funcionalização superficial de NPF com determinados compostos pode mudar e favorecer o padrão da biocompatibilidade e a interação com as células bacterianas (MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013).

No mais, as forças eletrostáticas não são as únicas forças responsáveis pela interação entre as NPF e as células bacterianas. Li; Gao; Li, (2009) sugeriram que a adsorção de NPF na superfície das células bacterianas ocorre principalmente devido ao efeito do tamanho nanométrico, que ocorre em função do tamanho diminuto e da grande área superficial das NPF. Outros processos de ligação também são relatados, como as ligações de hidrogênio.

Em um estudo passado foi comprovado que mesmo quando as superfícies das NPF foram modificadas e carregadas negativamente não houve repulsão com as bactérias. Nestes casos, NPF podem interagir com a superfície celular bacteriana em virtude da presença de fatores de adesão nas bactérias (ex.: adesinas e pilus), os quais são responsáveis por mediar as ligações da superfície bacteriana com as NPF e com vários outros substratos (DJURIŠIĆ *et al.*, 2015; DAMACENO; FARIAS, 2016).

#### **2.4. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, encontrada no solo, que é seu habitat de origem, mas comumente habitam outros ambientes, principalmente clínicos. É aeróbia, baciliforme e considerada uma bactéria oportunista. Raramente causam doenças em um sistema imunológico saudável, mas em eventuais fraquezas do organismo podem causar graves infecções sistêmicas (MACHADO *et al.*, 2012). É um dos principais patógenos oportunistas representando 10% das infecções hospitalares, com uma taxa de mortalidade de 50% em pacientes cronicamente doentes (KUMARI *et al.* 2014).

Esta bactéria está comumente relacionada às infecções associadas a dispositivos implantados e cirúrgicos. Tais como, próteses de válvulas cardíacas, marca-passos, implantes e catéteres em geral, que contribui significativamente para o aumento da morbimortalidade e nos altos custos hospitalares devido aos longos períodos de internação (ROMLING; BALSALOBRE, 2012).

É um dos micro-organismos melhor estudados em ensaios *in vitro*, pois possuem alta patogenicidade e tendência de se desenvolverem e se organizarem em biofilme (MACHADO *et al.*, 2012). Isolados desta espécie são capazes de formar biofilme com estruturas semelhantes a cogumelos, indicando forte capacidade de aglomeração celular e resistência intrínseca (BRIDIER *et al.*, 2010).

Por isso são considerados como modelo em relação aos estudos de composição da matriz exopolimérica e de arquitetura tridimensional (MACHADO *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, possuem ampla resistência, exigindo cultivo e teste de sensibilidade a antimicrobianos para decidir o melhor tratamento. Assim o diagnóstico preciso de infecções decorrentes desta bactéria apresenta certa dificuldade para ser elaborado (BRIDIER *et al.*, 2010). Fato que somado a sua fácil disseminação pelo ambiente e a habilidade de se reproduzir com mínimas exigências nutricionais, até mesmo na água purificada a torna uma bactéria de difícil controle (PEDROSA *et al.*, 2014).

Possuem sensibilidade diminuída aos antimicrobianos convencionais, que são as principais opções terapêuticas para o tratamento de infecção por esse micro-organismo como os carbapenêmicos e as cefalosporinas (MATOS *et al.*, 2014). Além destes antimicrobianos, a baixa sensibilidade também é observada em outras diferentes classes estruturais, como à ampicilina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de espectro-estendido (exceto ceftazidima e cefepima), tetraciclinas, macrolídeos, rifamicinas, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol (MATOS *et al.*, 2014). O que torna os tratamentos mais caros e de difícil resolução, bem como, limitam o tempo de vida útil dos antimicrobianos e sugerem uma introdução constante de novos compostos contra a qual *Pseudomonas aeruginosa* não conseguiram desenvolver resistência ainda (JAMIL; IMRAN, 2017).

Deste modo, a grande proporção que esta resistência pode vir a atingir nos próximos anos gera uma preocupação global, visto que há anos atrás foi constatado que mais de 70% das infecções bacterianas eram resistentes à maioria dos antibióticos usados para erradicar infecções (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011).

Este problema é agravado pela falta de insumos para a terapêutica das infecções bacterianas junto a falta de incentivos e interesse das grandes empresas farmacêuticas. Ocorrente muitas vezes devido a questão econômica, que requer alto processo dispendioso. E ao retorno financeiro lento, refletindo a dificuldade de inovações medicamentosas fora do espectro de ação já conhecidos até hoje pela comunidade científica (BLASER, 2016; MORAN *et al.*, 2011).

Deste modo os esforços estão sendo direcionados na exploração de nanomateriais com potencial atividade antimicrobiana, já que as opções medicamentosas existentes no mercado farmacêutico para bactérias resistentes só são efetivas quando utilizadas em doses elevadas, que precisam ser maiores ainda para erradicar micro-organismos organizados em biofilme (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Doses muito elevadas de medicamentos antimicrobianos foram necessárias para erradicar biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, foi verificado que a concentração de Imipenem (antibiótico, do subgrupo do carbapenem, com o maior espectro dentre os betalactâmico e altamente resistente às betalactamases) necessária para eliminar estas cepas em biofilme era maior que  $1.024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  eliminou as formas planctônicas deste micro-organismo (CERI *et al.*, 1999).

A resistência a medicamentos é um processo natural, que tende a aumentar quando as doses de antimicrobianos são aumentadas, pois quanto mais inóspito estiver o ambiente, as bactérias tendem a trocar seus genes de resistência, que ocorre muitas vezes através dos processos de conjugação, transdução ou transformação (JAMIL; IMRAN, 2017).

Entre os mecanismos de resistência, os principais se devem a presença de variantes fenotípicas, bem como a grande proximidade entre as células bacterianas e a estrutura populacional densa, as quais facilitam a dispersão de genes de resistência (LEWIS, 2000). De modo geral essa resistência se deve ao fato de a maioria dos micro-organismos preferirem viver em colônias bem desenvolvidas (biofilme), do que na forma planctônica. Nessas colônias desenvolvidas, as bactérias não só se tornam inacessíveis aos agentes antibacterianos e ao sistema imunológico do corpo, mas também fornecem um reservatório para infecções crônicas por todo o corpo (JAMIL; IMRAN, 2017). Devido a penetrabilidade e difusão insuficiente de moléculas na matriz polissacarídica das bactérias. Em que os poros são tão pequenos a ponto de bloquearem a passagem de macromoléculas (LEWIS, 2000).

Deste modo, sabendo das restrições medicamentosas existentes, o desenvolvimento de alternativas inovadoras no combate ao crescimento de bactérias é sem dúvidas um poderoso aliado para a sociedade e para a saúde pública em todo o mundo (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Para evitar o crescimento das células já aderidas e a colonização de outras bactérias, os esforços têm sido focados nas duas últimas décadas na adsorção de materiais ou impregnação com agentes antimicrobianos, com o uso de NPF. Levando em consideração que muitas infecções microbianas são relacionadas ao uso de dispositivos implantados, as estratégias anticolonização e antiadesão se mostram promissoras (RENNER; WEIBEL, 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* têm capacidade de se fixar a uma superfície inicial, colonizarem e se desenvolverem (AKBARI, ALI, 2017). Para evitar esta adesão inicial é necessário alterar a estrutura das superfícies revestindo-as. As superfícies microbianas

geralmente apresentam natureza hidrofóbica. Por isso as estratégias no combate à aderência das células concentram-se no emprego de revestimentos com superfícies antiadesivas, com alterações físicas e químicas de compostos que perturbam a produção de adesinas bacterianas (RENNER; WEIBEL, 2011).

## 2.5. Determinação da DL<sub>50</sub>

Em pesquisas científicas, diversas técnicas são empregadas para a verificação da toxicidade de substâncias (CAVALCANTE *et al.*, 2000). A utilização de organismos em laboratórios, como micro-organismos, cobaias e inclusive seres humanos são uma delas. Neste quesito a alternativa de utilizar micro-organismos se sobressai dentre as demais (RAJEH *et al.*, 2012).

O teste para avaliar a toxicidade das amostras através da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) é um modelo, bastante utilizado em estudos toxicológicos. Foi desenvolvido em 1927 e desde então é utilizado em protocolo toxicológico de rotina de classes de compostos químicos, já que é abordado praticamente em todas as diretrizes governamentais que regulamentam esse tipo de teste (ZBINDEN, FLURY-ROVERSI, 1981).

A determinação da DL<sub>50</sub> pode ser realizada com a *Artemia salina*, um microcrustáceo da ordem *Anostraca* (sem carapaça) que habita águas universais salgadas (SORGELLOOS *et al.*, 1986). Os cistos destes microcrustáceos apresentam a vantagem de serem metabolicamente inativos e resistirem a estocagem por períodos longos, estes cistos podem ser facilmente adquiridos e são ideais para testes de toxicidade aguda e crônica, por apresentarem um ciclo de vida relativamente curto para eclosão (24 a 48 h) quando em condições adequadas (GOMES, 1986). É considerado um método conveniente por ser rápido, robusto, de baixo custo, fácil obtenção, manuseio e cultivo (RAJEH *et al.*, 2012).

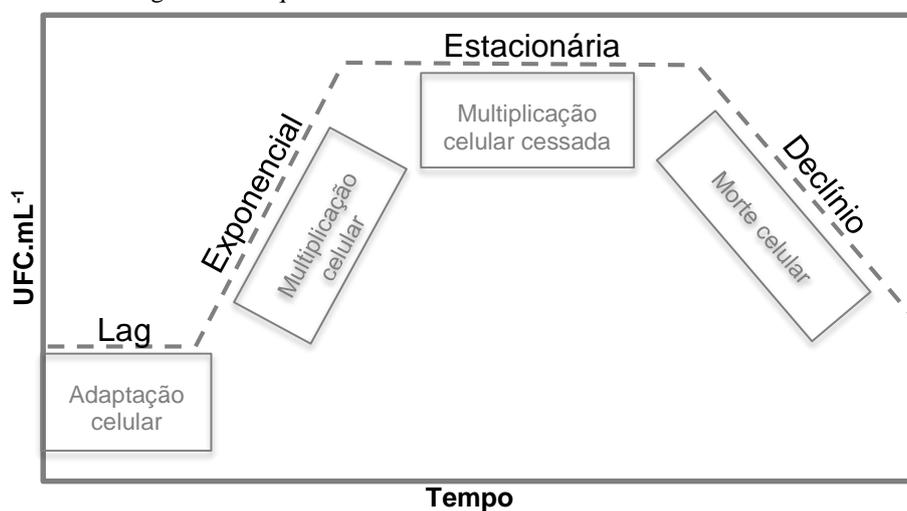
## 2.6. Curva de crescimento bacteriano

A reprodução de bactérias ocorre geralmente de forma assexuada por fissão binária transversa, através da replicação cromossomal. Após o cromossomo se replicar, ocorre a invaginação da membrana plasmática e da parede celular e a bactéria se divide em duas outras

células-filhas. Deste modo, o aumento populacional ocorre em progressão geométrica (NICOLAU, 2014).

As células microbianas apresentam fases distintas em seu crescimento celular, em que inicialmente ocorre uma fase de atraso enquanto as bactérias se ajustam a um novo ambiente (lag), seguido por uma fase de crescimento exponencial, em que são explorados os nutrientes disponíveis, posteriormente passam por uma fase de saturação-estacionária quando os recursos são esgotados e, por fim, ocorre o declínio celular bacteriano (MANHART; ADKAR; SHAKHNOVICH, 2018). Estas fases podem ser evidenciadas como uma curva de crescimento bacteriano representada na Figura 5.

Figura 5 – Esquema com as fases da curva de crescimento bacteriano



Fonte: Autoria própria baseada em Manhart; Adkar; Shakhnovich, 2018

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho propôs testar o efeito de NPF e de NPFF no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027.

Este objetivo geral encontra-se dividido nos seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar NPF através do método de coprecipitação química, e funcionalizá-las com ácido cítrico, para formação de uma dispersão coloidal estável;
- Determinar a concentração de íons ferro presente nas suspensões de NPF e em NPFF, através da AA, com a finalidade de determinar a concentração máxima das soluções a ser testada na  $DL_{50}$ ;
- Caracterizar as amostras através das técnicas de:
  - I) Espectroscopia de absorção atômica na região do infravermelho (EIV), para avaliar as bandas características dos grupos funcionais presentes e a efetividade da funcionalização.
  - II) Difractometria de raios X (DRX), para determinar o diâmetro médio e as fases cristalinas das NPF e das NPFF;
  - III) Potencial Zeta (PZ) para inferir a magnitude das cargas superficiais e a estabilidade da dispersão das NPF e NPFF;
  - IV) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para avaliar a morfologia e o tamanho das NPF e NPFF;
- Determinar a toxicidade pela  $DL_{50}$  a partir de bioensaios com *Artemia salina* para avaliação preliminar da dose tóxica das NPF e NPFF e
- Determinar a curva de crescimento bacteriano e avaliar o efeito que NPF e que NPFF apresentam no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 frente as fases do ciclo celular bacteriano.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Etapa físico-química

#### 4.1.1. Síntese das NPF

As NPF foram obtidas seguindo o método de coprecipitação desenvolvido por Qu *et al.*, (1999) com algumas modificações. Inicialmente foram pesados 10,0926 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 28,0757 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . As quais foram adicionadas em 500 mL de água deionizada sob agitação magnética ( $\pm 200$  rpm). Posteriormente 45 mL de NaOH 25% (v/v) foram acrescentados na solução. Imediatamente um precipitado preto foi formado. O pH da solução foi aferido em 8,28. A solução foi aquecida a 80 °C por 20 minutos a fim de controlar o tamanho das NPF formadas.

A solução foi lavada para retirada dos íons em excesso com o auxílio de um ímã de neodímio. Neste processo, o ímã de neodímio atraía as NPF para o fundo do béquer, devido a atração magnética, possibilitando o descarte do sobrenadante, sem perda das NPF. Este processo de lavagem foi repetido por 10 vezes consecutivas. Após a lavagem aferiu-se o pH da solução, que ficou em torno de 8,00. Uma alíquota desta solução foi separada e identificada como NPF.

#### 4.1.2. Funcionalização com ácido cítrico e esterilização das NPF

Para a funcionalização das NPF foi utilizada metodologia adaptada de Morais *et al.*, (2003), em que foi preparada uma solução de ácido cítrico a 0,17%, oriunda da dissolução de 5,0 g de ácido cítrico em 30 mL de água deionizada. Esta solução (30 mL) foi adicionada ao fluido das NPF a 80 °C sob agitação magnética ( $\pm 200$  rpm).

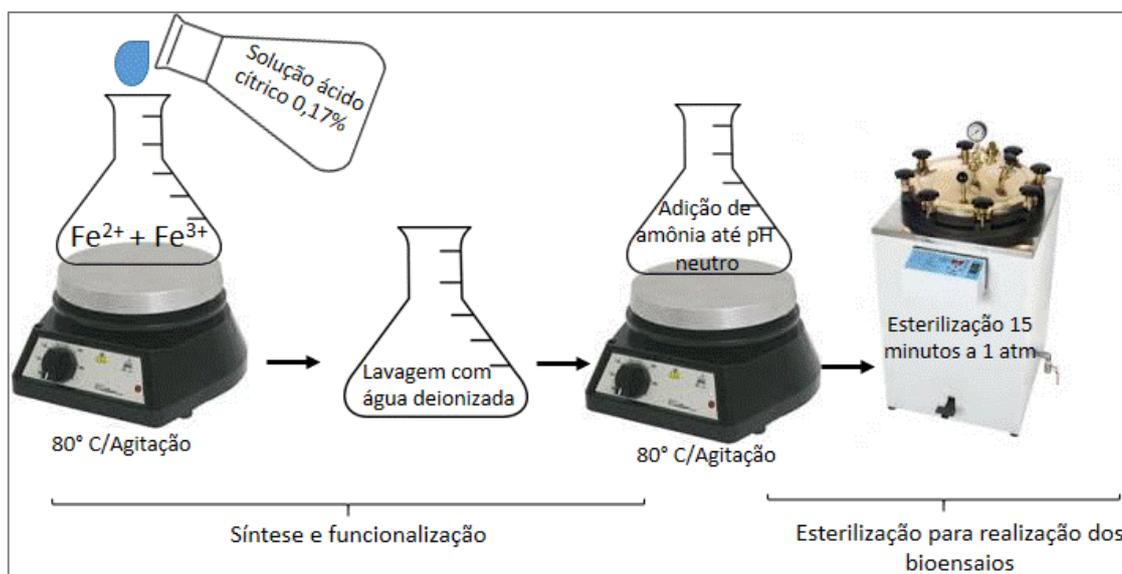
A solução resultante foi lavada por duas vezes para retirada dos íons citrato em excesso. Posteriormente foram adicionadas gotas de amônia P.A. para a elevação do pH até 8,00. Por fim a solução foi aquecida novamente a 80 °C, para favorecimento da formação das NPF com pequeno tamanho, e conseqüentemente foi formada uma dispersão coloidal de coloração negra, com forte magnetismo constatado pela atração magnética por um ímã de neodímio.

A solução resultante da etapa anterior foi dialisada para retirada dos íons em excesso. Com isso a solução final resultante ficou mais diluída, devido a entrada de água por osmose

reversa dentro da membrana que resguardava a solução. Por fim a dispersão coloidal final foi denominada de fluido magnético. Esta dispersão foi separada e identificada como NPF.

Para a realização dos ensaios microbiológicos, as amostras de NPF e NPF<sub>F</sub> foram esterilizadas em autoclave a 121 °C sob pressão de 1 atm por 15 minutos. Posteriormente foram estocadas em geladeira a temperatura de 4 °C aproximadamente (Figura 6).

Figura 6 – Esquema da metodologia empregada na funcionalização das NPF e NPF<sub>F</sub>



Fonte: Autoria própria, 2018

#### 4.1.3. Determinação da concentração de ferro

Para a determinação da concentração de ferro no fluido magnético de NPF, foi pipetado 100  $\mu$ L da dispersão (NPF) previamente esterilizada em millex 0,22  $\mu$ m, mais 1  $\mu$ L de água deionizada e 500  $\mu$ L de HCl PA, para béquer de vidro de 100 mL. A mistura foi aquecida a 100 °C até evaporação. Aguardou-se a solução esfriar e transferiu-se o conteúdo resultante da etapa anterior para um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão com água deionizada. Em seguida foram feitas sucessivas diluições até obtenção das seguintes concentrações: 0,0002, 0,0005, 0,001, 0,006, 0,002 e 0,005 mg/mL de NPF. Posteriormente foi realizado o espectro de absorção atômica de chama utilizando o espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer 5000 do Laboratório de Química Instrumental da UEG (EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1999). Repetiu-se o mesmo procedimento para NPF<sub>F</sub>. E determinou-se a concentração média de ambas amostras.

#### **4.1.4. Técnicas de caracterização**

Para a secagem de amostras de NPF e NPFf para realização de alguns testes de caracterização que exigiam amostras em estado sólido (pó), alíquotas de aproximadamente 20 mL foram estocadas em placa petri e resguardadas em um dessecador por um período de 7 dias. Posteriormente o pó resultante desta etapa, foi transferido para frascos de vidro, identificados e armazenados.

Para avaliar a qualidade, o tamanho e comprovar as características físico-químicas das NPF e NPFf foram realizadas caracterizações através das seguintes técnicas convencionais que seguem.

##### **4.1.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho**

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental da UnUCET, Universidade Estadual de Goiás – UEG, em um espectrofotômetro de infravermelho Spectrum Frontier (Perkin Elmer).

As amostras de NPF e NPFf previamente dessecadas, foram preparadas em pastilhas de KBr em que se misturou cerca de 1 g de amostra sólida para 3 g de KBr, as quais foram maceradas até obtenção de um pulverizado homogêneo e posteriormente foram pressurizadas para a obtenção das pastilhas. As pastilhas de KBr com as amostras foram colocadas em suporte próprio e lidas no espectrofotômetro de infravermelho. As leituras das amostras foram irradiadas com radiação infravermelha no intervalo espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Como resultado foi graficada a porcentagem da radiação transmitida em função do número de onda e aos movimentos característicos intramoleculares (SUN *et al.*, 2004).

##### **4.1.4.2. Difratomia de raios X**

Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro de raios X Shimadzu modelo XRD 6000 na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

A DRX foi utilizada para a caracterização da estrutura cristalina das NPF e NPFf. Os difratogramas de raios X foram obtidos de amostras na forma de pó. Utilizou-se o equipamento Shimadzu modelo XRD 6000, com fonte de radiação do Cobre  $\text{CuK}_\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de  $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$ , a uma velocidade de varredura de  $2^\circ \text{min}^{-1}$ . O diâmetro médio das NPF foi

estimado através do difratograma obtido, em que utilizou-se a largura à meia altura (full-width at half maximum: FWHM) do pico de reflexão mais intenso, com a equação de Scherrer, apresentada abaixo (MASSART; ROGER; CABUIL, 1995).

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta_B)}$$

Em que  $d$  é o diâmetro médio da partícula,  $k$ , a constante de Debye-Scherrer,  $\lambda$  é o comprimento de onda de 1,54056 Å do cobre e  $\beta$  é um parâmetro fornecido pelo equipamento. Este último corresponde respectivamente ao ângulo de difração e a largura à meia altura do pico principal corrigida com relação a um padrão de silício (MONSHI; FOROUGH; MONSHI, 2012). A identificação estrutural das amostras foi feita comparando os difratogramas obtidos com padrões tabelados disponíveis em bancos de dados “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File* (JCPDS - PDF).

#### **4.1.4.3. Potencial Zeta**

O PZ foi obtido por um Zeta sizer modelo Nano Series da Malvern Instruments na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. Em que as soluções de NPF e NPF foram diluídas em água deionizada numa proporção de 1 mL da solução amostra para 3 mL de água. Cada medição foi realizada em triplicata a temperatura ambiente.

#### **4.1.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para a obtenção das imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão TECNAI F20, do Laboratório de Microscopia Eletrônica na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, operado com voltagem a 200 kV. As amostras para esta técnica foram preparadas a partir da dissolução das NPF em água deionizada, em que foi feita a de uma gota em um filme de carbono amorfo sustentado por uma grade de cobre e total evaporação do solvente.

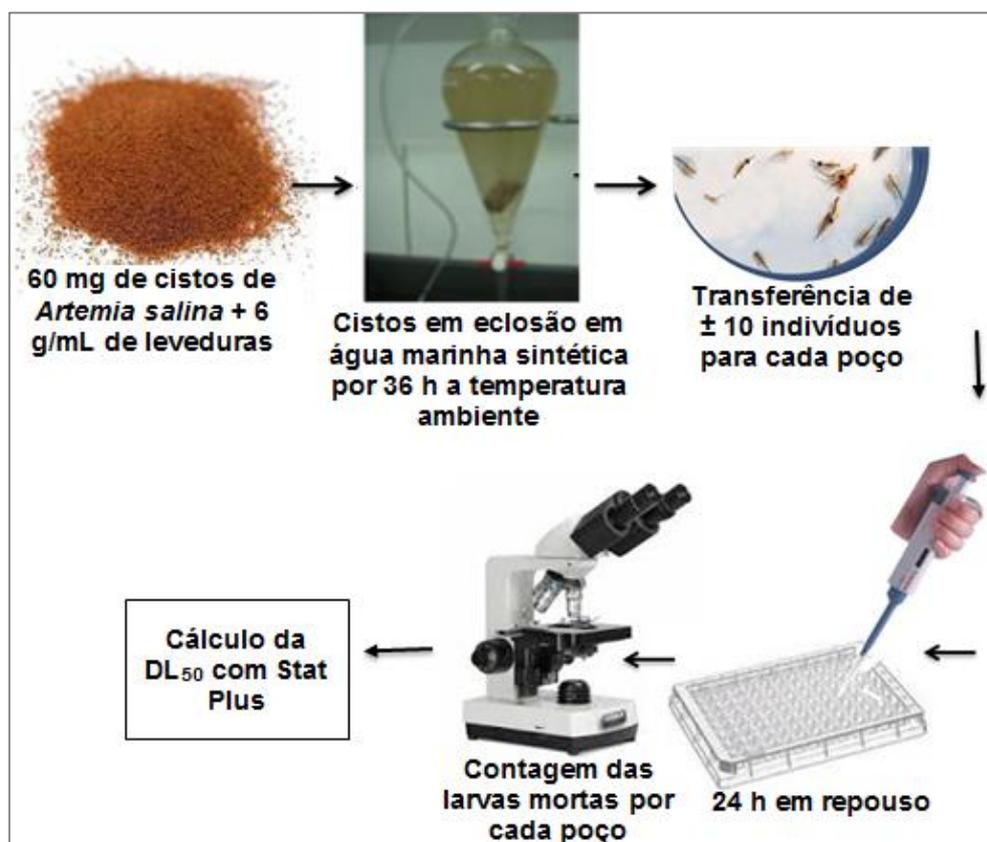
## 4.2. BIOENSAIOS

### 4.2.1. Determinação da DL<sub>50</sub>

Antes de comprovar o efeito antibacteriano das NPF contra bactérias *Pseudomonas aeruginosa* é necessário avaliar o seu potencial toxicológico. Para isso o teste de escolha foi a DL<sub>50</sub>. Para a determinação da DL<sub>50</sub>, foi utilizada metodologia adaptada de Gonçalves (2015), em que 60 mg de cistos de *Artemia salina* foram incubados em um recipiente contendo aproximadamente 250 mL de água marinha sintética, a qual foi preparada através da dissolução de sal marinho (40 g/mL) e suplementação com extrato de levedura (6 g/mL) (Figura 7).

Todo o material foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos a 1 atm. Para cada concentração testada, os ensaios foram realizados em triplicata (três poços por concentração), totalizando 90 indivíduos expostos para cada concentração.

Figura 7 – Esquema da metodologia empregada no teste da determinação da DL<sub>50</sub>



Fonte: Autoria própria, 2018

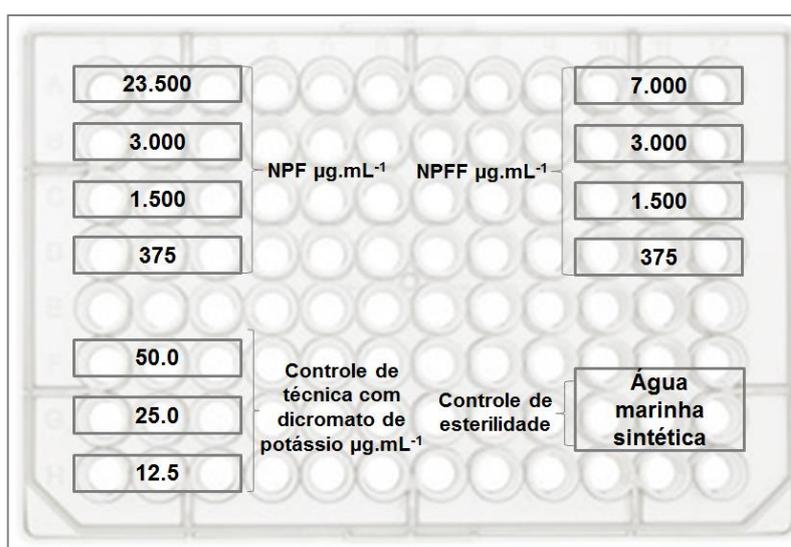
Para a eclosão dos cistos, o meio foi mantido sobre saturação constante de oxigênio, por um período de 36 horas à temperatura ambiente e iluminação natural. Após a eclosão dos cistos,

os náuplios foram transferidos para uma placa de Petri, em que foram distribuídas aproximadamente dez larvas por poço da microplaca com auxílio de uma micropipeta, transferindo-se também os volumes necessários de água marinha sintética, para a obtenção das concentrações finais desejadas, sendo que em cada poço a quantidade total de solução foi de 100  $\mu\text{L}$  (totalizados entre a dispersão testada complementados com a adição de água marinha quando aplicável diluição).

As amostras foram diluídas para obtenção das concentrações pretendidas. Para o teste da  $DL_{50}$  de NPF, os volumes pipetados da dispersão de NPF para se chegar as concentrações de 23500, 3000, 1500, 750 e 375  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  de NPF foram: 100, 26, 13, 6 e 3  $\mu\text{L}$  de dispersão de NPF para cada poço da microplaca. Já para se chegar às concentrações de 7000, 3000, 1500, 750 e 375  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  de NPFF os volumes pipetados desta dispersão foram de 100, 85, 43, 21 e 11  $\mu\text{L}$ . (Figura 8). Todos os testes foram acompanhados de controles negativos, somente com água salina, e positivos com solução de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) nas concentrações de 50, 25 e 12.25  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

As contagens dos microcrustáceos mortos e vivos foram realizadas após 24 h com auxílio de um microscópio eletrônico. A morte do microcrustáceo foi evidenciada pela sua sedimentação, por se tratar de um microcrustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação foram os indicadores de morte utilizados. Para a realização dos cálculos estatísticos, foi utilizado o programa Stat Plus como ferramenta.

Figura 8 - Esquema com as concentrações das dispersões de NPF e NPFF testadas para a avaliação da  $DL_{50}$

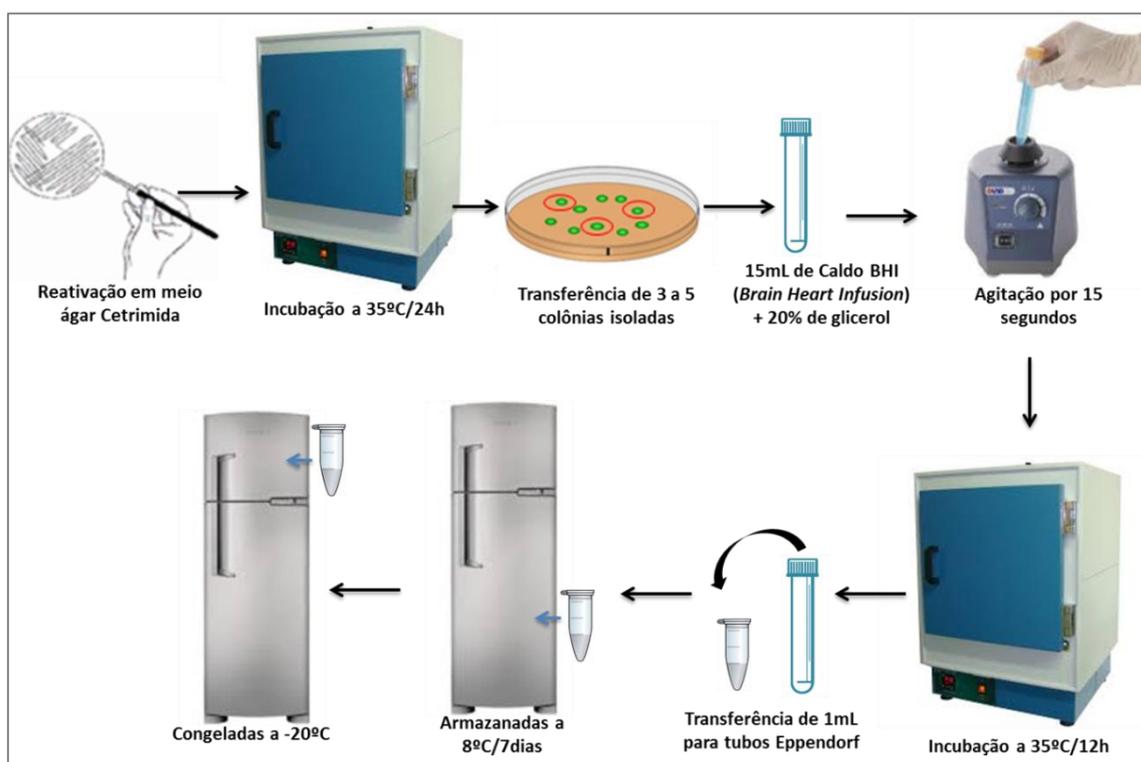


Fonte: Autoria própria, 2018

#### 4.2.2. Manutenção e reativação das cepas bacterianas

Para a realização dos ensaios microbiológicos foram utilizadas estirpes padrão de bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 27853. As duas ATCC de escolha foram utilizadas como medida confirmatória dos resultados. Ambas provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás - Anápolis. O esquema da metodologia empregada está representado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema da metodologia empregada na manutenção e reativação das cepas bacterianas



Fonte: Autoria própria, 2018

Inicialmente foi realizada a manutenção das cepas bacterianas conforme descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008) com pequenas modificações. Silva, Costa e Chinarelli (2008) realizaram a manutenção de leveduras repicadas em Agar de Sabouraud, que foram semeadas em caldo infusão cérebro–coração com 20% de glicerol, em que foram mantidos sob refrigeração por 7 dias, e posteriormente, estocados em freezer a -20 °C.

No presente trabalho cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 27853 foram repicadas em meio seletivo sólido ágar cetrimida, pela técnica de esgotamento por estrias, e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Em seguida, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas resultantes da etapa anterior para um tubo com 15 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol. Posteriormente foi feita a homogeneização em

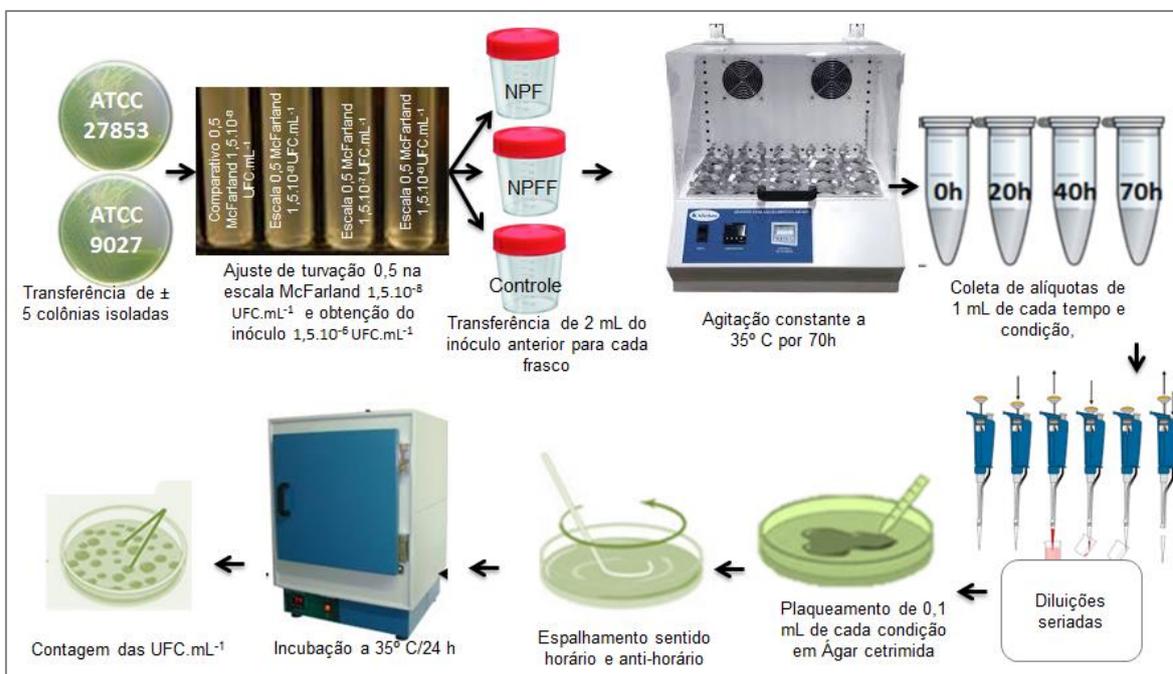
agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos. Após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35° C em estufa. Posteriormente alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos Eppendorf previamente esterilizados e devidamente rotulados. As alíquotas foram armazenadas a 8° C por sete dias em geladeira e estocadas em freezer a -20 °C.

#### 4.2.3. Avaliação da curva de crescimento bacteriano

A avaliação da curva de crescimento bacteriano foi feita conforme metodologia adaptada de Oliveira (2016). Os ensaios foram realizados em triplicata em condições assépticas, em que as bactérias foram incubadas na presença das NPF, NPF e com controle de técnica com água e meio TSB em agitação constante por 70 h a 35° C ( $\pm 2$  °C).

Para a determinação da curva de crescimento bacteriano, alíquotas foram coletadas nos intervalos de 0, 20, 40 e 70 h. As alíquotas foram plaqueadas em ágar cetrimida, incubadas a 35° C por 24 h e posteriormente foram realizadas as contagens das colônias crescidas para a determinação das UFC.mL<sup>-1</sup> em cada condição (Figura 10).

Figura 10 - Esquema da metodologia empregada na determinação da curva de crescimento bacteriano



Fonte: Autoria própria, 2018

Inicialmente o inóculo de ambas ATCC foi ajustado a escala 0,5 de McFarland (1,5.10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), diluído até a concentração 1,5.10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Foi transferido 2 mL deste para um

frasco estéril contendo 13 mL de NPFF; outros 2 mL para um frasco contendo 13 mL NPF e outros 2 mL para outro frasco contendo 13 mL de água deionizada.

Para o ensaio enriquecido com TSB utilizou-se o mesmo procedimento. No entanto, foi acrescentado 0,39 g de TSB na forma sólida para os frascos contendo NPF e NPFF. Para o controle de técnica desta condição, utilizou-se um frasco contendo 13 mL de meio TSB em forma de caldo (diluído). O enriquecimento com TSB foi feito a fim de propiciar o crescimento bacteriano em condições favoráveis.

As amostras permaneceram em agitação constante por um período de 70 h a 35° C ( $\pm 2$  °C) em agitador orbital com aquecimento permanente. Foram coletadas alíquotas de 1 mL em condições assépticas de cada condição nos intervalos 0, 20, 40 e 70 h, que posteriormente foram armazenadas em microtubos em geladeira a 8° C.

Foram realizadas diluições seriadas para viabilizar a contagem das UFC.mL<sup>-1</sup> nas placas. Para o plaqueamento foi transferido 0,1 mL de cada alíquota para placas de Petri com meio ágar cetrimida. Foi feito o espalhamento de forma uniforme com alça Drigalsky em movimentos circulares no sentido horário e anti-horário.

As placas foram incubadas por 24 h a 35° C. Os resultados foram avaliados através da contagem das colônias viáveis, em que foi determinado o número das UFC.mL<sup>-1</sup>. O resultado médio de cada condição foi registrado e multiplicado pelo fator da diluição.

#### **4.2.4. Análise estatística dos dados**

Os testes foram reproduzidos em triplicatas em ensaios independentes. As contagens das UFC.mL<sup>-1</sup> foram feitas em cada intervalo de tempo e condições, as quais foram analisadas descritivamente por meio dos cálculos das médias das UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para as análises estatísticas dos dados foi aplicado o programa GraphPad QuickCalcs no qual foi utilizado o teste t aplicado com 95% de confiança, sendo significativo um  $p \leq 0,05$ . As variáveis NPF vs NPFF foram calculadas para ATCC 27853 nas condições de crescimento com água deionizada, e nas condições de crescimento com TSB. O mesmo racional foi seguido para o cálculo da ATCC 9027.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção e funcionalização das NPF

Foram obtidos aproximadamente 300 mL de NPF e 250 mL de NPFF, oriundas do método de síntese de coprecipitação. Depois de sintetizadas, as NPF apresentaram sedimentação instantânea e coloração amarronzada, já as NPFF apresentaram a dispersão homogênea e coloração enegrecida (Figura 11).

Segundo Kuzmann *et al.*, (2017), estas diferenças ocorreram devido ao processo de funcionalização, que evitou a oxidação dos íons  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  (devido a ligação do ácido cítrico por quimissorção aos íons ferro, que impediu a ligação do  $\text{O}_2$ ) bem como também evitou a agregação das NPFF, favorecendo a estabilidade da dispersão coloidal (através das cargas negativas oriundas dos grupos carboxilatos do ácido cítrico que repeliram com as cargas negativas das NPF, deixando as NPF em dispersão).

Figura 11 – Dispersão das NPF (coloração marrom) e NPFF (coloração negra) representadas da esquerda para a direita



Fonte: Autoria própria, 2018

Na Figura 12, NPF e NPFF estão representadas em estado sólido após o processo de dessecação, o qual foi feito para a obtenção do pó para a realização das técnicas de caracterização, em que se pode observar a atração eletromagnética pelo ímã de neodímio, característicos dos óxidos de ferro maghemita e magnetita.

Figura 12 - NPF e NPFf (sólidas) representadas da esquerda para a direita submetidas a um campo magnético com ímã de neodímio



Fonte: Autoria própria, 2018

## 5.2. Determinação da concentração de ferro

As concentrações de íons ferro presentes em ambas as soluções foram determinadas através da técnica de AA, a fim de avaliar a dose máxima a ser testada no teste da DL<sub>50</sub>.

A dispersão de NPF apresentou concentração de 23500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de íons ferro e a de NPFf apresentou concentração de 7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de íons ferro/mL. A diferença entre as concentrações de íons ferro presentes nas dispersões de NPF e NPFf se deve ao processo de funcionalização, o qual teve a etapa a mais de sucessivas lavagens pelo processo de diálise por osmose reversa, deixando o fluido menos concentrado.

## 5.3. Técnicas de caracterização

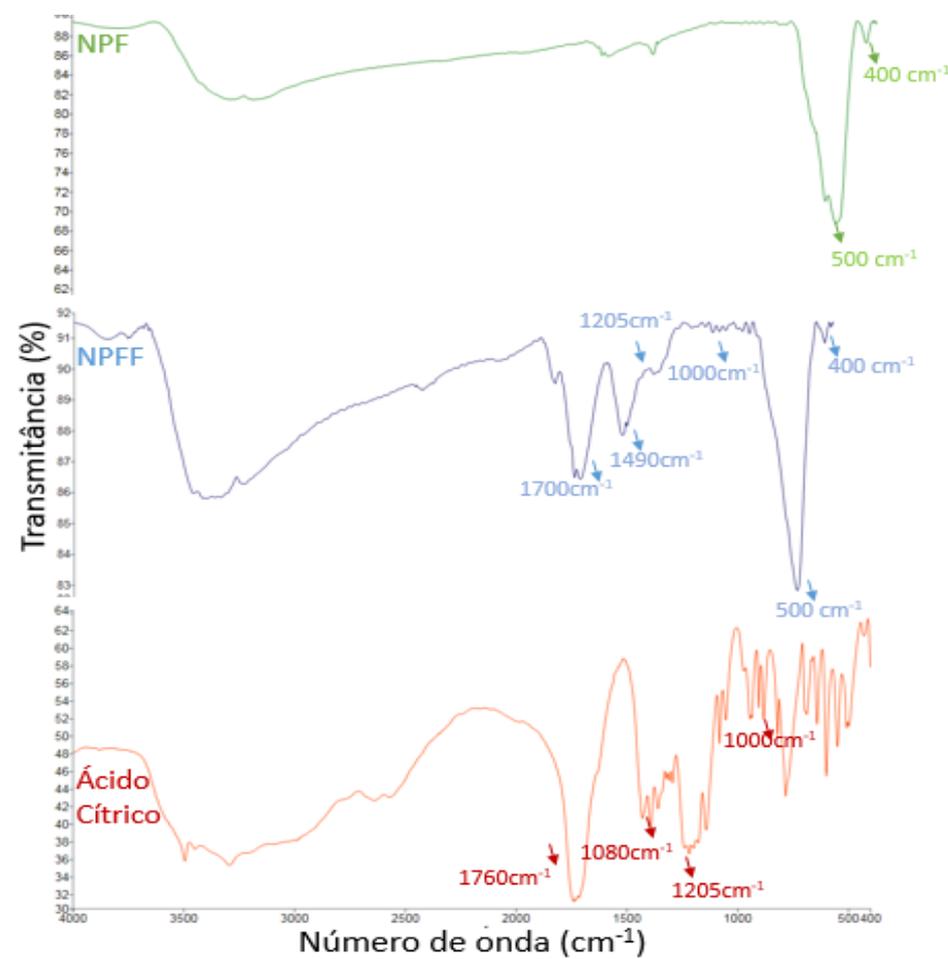
### 5.3.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Moléculas possuem em suas estruturas átomos que oscilam constantemente ao redor de suas posições de equilíbrio. Estas oscilações ocorrem em movimentos de estiramento simétrico e assimétrico, dobramento angular, torção, balanço e rotação. Assim, através da técnica de espectroscopia no infravermelho é possível determinar as frequências vibracionais dos átomos que compõem os grupos característicos presentes em um dado composto químico (PRATER; KJOLLER; SHETTY, 2010).

A Figura 13 representa o EIV obtido a partir das NPF, das NPF e do ácido cítrico. Na curva de NPF duas bandas são observadas em torno de 500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas ao modo de vibração de estiramento associado às ligações Fe-O característico das NPF (WALDRON, 1955; BORDBAR *et al.*, 2014).

Na curva do ácido cítrico observou-se uma banda em 1760  $\text{cm}^{-1}$  e 1480  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de C=O do grupo COOH do ácido cítrico. Na curva de NPF esta banda surge deslocada em cerca de 1700  $\text{cm}^{-1}$  (SAHOO *et al.*, 2005). Isso sugere que o ácido cítrico se complexa com os átomos de ferro pelo grupo carboxilato, em que é enfraquecido com a ligação ao ferro e deslocado a frequência de estiramento menor (CHERAGHIPOUR; JAVADPOUR; MEHDIZADEH, 2012).

Figura 13 - Espectro de infravermelho obtido a partir de NPF, NPF e ácido cítrico



Fonte: Autoria própria, 2018

Bandas de menores intensidades aparecem em 1490, 1200, 1100  $\text{cm}^{-1}$  na curva de NPF e NPF. Estas bandas correspondem ao estiramento simétrico do grupo  $\text{COO}^-$ , ao estiramento simétrico de C-O e ao grupo OH do ácido cítrico, respectivamente. Assim, foi proposto que o

ácido cítrico se ligou à superfície das NPF por quimissorção através de ligações covalentes dos íons citrato às moléculas de ferro (Figura 14) (SAHOO *et al.*, 2005).

Figura 14 - Esquema do processo de ligação do ácido cítrico às NPF



Fonte: CHERAGHIPOUR, JAVADPOUR, MEHDIZADEH, 2012

### 5.3.2. Difractometria de raios X

A DRX é uma das técnicas mais empregadas para caracterizar NPF (pó). Pois fornece informações sobre composição, cristalinidade do material e do diâmetro médio das NPF. A qual ocorre através da interação de raios X com a substância cristalina. Em que é formado um padrão de difração que pode ser comparado com dados conhecidos da literatura (MASSART; ROGER; CABUIL, 1995).

O fundamento da técnica se baseia no fenômeno da interação entre ondas eletromagnéticas com partículas da mesma ordem de grandeza que a do comprimento de onda do difratômetro. Assim em amostras cristalinas, os feixes espalhados do difratômetro ao incidirem sobre o material cristalino sofrem interferências características, em que é formado um padrão de difração que fornece as informações qualitativas das amostras analisadas (MONSHI; FOROUGHI; MONSHI, 2012).

A Figura 15 representa o difratograma das NPF, em que se pode observar uma série de picos característicos dos óxidos de ferro de maghemita e magnetita em  $2\theta$ . Os picos, são atribuídos aos planos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620), e (533). Estes planos estão em concordância com as características dos difratogramas padrões tabelados das NPF de maghemita e magnetita disponíveis em bancos de dados “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File* (JCPDS - PDF).

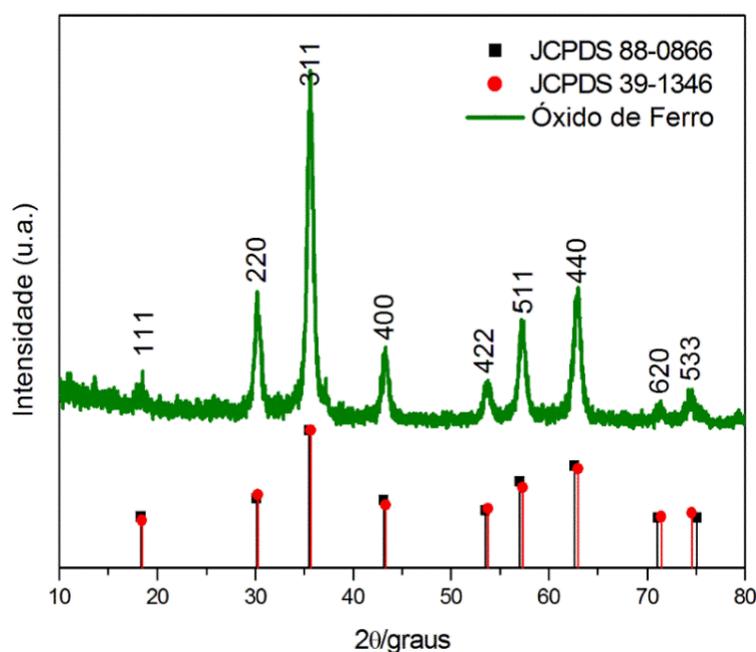
O diâmetro médio das NPF e das NPF foi estimado a partir do pico correspondente de maior intensidade (311), que foi obtido no difratograma, por meio do valor do ângulo de espalhamento - do pico de difração e sua respectiva largura à meia altura, na qual calculou-se o tamanho médio das NPF através da equação de Scherrer, conforme fórmula abaixo, em que

foi considerado os seguintes dados: valor de  $k$  (constante de Debye-Scherrer) de 0,9, valor de  $\lambda$  (fonte de radiação do Cobre 1,54056 Å), e o valor de  $\beta\cos(\theta_B)$  foi um parâmetro fornecido pelo equipamento, sendo 0,013415 para NPF e 0,01264 para NPFF. (KLUG; ALEXANDER, 1954).

$$d = \frac{k\lambda}{\beta\cos(\theta_B)}$$

Assim o diâmetro médio estimado nas NPF e NPFF foram ambos de 10 nm. Isto mostrou que NPF e NPFF possuem tamanho nanocristalino em conformidade com outros autores (CHERAGHIPOUR; JAVADPOUR; MEHDIZADEH, 2012), e que NPFF não sofreram mudanças em seu tamanho decorrente do processo de funcionalização.

Figura 15 - Difratoograma de raios X das NPFF em contraste com padrões tabelados de maghemita e magnetita disponíveis em bancos de dados “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*”



Fonte: Autoria própria, 2018

Foi possível observar que o método de síntese por coprecipitação proporcionou a obtenção de NPF de pequeno tamanho, visto que outros métodos de síntese, como ablação por laser, as NPF sintetizadas apresentaram diâmetro médio de 50-110 nm (ISMAIL *et al.*, 2015).

O diâmetro médio obtido das NPF sintetizadas no presente trabalho apresentou-se próximos a outros estudos semelhantes. Em que Chatterjee; Bandyopadhyay; Sarkar, (2011) obtiveram NPF de diâmetro médio de 8 nm, pelo método de síntese de coprecipitação.

Além do mais, nessa faixa de tamanho NPF não apresentam toxicidade *in vitro* em comparação com estudos citotóxicos já realizados. No qual NPF comerciáveis de 10 nm de diâmetro foram testadas e nenhum efeito citotóxico apreciável foi observado (FIENG *et al.*, 2018).

### 5.3.3. Potencial Zeta

O potencial Zeta (PZ) é uma técnica empregada para medir a migração eletroforética de partículas em suspensão. No presente trabalho a medição do PZ foi usada para determinar a carga superficial das NPF e NPFF. Assim como a repulsão eletrostática entre as NPF e a estabilidade da dispersão. A medida foi realizada em um Zeta sizer modelo Nano Series da Malvern Instruments. Em cada caso, foram realizadas três medições separadas.

A Tabela 1 apresenta os resultados de PZ das amostras de NPF e NPFF. Os valores positivo das NPF e negativo das NPFF evidenciam que houve funcionalização efetiva das NPF com o ácido cítrico, contribuindo com a estabilidade da dispersão.

Tabela 1 – Resultados do potencial Zeta das amostras de NPF e NPFF

Compostos	Potencial Zeta (mV)
NPF	32,7 ± 7,13
NPFF	-8,98 ± 7,70

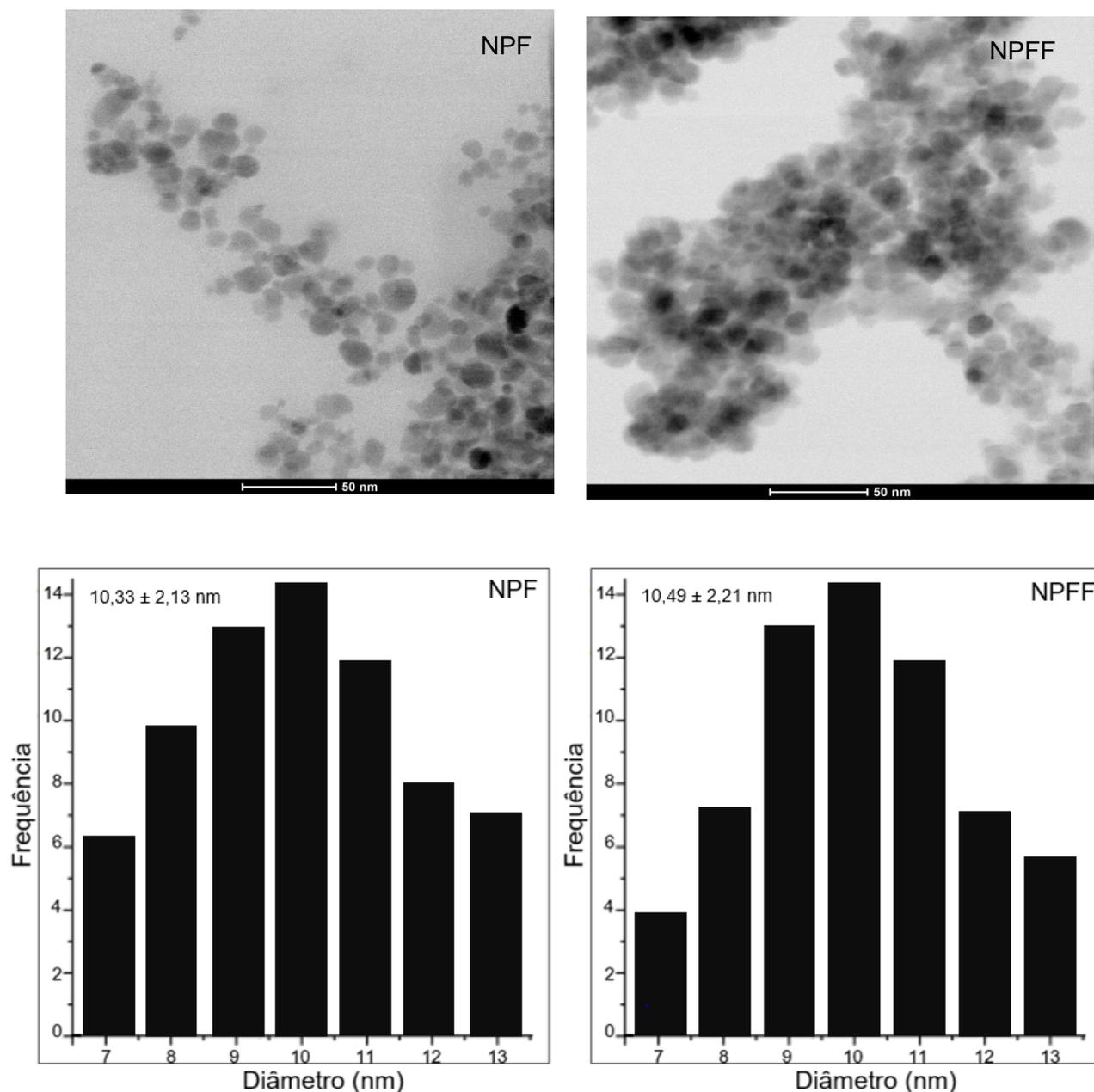
As superfícies das NPFF apresentaram valores negativos, em decorrência dos grupos carboxilatos provindos do ácido cítrico. Deste modo os resultados obtidos estão em concordância com relatos da literatura, em que foi avaliado em um estudo feito por Andreas *et al.*, (2012) que NPF funcionalizadas com ácido cítrico apresentaram carga superficial negativa (-27,3 ± 1,41 mV), enquanto outras NPF não funcionalizadas apresentaram cargas mais neutras (-3,48 ± 0,55 mV).

Wierzbinski *et al.*, (2018), em um estudo semelhante, avaliaram o PZ de NPF revestidas com DMSA (ácido dimercaptossuccínico), um componente químico que também possui em sua estrutura grupos carboxílicos, semelhante ao ácido cítrico. A medição do PZ feita nesse sistema apresentou -49,3 mV em água, o qual sugeriu que o valor negativo se deve a forte carga negativa na superfície das NPF, que produziu elevada estabilidade coloidal da dispersão de NPF devido à forte força repulsiva eletrostática e aos grupos carboxílicos oriundos do revestimento utilizado (WIERZBINSKI *et al.*, 2018).

### 5.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

A MET está representada na Figura 16 abaixo, em que é possível observar as imagens obtidas pelo MET das amostras de NPF e de NPFF, juntamente aos histogramas que foram construídos através do programa IPEXP4.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão de NPF e NPFF e histograma da distribuição da tamanho das nanopartículas



Fonte: Autoria própria, 2018

Foi feita medição de aproximadamente 350 nanopartículas de cada amostra. Os valores dos diâmetros foram plotados para a construção do histograma, em que se pode observar que

ambas amostras apresentaram majoritariamente diâmetro médio de 10 nm, com desvio padrão de 2,13 nm para NPF e 2,21 para NPFF.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) consiste em um disparo de feixe de elétrons de alta energia, que é guiado por um conjunto de lentes magnéticas, que atravessa a amostra, através da incidência dos feixes na amostra estes sofrem diversos tipos de espalhamento, que são dependentes das características do material. Assim os feixes difratados são recombinados na formação de uma imagem bidimensional, projetada na tela do microscópio e capturada por uma câmera digital, presente no equipamento, que fornece informações sobre os componentes presentes na amostra (WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B., 1994).

#### 5.4. Determinação da DL<sub>50</sub>

NPF e NPFF não apresentaram toxicidade até as concentrações avaliadas. Não houve morte de nenhuma *Artemia* na presença das amostras. Segundo Meyer *et al.*, (1982) são consideradas tóxicas substâncias que apresentam DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. O controle de técnica com dicromato de potássio apresentou DL<sub>50</sub> média de 47,3 µg.mL<sup>-1</sup> ± desvio padrão de 3 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da determinação da DL<sub>50</sub> para NPF, NPFF e dicromato de potássio

Compostos	DL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
NPF	>7000
NPFF	>23500
Dicromato de Potássio	47,3 ± 3

Foi possível comprovar que os microcrustáceos ingeriram as amostras, já que NPF e NPFF foram visualizadas dentro do sistema digestório dos microcrustáceos (Figura 18) que se apresentaram com coloração negra, diferentemente das *Artemias* incubadas na ausência das NPF que apresentaram coloração clara no seu interior (Figura 17).

Figura 17 - Visualização microscópica de *Artemia salina* em solução de dicromato de potássio (ampliação de 60x)



Fonte: Autoria própria, 2018

Figura 18 - Visualização microscópica de *Artemia salina* com NPF em seu sistema digestório (ampliação de 10x, 40x e 60x, respectivamente)

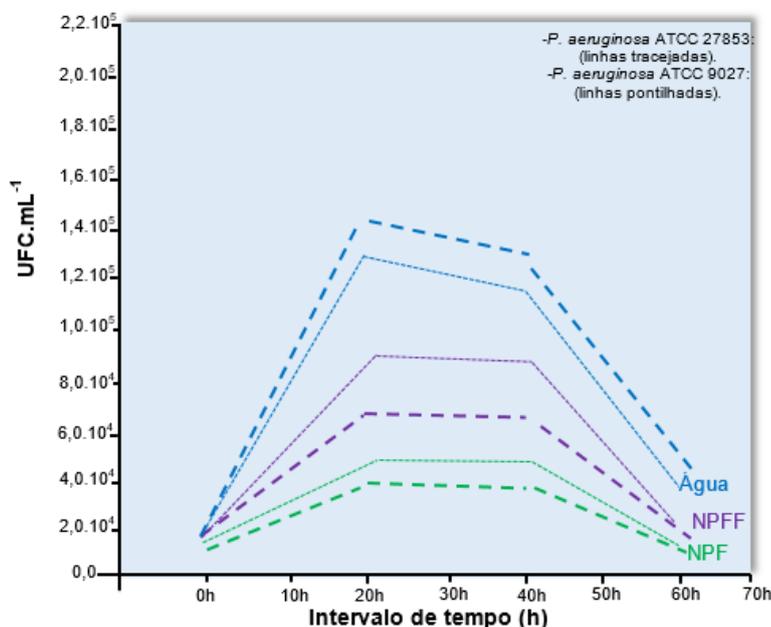


Fonte: Autoria própria, 2018

### 5.5. Avaliação da curva de crescimento bacteriano

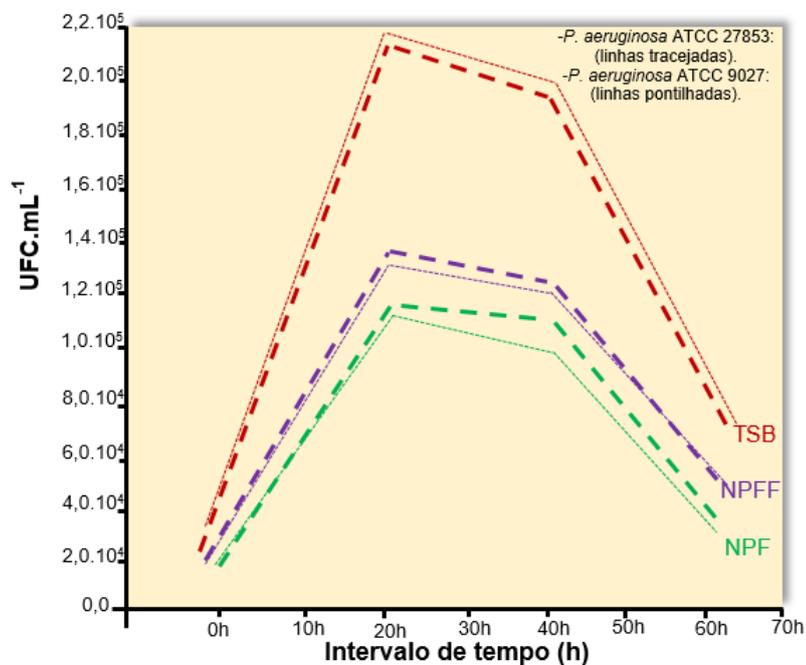
Nas Figuras 19 e 20 pode ser observada a inibição no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, em que as linhas pontilhadas representam o desenvolvimento da ATCC 9027, bem como as linhas tracejadas representam o desenvolvimento da ATCC 27853. Foi observado que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 foram capazes de crescer tanto no meio TSB quanto em água deionizada. No entanto foi observado que em água deionizada o crescimento das bactérias foi cerca de  $8,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> menor do que em TSB, nas condições de controle de técnica.

Figura 19 - Curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 em água deionizada



**Legenda:** UFC.mL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônias por mililitro; crescimento bacteriano na ausência de NP: nanopartículas (linhas azuis); crescimento bacteriano na presença de NPF: nanopartículas de óxido de ferro (linhas verdes); crescimento bacteriano na presença de NPFf: nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico (linhas roxas).

Figura 20 - Curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 em TSB



**Legenda:** UFC.mL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônias por mililitro; crescimento bacteriano na ausência de NP: nanopartículas (linhas vermelhas); crescimento bacteriano na presença de NPF: nanopartículas de óxido de ferro (linhas verdes); crescimento bacteriano na presença de NPFf: nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico (linhas roxas).

Esta diferença pode ter ocorrido devido a disponibilidade de nutrientes presentes, visto que a água deionizada não é enriquecida com nutrientes, enquanto o meio TSB é composto por diversos nutrientes, como glicose, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, entre outros, de acordo com o rótulo do frasco, os quais podem ter servido de substrato para o crescimento bacteriano.

NPF e NPFF foram capazes de inibir o crescimento de ambas as cepas. A quantidade de cepas inibidas foi calculada através da diferença entre a quantidade de UFC.mL<sup>-1</sup> crescidas nas condições de controle na fase exponencial de crescimento subtraindo-se as que cresceram na presença de NPF/NPFF, em cada condição.

Na condição com água deionizada, para ATCC 27853, NPF inibiram o crescimento de cerca de  $1,1 \cdot 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto NPFF inibiram  $8,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Nesta mesma condição porém para ATCC 9027 NPF inibiram  $1,0 \cdot 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. E NPFF inibiram  $5,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Assim através do teste estatístico com valor  $p \leq 0,05$  foi possível avaliar que NPF apresentaram melhor efeito inibitório do que NPFF nestas condições de crescimento.. Esta diferença observada pode ter ocorrido devido ao fato de que o ácido cítrico usado como agente funcionalizador em NPFF, por ser um ácido orgânico serviu como fonte extra de carbono. O que agregou valor nutricional extra ao meio em que as bactérias estavam inseridas. Consequentemente contribuiu com o desenvolvimento das bactérias (KUBICEK; RÖHR; REHM, 2008).

Outra hipótese se deve ao fato de os acidificantes atuarem como agentes complexantes a íons metálicos. Nesse caso o ácido cítrico pode ter se ligado aos íons ferro, formando complexos metálicos (AKBAS; KOKUMER, 2015). Sendo assim pode ter ocorrido o comprometimento da ação das NPFF através da formação de ERO, devido a redução da oxidação da membrana celular bacteriana, o que consequentemente resultou na redução da inibição no crescimento das *Pseudomonas aeruginosa*.

Na condição com TSB, para ATCC 27853 e ATCC 9027, NPF inibiram o crescimento de cerca de  $1,0 \cdot 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> e NPFF inibiram  $8,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em comparação as condições de controle com TSB em que o crescimento foi de  $2,2 \cdot 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Em relação aos controles de técnica com meio TSB e com água deionizada, ambas amostras, apresentaram inibição média de cerca de  $7,0 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Azam *et al.*, (2012), também avaliaram o efeito antimicrobiano de NPF contra *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram um efeito antimicrobiano para este micro-organismo

através da avaliação da zona de inibição de 3 mm do crescimento destas bactérias em placas Petri. Nesta pesquisa as NPF apresentaram tamanho 3 vezes ( $35.16 \pm 1.47$  nm) maior do que as NPF do presente trabalho ( $10 \text{ nm} \pm 2,13$ ) o que sugere que com diâmetro praticamente três vezes maior o efeito antimicrobiano de NPF também é observado.

Em outro trabalho, Akabari, Ali (2017) efetuaram um estudo para avaliar o efeito de NPF na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$  no crescimento de células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*. O resultado foi de redução no crescimento destas bactérias bem como de alterações morfológicas nas estruturas celulares das bactérias indicativo do efeito tóxico que NPF possuem em decorrência da liberação de EROS.

Assim como foi avaliado por Kafayati *et al.*, (2013), em um estudo que avaliou a frequência de crescimento das células de *Pseudomonas aeruginosa* na presença de NPF. Os resultados obtidos desses testes mostraram que não houve crescimento destas células nos meios de amostragem com 5000, 7500, 9000, 10000  $\mu\text{g/mL}$  de NPF, praticamente quatro vezes abaixo dos teores de NPF aplicados neste trabalho. O que sugere que com baixos teores de NPF, a inibição do crescimento bacteriano para *Pseudomonas aeruginosa* já se torna efetiva.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi avaliado o efeito de nanopartículas de óxido de ferro e nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico no crescimento de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ambas amostras demonstraram ser candidatas promissoras como antimicrobianos alternativos para estas bactérias.

A funcionalização com ácido cítrico mostrou-se ser uma medida eficaz para a estabilização do fluído coloidal, no entanto, não apresentou resultado significativo diferenciado às nanopartículas não funcionalizadas no combate ao desenvolvimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse contexto, uma investigação com funcionalização feita com doses mais elevadas de ácido cítrico para avaliar o efeito antimicrobiano destes ainda se faz necessária. Bem como, uma investigação com doses mais elevadas do que 23500 µg/mL de íons ferro para avaliar o efeito bactericida das NPF.

Sendo assim, diante os resultados obtidos no combate ao desenvolvimento bacteriano destas bactérias, sugere-se que as amostras em questão podem ser posteriormente estudadas como revestimento de superfícies de dispositivos implantados, a fim de se avaliar a possível ação que estas amostras impactam na deposição e desenvolvimento destas bactérias nestes instrumentos, podendo ser empregadas como uma medida paliativa na prevenção da contaminação de instrumentos médicos, entre outros.

## 7. REFERÊNCIAS

- AKBARI, K. R. A.; ALI, A. A. Study of antimicrobial effects of several antibiotics and iron oxide nanoparticles on biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Nanomedicine Journal**, v. 4, p. 37-43, 2017.
- AKBAS, M. Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1666-1672, 2015.
- ALI, A.; ZAFAR, H.; ZIA, M.; HAQ, I. U.; PHULL, A. R. ; ALI, J. S.; HUSSAIN, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49-67, 2016.
- ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and *leishmania* parasites. **Future Medicine**, v. 6, n. 8, p. 933-940, 2011.
- ANDREAS, K.; GEORGIEVA, R.; LADWIG, M.; MUELLER, S.; NOTTER, M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. **Biomaterials**, v. 33, p. 4515-4525, 2012.
- ANSARI, F.; GRIGORIEV, P.; LIBOR S.; Tohill, I. E.; Ramsden, J. J. DBT Degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 with magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1505-1512, 2009.
- ANTUNES, A. L. S.; BONFANTI, J. W.; PEREZ, L. R. R.; PINTO, C. C. F.; FREITAS A. L. P.; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51-55, 2011.
- APHESTEGUY, J. C.; KURLYANDSKAYA, G. V.; CELIS, J. P.; SAFRONOV, A. P.; SCHEGOLEVA, N. N. Magnetite nanoparticles prepared by co-precipitation method in different conditions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 161, p. 243-249, 2015.
- ARAKHA, M.; PAL, S.; SAMANTARRAI, D.; PANIGRAHI, T.; MALLICK, B. C.; PRAMANIK, K.; MALLICK, B.; JHA S. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. **Scientific Reports – Nature**, v. 5, n. 14813, 2015.
- ARUGUETE, D. M.; HOHELLA M. F. Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications. **Environmental Chemistry**, v.7, p. 3-9, 2010.
- AZAM, A.; AHMED, A. S.; OVES, M.; KHAN, M. S.; HABIB, S. S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 6003-6009, 2012.

BABES, L., DENIZOT, B., TANGUY, G., JEUNE, J. J. L., JALLET, P. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 212, p. 474-482, 1999.

BECK, J. W.; SOUZA, C. G. S.; SILVA, T. L.; JAFELICCI, J. M.; VARANDA, L. C. Formation Mechanism via a Heterocoagulation Approach of FePt Nanoparticles Using the Modified Polyol Process. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 115, n. 21, p. 10475-10482, 2011.

BEE, A.; MASSART, R.; NEVEU, S. Synthesis of very fine maghemite particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.149, ed. 1-2,p.6-9, 1995.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p.198-206, 2003.

BEYTH, N.; HOURI-HADDAD, Y.; DOMB, A.; KHAN, W.; HAZAN, R. Alternative Antimicrobial Approach: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2015, n. 246012, 2015.

BLASER, M. J. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. **Science**, v. 352, p. 544 – 545, 2016.

BOHARA, R. A.; PAWAR, S. H. Innovative developments in bacterial detection with magnetic nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 4, 2015.

BORCHERDING, J.; BALTRUSAITIS, J.; CHEN, H.; STEBOUNOVA, L.; WU, C.; RUBASINGHEGE, G.; MUDUNKOTUWA, I. A.; CARABALLO, J. C.; ZABNER, J.; GRASSIAN, V. H.; COMELLAS, A. P. Iron oxide nanoparticles induce *Pseudomonas aeruginosa* growth, induce biofilm formation, and inhibit antimicrobial peptide function. **Environmental Science Nano Journal**, v. 1, p. 123-132, 2014.

BORDBAR, A. K.; RASTEGARI, A. A.; AMIRI, R.; RANJBAKHSH, E.; ABBASI, M.; KHOSROPOUR, A. R. Characterization of Modified Magnetite Nanoparticles for Albumin Immobilization. **Biotechnology Research International**, v. 2014, 2014.

BRIDIER, A.; DUBOIS-BRISSONNET, F.; BOUBETRA, A.; THOMAS, V. BRIANDET, R. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using high through put CLSM method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 64-70, 2010.

CAVALCANTE, M. F. Síntese de 1,3,5 - Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia Salina*. **Química Nova**, v. 23, n.1, 2000.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CHANG, Y-N.; ZHANG, M.; XIA, L.; ZHANG, J.; XING, G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. **Materials**, v. 5, ed. 12, p. 2850–2871, 2012.

CHATTERJEE, S.; BANDYOPADHYAY, A.; SARKAR, K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 1-7, 2011.

CHEN, S.; FENG, J.; GUO, X.; HONG, J.; DING, W. One-step wet chemistry for preparation of magnetite nanorods. **Materials Letters**, v. 59, p. 985 – 988, 2005.

CHERAGHIPOUR, E.; JAVADPOUR, S.; MEHDIZADEH, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. **Journal Biomedical Science and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 715-719, 2012.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. **Wiley**, ed. 2, p. 1-121, 2003.

DAMACENO, N. B.; FARIAS, L. R. Relação existente entre biofilmes bacterianos, *quorum sensing*, infecções e resistência a antibióticos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de pesquisa em ciências da saúde**, v. 3, n. 1, p. 46-51, 2016.

DJURIŠIĆ, A. B.; LEUNG, Y. H.; NG, A. M.; XU, X.Y.; LEE, P. K.; DEGGER, N.; WU R. S. S. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. **Small Journal**. v. 11, ed. 1, p. 26-44, 2015.

EBRAHIMINEZHAD, A.; BAGHERI, M.; TAGHIZADEH, S-M., BERENJIAN, A.; GHASEMI, Y. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.

EBRAHIMINEZHAD, A.; GHASEMI, Y.; AMINI, S. R-A.; BARAR, J.; DAVARAN, S. Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal**, v. 3, n. 102, P. 534-539, 2013.

EBRAHIMINEZHAD, A.; VARMA, V.; YANG, S.; BERENJIAN, A. Magnetic immobilization of *Bacillus subtilis natto* cells for menaquinone-7 fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 173-180, 2015.

EWIJK, V.; VROEGE, G. J.; PHILIPSE, A. Convenient preparation methods for magnetic colloids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. 1-3, p. 31–33, 1999.

FAZIO, E.; SANTORO, M.; LENTINI, G.; FRANCO, D.; GUGLIELMINO, S. P. P.; NERI, F. Iron oxide nanoparticles prepared by laser ablation: Synthesis, structural properties and antimicrobial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Journal Elsevier**, ed. 490, p. 98-103, 2016.

FIENG, Q.; LIU, Y.; HUANG, J.; CHEN, K.; HUANG, J.; XIAO, K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018.

GOMES, L. A. O Cultivo de crustáceos e moluscos. São Paulo: Nobel, 1986. 226 p.

GONÇALVES, R. C. **Toxicidade e atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos na formação de biofilmes por bactérias gram-negativas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Goiás, Anapólis-GO, 2015.

GORDON, T.; PERLSTEIN, B.; HOUBARA, O.; FELNER, I.; BANIN, E.; MARGEL, S.; Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Journal Elsevier**, v. 374, p. 1-8, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p. 667-679 2010.

GRIGORIE, A. C.; MUNTEAN, C.; STEFANESCU, M. Obtaining of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles by thermal decomposition of polyethyleneglycol-iron nitrate mixtures. **Thermochimica Acta**, v. 621, p. 61-67, 2015.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, ed.18, p. 3995-4021, 2005.

HAMOUDA, I. M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. **The journal of biomedical research**, v. 26, ed. 3, p. 143-151, 2012.

HAIPOUR M. J.; FROMM K. M.; ASHKARRAN, A. A.; ABERASTURI D. J.; LARRAMENDI, I. R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499–511, 2012.

HARRIS, L. A. **Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly (propylene oxide) modified styrene – dimethacrylate networks**. Dissertation (Doctor of philosophy chemistry), Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002.

HOLMES, C. J.; DEGREMONT, A.; KUBEY, W.; STRAKA, P.; MAN, N. K. Effectiveness of Various Chemical Disinfectants versus Cleaning Combined with Heat Disinfection on *Pseudomonas* Biofilm in Hemodialysis Machines. **Karger medical and Scientific publishers**, v. 22, n. 5, p. 461-468, 2004.

HUA, M.; ZHANG, S.; PAN, B.; ZHANG, W.; LV, L.; ZHANG, Q. Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 211 - 212, p. 317 - 331, 2012.

HUBER, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. **Small Journal**, v. 1, n. 5, p. 482-501, 2005.

ISMAIL, R. A.; SULAIMAN, G. M.; ABDULRAHMAN S. A.; MARZOOG T. R. Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. **Materials Science and Engineering Journal Elsevier**, v. 53, p. 286-297, 2015.

JAMIL, B.; IMRAN, M. Factor pivotal for designing of nanoantimicrobials:an exposition. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-16, 2017.

JOLIVET, J. P.; CHANÉAC, C.; TRONC, E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. **Chemical Communications**, ed. 4, p. 481-487, 2004.

KAFAYATI, M. E.; RAHEB, J.; ANGAZI, M. T.; ALIZADEH, S.; BARDANIA, H. The Effect of Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles on the Growth of Genetically Manipulated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4). **Biotechnology**, v. 11, ed. 1, p. 42-46, 2013.

KAUR, R.; HASAN, A.; IGBAL, N.; ALAM, S.; SAINI, M. K.; RAZA, S. K. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: a review. **Journal of separation science**, v. 37, ed. 14, p. 1805 – 1825, 2014.

KEERTHANA, D. S.; NAMRATHA, K.; BYRAPPA, K.; YATHIRAJAN, H. S. Facile one-step fabrication of magnetite particles under mild hydrothermal conditions. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 378, p. 551-557, 2015.

KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetic**, v. 16, n. 2, p. 178-183, 1980.

KLUG, H. P.; ALEXANDER, L. E. X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials. **John Wiley & Sons, Incorporation**, New York, 1954.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine**, v. 1, ed. 3, p. 193–212, 2005.

KUBICEK, C. P.; RÖHR, M.; REHM, H. J. Citric Acid Fermentation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 3, ed. 4, p. 331-373, 2008.

KUMARI, H.; BALASUBRAMANIAN, D.; ZINCKE, D.; MATHEE, K. Role of *Pseudomonas aeruginosa* b-lactam and non-b-lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 544-555, 2014.

KUZMANN, E.; SILVA, S. W.; GUILHERME, L. R.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; MELO, G. F. Mössbauer and Raman spectroscopic study of oxidation and reduction of iron oxide nanoparticles promoted by various carboxylic acid layers. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 311, p. 1-9, 2017.

LAHA, D.; PRAMANIK, A.; LASKAR, A.; JANA, M.; PRAMANIK, P.; KARMAKAR, P. Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. **Materials Research Bulletin Journal**, v. 59, p. 185-191, 2014.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 198, p. 2064-2110, 2008.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**, ed. 13, 2016.

LEWIS, K. Programmed death in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 503-514, 2000.

LI, Y. G.; GAO, H. S.; LI, W. In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5092–5096, 2009.

LU, A.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie**, ed. 46, p. 1222 – 1244, 2007.

MACHADO, I.; LOPES, S. P.; SOUSA, A. M.; PEREIRA, M. O. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 43-52, 2012.

MAHDAVI, M.; AHMAD, M. B.; HARON, M. J.; NAMVAR, F.; NADI, B.; RAHMAN, M. Z. A.; AMIN, J. Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Molecules**, v. 18, p. 7533–7548, 2013.

MANHART, M.; ADKAR, B. V.; SHAKHNOVICH, E. I. Trade-offs between microbial growth phases lead to frequency-dependent and non-transitive selection. **The royal society publishing**, p.1-9, 2018.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

MASSART, R.; ROGER, J.; CABUIL, V. New Trends in Chemistry of Magnetic Colloids: Polar and Non Polar Magnetic Fluids, Emulsions, Capsules and Vesicles. **Brazilian Journal of Physics**, v. 25, n. 2, 1995.

MATOS, E. C. O.; MODESTO, N. S.; COSTA, W. L. O.; CARNEIRO, I. C. R. S.; LIMA, K. V. B. Prevalência de Agentes Microbianos e Sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 28, ed. 2, p. 35-43, 2014.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONSHI, A.; FOROUGHI, M. R.; MONSHI, M. R. Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 2, p.154-160, 2012.

MORAIS, P. C.; OLIVEIRA, A. C.; TRONCONI, A. L.; GOETZE, T.; BUSKE, N. Photoacoustic spectroscopy: A promising technique to investigate magnetic fluids. **IEEE Transactions on magnetics**, v. 39, n. 5, p. 2654-2656, 2003.

MORAN, F. L.; ARONSSON, B.; MANZ, C.; GYSSSENS, I. C.; SO, A. D.; MONNET, D. L.; CARS, O. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - Time to react is now. **Elsevier**, v. 14, p. 118-124, 2011.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, ed. 5761, p. 622-627, 2006.

NICOLAU, P. B. Microrganismos e crescimento microbiano. **Repositório aberto**, p. 1-26, 2014.

OCANA, M.; RODRIGUEZ-CLEMENTE, R.; SERNA, C.J. Uniform colloidal particles in solution: formation mechanisms. **Advanced Materials**, ed. 7, p. 212-216, 1995.

OLIVEIRA, M. S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO, 2016.

PEDROSA, P. A.; BRANDÃO, M. L. L.; MEDEIROS, V. M.; ROSAS, C. O.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; ALMEIDA, A. E. C. C. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Revista Ambiente e Água**, v. 9 n. 2, p. 313-324, 2014.

PRABHU, Y. T.; RAO, K. V.; KUMARI, B. S.; KUMAR, V. S. S.; PAVANI, T. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its antibacterial application. **International Nano Letters**, v. 5, ed. 2, p. 85-92, 2015.

PRATER, C.; KJOLLER, K.; SHETTY, R. Nanoscale infrared spectroscopy. **Materials today**, v. 13, n. 11, p. 56-60, 2010.

QU, S., YANG, H., REN, D., KAN, S., ZOU, G., LI, D., LI, M., Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 215, p. 190-192, 1999.

RAFI, M. M.; AHMED, K. S. Z.; NAZEER, K. P.; KUMAR, D. S.; THAMILSELVAN, M. Synthesis, characterization and magnetic properties of hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles on polysaccharide templates and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 5, ed. 4, p. 515-520, 2015.

RAJEH, M. A. B.; KWAN, Y. P.; ZAKARIA, Z.; LATHA, L. Y.; JOTHY, S. L.; SASIDHARAN, S. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. **Pharmacognosy Research**, v. 4, ed. 3, p. 170-177, 2012.

RAMTEKE, C.; SARANGI, B. K.; CHAKRABARTI, T.; MUDLIAR, S.; SATPUTE, D.; PANDEY, R. A. Synthesis and broad spectrum antibacterial activity of magnetite ferrofluid. **Current Nanoscience**, v. 6, p. 587-591, 2010.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K. A.; LYNCH, I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, ed. 6, p. 2295-2350, 2013.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **Materials Research Society**, v. 36, p. 347-355, 2011.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, p. 541-561, 2012.

SAHOO, Y.; GOODARZI, A.; SWIHART, M. T.; OHULCHANSKY, T. Y.; KAUR, N.; FURLANI, E. P.; PRASAD, P. N. Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles: Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control. **Journal of Physical Chemistry**, p. 3879-3885, 2005.

SALEH, N. B.; CHAMBERS, B.; AICH, N.; PLAZAS-TUTTLE, J.; PHUNGGGOC, H. N.; KIRISITS, M. J. Mechanistic lessons learned from studies of planktonic bacteria with metallic

nanomaterials: implications for interactions between nanomaterials and biofilm bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 677, 2015.

SANDOE, J.; WYSOME, J.; WEST, A.; HERITAGE, J.; WILCOX, M. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 767-770, 2006.

SCOTT, J. R.; BARNETT, T. C. Surface proteins of Gram-positive bacteria and how they get there. **Microbiology**, v. 60, p. 397-423, 2006.

SELVAKUMAR, R.; ARAVINDH, S.; ASHOK, A. M.; BALACHANDRAN, Y. L. A facile synthesis of silver nanoparticle with SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) and antimicrobial activity using *Bacillus subtilis* exopolysaccharides. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 9, n. 10, p. 1075-1087, 2014.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; CHINARELLI, S.; RECHE, H. Manutenção de leveduras por congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . **Revista Brasileira De Análises Clínicas**, v. 40, ed. 1, p. 1-79, 2008.

SOARES, A. A.; VICENTE, J. D.; POSSAMAI, M. C. F.; SANTOS, G. R.; OTUTUMI, L. K.; PIAU JÚNIOR, R.; ALMADA, A. F. B.; GERMANO, R. de M. Avaliação da peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos à lesão tecidual e tratados com hidrogel de poliamido de mandioca. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 3, p. 175-178, 2016.

SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.; VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia em acuicultura. **Project reports**, n.10, 312 p., 1986.

STANKIC, S.; SUMAN, S.; HAQUE, F.; VIDIC, J. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 2-20, 2016.

SUN, Y. K.; MA, M.; ZHANG, Y.; GU, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. **Colloids Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects Journal**, v. 245, p. 15-19, 2004.

SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal Occupational Medicine and Toxicology**, v. 2, ed. 16, p. 1-6, 2007.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, n. 5, v. 9, p. 222-227, 2001.

TALLURY, P.; MALHOTRA, A.; BYRNE, L. M.; SANTRA S. Nanobioimaging and sensing of infectious diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews Journal**, v. 4, p. 424-437, 2010.

WALDRON, R. D. Infrared Spectra of Ferrites. **Physical Review**, v. 99, n. 6, p. 1727-1735, 1955.

WEISSLEDER, R.; STARK, D. D.; ENGELSTAD, B. L.; BACON, B. R.; COMPTON, C. C.; WHITE, D. L.; JACOBS, P.; LEWIS, J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. **American Journal of Roentgenology**, v.152, n. 1, p. 167-173, 1989.

WIERZBINSKI, K. R.; SZYMANSKI, T.; ROZWADOWSKA, N.; RYBKA, J. D.; ZIMMA, A.; ZALEWSKI, T.; NOWICKA-BAUER, K.; MALCHER, A.; NOWACZYK, M.; KRUPINSKI, M.; FIEDOROWICZ, M.; BOGORODZKI, P.; GRIEB, P.; GIERSIG, M.; KURPISZ, M. K. Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. **Scientif Reports**, v. 8, p. 1-17, 2018.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. Transmission Electron Microscopy: A Text Book for Material Science, Plenum Press, 1994.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Research Letters**, p. 397-415, 2008.

WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, p. 1-43, 2015.

ZBINDEN, G.; FLURY-ROVERSI, M. Significance of the LD<sub>50</sub>-Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances. **Archive of toxicology**, v. 47, p. 77-99, 1981.