

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO



DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS  
SUPERFICIALMENTE COM CARBOIDRATOS PARA O CULTIVO CELULAR  
DE MICRORGANISMOS

CURITIBA

2019

LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE COM CARBOIDRATOS PARA O  
CULTIVO CELULAR DE MICRORGANISMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Luciano Paulino da Silva

Coorientador(a): Tânia Maria Bordin Bonfim

CURITIBA

2019

Araujo Neto, Lucio de Assis

Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente com carboidratos para o cultivo celular de microorganismos [recurso eletrônico] / Lucio de Assis Araujo Neto – Curitiba, 2019.

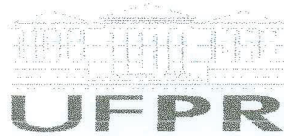
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Luciano Paulino da Silva  
Coorientadora: Professora Dra. Tânia Maria Regina Bordin Bonfim

1. Nanopartículas. 2. Bactérias. 3. *Swarming*. 4. Carboidratos. 5. Bioimpressão magnética. I. Silva, Luciano Paulino. II. Bonfim, Tânia Regina Bordin. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO** intitulada: **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente com carboidratos para cultivo celular de microorganismos**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Fevereiro de 2019.

LUCIANO PAULINO DA SILVA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

VERA LUCIA PERUSSI POLEZ

Avaliador Externo (EMBRAPA)

GLAUCIO VALDAMERI

Avaliador Interno (UFPR)

CINTHIA CAETANO BONNATO

Avaliador Externo (TECSINAPSE)

Esta dissertação é dedicada a todos os estudantes de Pós-Graduação que sobreviveram fisicamente, emocionalmente e principalmente psicologicamente, durante todo o período de estudos e dedicação aos seus respectivos projetos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Aparecida de Oliveira Araujo e Edmundo Miranda de Araújo, por serem meu maior apoio emocional por mais abalado que pudesse estar e por sempre apoiarem minha carreira acadêmica, independentemente de onde eu teria que buscá-la para construí-la.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado e os investimentos acadêmicos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte apoio tecnológico-científico.

À Fundação Araucária (FAPPR) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio técnico-científico pela promoção de eventos científicos e a participação dos mesmos.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela oportunidade, parceria e convênio realizado com a Embrapa, proporcionando o desenvolvimento das minhas atividades, bem como a continuação das atividades acadêmicas

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela infraestrutura, oportunidade de participação em eventos científicos e pelo acolhimento durante estes dezesseis meses para o desenvolvimento das minhas atividades experimentais do mestrado.

Agradeço à Dra. Tânia Maria Bordin Bonfim, por me acolher, ensinar, apoiar e instruir-me durante os meses de permanência no Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, onde pude conhecê-la e me preparar para o estágio em docência, bem como meus estudos prévios à ida até Brasília.

A todos os meus parentes de Monte Carmelo, Uberlândia, Araxá e Brasília pelos apoios, orações, momentos de carinho e fraternidade todos os dias, inclusive aos Natais, pois sempre os encontrava nessa data, compartilhando as vivências e experiências da vida.

Agradeço aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Nanobiotecnologia, Beatriz Carvalho, Tatiane de Melo, Thalita Fonseca, Cíntia Bonatto, Liana Chafran, Ivy Garcez, Lívia Viol, Julia Fernandes, Júlia Pupe,

Ariane Pandolfo, Hamile Mey, Gabriela Mendes, Vera Polez, Gabriella Magarelli, Ana Clara, Heloise Maitê, Rodrigo Meneses, Douglas Cavalcanti, Marco Antônio e Thales Rocha, pelas companhias, conversas, entretenimento e amizade ao longo de dois anos e meio de convívio na Embrapa.

Agradeço aos meus amigos de coração Kenzo Watanabe, Jéssica Rodrigues, Géssica Fernades, Patrícia Amaral, Priscilla Davi, Kattiuscy Naves, Stelamary Silva, Francielly Dornelas, Nayara Matos, Edna Lisboa, Isabel Schult, Fábio Cruz, Felipe Menegheti, Rodrigo Borges, Fernando Domingues, Alex Almeida e Willy Kefha, por sempre me apoiarem aonde eu fosse e para sempre me verem quando estava por Brasília, Uberlândia ou Monte Carmelo.

Agradeço à forte amizade que conquisei em Curitiba com meus amigos, Melina Marques, Gabriela Parchen, Vanessa Graciolo, Louriana Padilha, Luana Chweih, Cintia Rompkovski, Nayana Stofella, Marco Freitas, Maick Baptista e Alcindo Junior.

Ao Sebastian, por ser o animal de estimação com as melhores características que poderia ter, companheiro e amigo, que eu poderia ter na minha vida mesmo em dias que estive enfermo ou triste.

E agradeço principalmente ao Dr. Luciano Paulino da Silva juntamente ao Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por acreditar e confiar em mim desde 2016, para que pudesse desenvolver todas as minhas atividades relacionadas à pesquisa e também me proporcionando a participações únicas em eventos de cunho local, regional, nacional e internacional, podendo até juntos sermos premiados em duas vezes consecutivas.

*“Erase una vez la historia de un niño y una niña, el niño se llamaba siempre y era una persona soñadora, aventurera, que creía que todo lo que veía no era todo lo que había en realidad y que había algún lugar donde las leyendas cobraban sentido. Por contra estaba nunca, nunca era una persona pesimista, una persona realista, una persona que solo se fiaba de aquello que podía comprobar y constatar con sus propios ojos y que no se creía ni historias ni cuentos. Entonces llegó un día en que Siempre se acercó a Nunca y le dijo que su mayor sueño en la vida era viajar y llegar hasta el sol, ella dijo "no podrás", si saltas, te vas a caer o lo que es peor, si llegas, te vas a quemar. Supongo que ella lo que intentaba era ser la cuerda del globo de los pajaros que tenía en la cabeza Siempre, pero tal era el peso de sus sueños y tantos pajaros tenía en la cabeza, que llegó un día en que todos a la vez emprendieron el vuelo y Siempre se perdió en mitad del cielo. Hay quien dice que llegó, otros que se cayó, incluso hay quien dice que cumplió su sueño, pero de todo esto que pasó, Nunca nunca lo supo porque echo raíces en el suelo. Y es que, si siempre te dices nunca, nunca será siempre.”*

*Bely Basarte e Rayden*



## RESUMO

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são um tipo específico de nanomaterial que, quando exposto a um campo magnético, desloca-se em direção a ele. Suas aplicações se concentram na biomedicina como direcionamento estratégico de fármacos e como agente de contraste na ressonância magnética por imagem, bem como na área ambiental, devido às suas interações com moléculas contaminantes. Nos últimos anos, o uso deste tipo de nanomaterial tem sido demonstrado na produção de culturas tridimensionais de células, principalmente para formação de miméticos tumorais. No entanto, as aplicações das NPMs para outros modelos de células, ainda são limitadas. Paralelamente a isso, microrganismos planctônicos quando aderidos a uma superfície, realizam o fenômeno de *swarming*, no intuito de garantir a expansão da colônia e garantir mais nichos. A partir disso, o objetivo deste estudo foi produzir NPMs com superfícies modificadas com quatro tipos de carboidratos, sendo eles a galactose, glicose, sacarose e maltose, para potenciais aplicações em cultura de microrganismos e visando também à uma possível construção tridimensional. Pelo método de coprecipitação, as NPMs foram sintetizadas utilizando um protocolo recentemente otimizado no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa. O volume final foi separado em cinco béqueres, nos quais as NPMs foram decantadas magneticamente (NPM-SC) e os outros quatro receberam 0,3 mM de diferentes carboidratos (NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal), com o objetivo de revestir as NPMs, sendo decantadas magneticamente após 20 min de exposição às soluções de carboidratos. Estas NPMs foram analisadas e determinados os diâmetros hidrodinâmicos (DH), bem como perfis de grupos químicos via espectroscopia Raman. Foi realizado o ensaio de concentração mínima inibitória (CIM) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae* a fim de identificar a possível toxicidade das NPMs em microrganismos. Por fim, foi avaliada a magnetização de *E. coli* e *S. aureus* para investigar a possível interação com as NPMs bem como modular o crescimento e desenvolvimento de *swarming*. Os resultados mostraram que as NPMs apresentam DH de 100 a 200 nm. As coberturas com os carboidratos nas NPMs influenciaram os perfis obtidos por espectroscopia Raman de maneiras distintas. Quando submetidas aos ensaios biológicos para averiguar o seu potencial nível de toxicidade, identificou-se que em nenhuma das concentrações de 1 mM, 800, 600 e 400  $\mu$ M (de ferro) houve alteração do crescimento dos microrganismos quando observado visualmente. Além destes, a magnetização das bactérias foi promovida de diferentes formas e a modulação da formação de *swarming* em *E. coli* quando associada à NPM-Gli foi identificada. A modificação na cobertura das NPMs não inferiu na possível toxicidade aos microrganismos, bem como aquelas sem cobertura. Entretanto, mostrou diferenças nas magnetizações e modulação da formação de *swarming* bacteriano em *E. coli*. Sendo assim, as NPMs sintetizadas neste trabalho e modificadas superficialmente com carboidratos, podem ser utilizadas para o cultivo de microrganismo, afim da avaliação de formação do *swarming*, bem como a formação de biofilmes microbianos e futuros ensaios com cultivo 3D.

**Palavras-chave:** Nanopartículas; Bactérias; *Swarming*; Carboidratos; Bioimpressão magnética.

## ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNPs) are a specific type of nanomaterial that, when exposed to a magnetic field, moves toward it. Its applications focus on biomedicine as a strategic targeting of drugs and as a contrast agent in magnetic resonance imaging as well as in the environmental area due to its interactions with contaminating molecules. In recent years, the use of this type of nanomaterial has been demonstrated in the production of three-dimensional cell cultures, mainly for the formation of tumor mimetics. However, the applications of NPMs to other cell models are still limited. Parallel to this, planktonic microorganisms when adhered to a surface, perform the phenomenon of swarming, in order to ensure the expansion of the colony and ensure more niches. From this, the objective of this study was to produce MNPs with surfaces modified with four types of carbohydrates, being galactose, glucose, sucrose and maltose, for potential applications in microorganism culture and also aiming at a possible three dimensional construction. By the coprecipitation method, the MNPs were synthesized using a protocol recently optimized in the Nanobiotechnology Laboratory of Embrapa. The final volume was separated into five beakers in which the NPMs were magnetically decanted (MNP-SC) and the other four received 0.3 mM of different carbohydrates (MNP-Gal, MNP-Glu, MNP-Sac and MNP-Mal), with the objective of coating the MNPs, being decanted magnetically after 20 min exposure to the carbohydrate solutions. These MNPs were analyzed and hydrodynamic diameters (DH) were determined, as well as profiles of chemical groups via Raman spectroscopy. The minimum inhibitory concentration (MIC) assay against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae* was performed in order to identify the possible toxicity of MNPs in microorganisms. Finally, the magnetization of *E. coli* and *S. aureus* was investigated to investigate the possible interaction with MNPs as well as modulate the growth and development of swarming. The results showed that MNPs have DH from 100 to 200 nm. Carbohydrate coatings in the MNPs influenced the profiles obtained by Raman spectroscopy in different ways. When submitted to the biological assays to determine its potential toxicity level, it was found that in none of the concentrations of 1 mM, 800, 600 and 400  $\mu$ M (of iron) there was altered growth of microorganisms when observed visually. In addition, the magnetization of the bacteria was promoted in different ways and the modulation of the swarming formation in *E. coli* when associated with MNP-Glu was identified. The modification in the coverage of the MNPs did not infer in the possible toxicity to the microorganisms, as well as those without cover. However, it showed differences in magnetizations and modulation of bacterial swarming formation in *E. coli*. Therefore, the MNPs synthesized in this work and modified superficially with carbohydrates, can be used for the culture of microorganism, in order to evaluate the formation of swarming, as well as the formation of microbial biofilms and future trials with 3D culture.

**Keywords:** Nanoparticles; Bacteria; Swarming; Carbohydrates; Magnetic bioprinting.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DEPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS EM LÂMINAS DE VIDRO ENVOLVIDAS COM PAPEL ALUMÍNIO .....	37
FIGURA 2 - AMOSTRAS DAS NPMS SINTETIZADAS PELO MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS .....	42
FIGURA 3 - ATRAÇÃO DAS NPMS PELO CAMPO MAGNÉTICO GERADO POR ÍMÃS DE NEODÍMIO .....	43
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO EM NÚMERO (%) DAS NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS OBTIDOS POR DLS .....	45
FIGURA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DH MÉDIOS APÓS AS SÍNTESES DE NPMS E 6 MESES DEPOIS .....	48
FIGURA 6 - IMAGENS FOTOGRAFADAS UTILIZANDO UMA LENTE DE 40X, POR MICROSCOPIA DE LUZ DAS NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS .....	51
FIGURA 7 - ESPECTROS RAMAN DAS NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS .....	53
FIGURA 8 - DETECÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR PELO ENSAIO DE BENEDICT.....	56
FIGURA 9 - IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA A PARTIR DAS NPM-SC E HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA TOPOGRAFIA EM ALTURA (NM) .....	61
FIGURA 10 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA TOPOGRAFIA EM ALTURA (NM) DAS NPM-GAL .....	62
FIGURA 11 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA TOPOGRAFIA EM ALTURA (NM) DAS NPM-GLI .....	63
FIGURA 12 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA TOPOGRAFIA EM ALTURA (NM) DAS NPM-SAC .....	64

FIGURA 13 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA TOPOGRAFIA EM ALTURA (NM) DAS NPM-MAL.....	65
FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES DE DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS MÉDIO OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E A MÉDIA DA ALTURA TOPOGRÁFICA DAS AMOSTRAS OBTIDOS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA .....	66
FIGURA 15 - ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM <i>Escherichia coli</i> .....	68
FIGURA 16 - ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
FIGURA 17 - ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	70
FIGURA 18 - MAGNETIZAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> PARA UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS .....	73
FIGURA 19 - UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS ISOLADAS DE <i>E. coli</i> .....	74
FIGURA 20 - UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS ISOLADAS DE <i>S. aureus</i> .....	75
FIGURA 21 - CONTAGEM DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS BACTERIANAS DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> FORMADAS APÓS A MAGNETIZAÇÃO COM AS NPMS .....	76
FIGURA 22 - MAGNETIZAÇÃO E MODULAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SWARMING EM <i>S. aureus</i> APÓS A ASSOCIAÇÃO DAS NPMS COM E SEM COBERTURAS DE CARBOIDRATOS .....	79
FIGURA 23 - MAGNETIZAÇÃO E MODULAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SWARMING EM <i>E. coli</i> APÓS A ASSOCIAÇÃO COM AS NPMS COM E SEM COBERTURAS COM CARBOIDRATOS .....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE DAS NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS.....	46
TABELA 2 - Z-AVERAGE E INTENSIDADE DAS NPMS COM E SEM COBERTURA DE CARBOIDRATOS.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D -	Bidimensional
3D -	Tridimensional
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -	Óxido de Alumínio
APTS -	(3-aminopropil) Trietoxissilano
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
Bac-SN -	Bactérias sem nanopartículas magnéticas
CACO -	Tampão Cacodilato de Sódio
CaO -	Óxido de Cálcio
CIM -	Concentração Mínima Inibitória
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O -	Sulfato de cobre pentahidratado
DH -	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS -	Espalhamento Dinâmico de Luz
EUA -	Estados Unidos da América
Fe <sup>2+</sup> -	Íon Cátion Ferro Bivalente
Fe <sup>3+</sup> -	Íon Cátion Ferro Trivalente
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O -	Cloreto Férrico Hexahidratado
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Magnetita
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -	Sulfato de Ferro Heptahidratado
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
KOH -	Hidróxido de Potássio
LB -	Meio de cultivo Luria Bertani
LPS -	Lipopolissacarídeos
M -	Molar
MEC -	Matriz extra-celular
MET -	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFA -	Microscopia de Força Atômica
MgO -	Óxido de Magnésio
MIC -	Minimal Inhibitory Concentration
ML -	Microscopia de Luz
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
MRI -	Imagem por ressonância magnética

NaCO <sub>3</sub> -	Carbonato de Sódio
Na <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O -	Citrato de Sódio
NaOH -	Hidróxido de Sódio
NP -	Nanopartículas
NPMs -	Nanopartículas Magnéticas
NPM-SC -	Nanopartículas Magnéticas sem cobertura
NPM-Gal -	Nanopartículas Magnéticas recobertas com galactose
NPM-Gli -	Nanopartículas Magnéticas recobertas com glicose
NPM-Sac -	Nanopartículas Magnéticas recobertas com sacarose
NPM-Mal -	Nanopartículas Magnéticas recobertas com maltose
OD -	Densidade Óptica
PBS -	Tampão Fosfato Salina
PdI -	Índice de Polidispersividade
PEG -	Poli(etileno)glicol
PPG -	Programa de Pós-Graduação
PZ -	Potencial Zeta
rpm -	Rotações por minuto
SnO <sub>2</sub> -	Dióxido de Estanho
SPIONs -	Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas
TEOS -	Tetraetoxissilano
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
UFPR -	Universidade Federal do Paraná
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -	Maghemita
ZnO -	Óxido de Zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

μ -	Micro
μL -	Microlitro
μm -	Micrômetros
nm -	Nanômetros
% -	Porcentagem
s -	Segundos



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	21
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1.2	JUSTIFICATIVA.....	22
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
2.1	Nanopartículas Magnéticas (NPMs) .....	23
2.1.1	Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro .....	24
2.1.2	Tipos de Síntese e Fabricação de Nanopartículas Magnéticas...25	
2.1.2.1	Método por coprecipitação .....	25
2.1.3	Aplicações das Nanopartículas Magnéticas .....	27
2.2	Cultivo celular tridimensional .....	28
2.2.1	Cultivo celular tridimensional utilizando NPMs .....	30
2.3.	<i>Swarming</i> bacteriano .....	30
2.3.1	<i>Swarming</i> e suas características .....	31
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1	Síntese de Nanopartículas Magnéticas por Rota de Coprecipitação .....	33
3.2	Cobertura das Nanopartículas Magnéticas com Carboidratos....33	
3.3	Caracterização das NPM pelo Método de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ) .....	34
3.4	Caracterização das NPMs por Microscopia de Força Atômica (MFA) .....	35
3.5	Ensaio para detecção de açúcar redutor - teste de Benedict .....	35
3.6	Microscopia de Luz e Espectroscopia Raman .....	36
3.7	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
3.8	Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
3.9	Ensaio para a Detecção da Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	38
3.10	Ensaio de Magnetização bacteriana .....	39
3.11	<i>Swarming</i> bacteriano com adição de NPMs .....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42

4.1	Aparência e atração magnética pelas NPMs .....	42
4.2	Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta das NPMs sintetizadas .....	44
4.3	Captura de Imagens por microscopia de luz e espectros obtidos por espectroscopia Rama.....	50
4.4	Deteção de açúcar redutor pelo teste de Benedict .....	54
4.5	Morfologia e diâmetro seco (altura) das NPMs por microscopia de força atômica .....	58
4.6	Ensaio de toxicidade das NPMs em <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
4.7	Formação de colônias bacterianas após a magnetização com NPMs .....	72
4.8	Avaliação da formação de <i>swarming</i> bacteriano após a exposição com NPMs .....	77
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	83
6.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos a cultura celular tem sido uma das principais ferramentas utilizadas para a descoberta de novas drogas, imortalização celular, desenvolvimento de engenharia de tecidos, pesquisa com células tronco, expressão de genes heterólogos, sinalização e morfologia celular (RIBOLDI, S.A. et al. 2017). Entretanto, durante muitos anos essa estratégia foi baseada exclusivamente na cultura bidimensional (2D), o que torna as atividades em torno destas limitadas sob o ponto de vista de mimetização de ambientes biológicos complexos (JAROCH, K. et al. 2018). Além disso, as células necessitam da matriz extracelular (MEC) para se fixarem e adaptarem ao meio em que se encontram como também para se comunicar com as outras células (MARX, U. 2006). Por conta disso, a cultura 2D desenvolve respostas muitas vezes pouco produtivas, quando comparado aos sistemas de experimentação *in vivo*, também quando submetido às susceptibilidades tóxicas para os tratamentos clínicos (HOPKINS, A.L. 2008).

Entretanto, nos últimos anos essas metodologias de cultivo celular 2D passaram a também serem realizadas de forma tridimensional (3D), sendo assim, a partir de uma cultura em monocamada, deslocando as células do fundo da placa, possam formar estruturas tridimensionais como é o caso dos esferoides multicelulares. Essa alternativa é capaz de aumentar a interação entre as células e o ambiente, mimetizando um determinado tecido, por monocultura ou cocultura. Adicionalmente, as culturas 3D podem ser realizadas de diversas formas, sendo elas a alteração do meio de cultura, inibição das células com a superfície da placa utilizando ágar (BARRERA-RODRÍGUEZ, R; FUENTES, J.M. 2015), ou até mesmo utilizando estruturas poliméricas denominadas *scaffolds* (KLEIN, F. et al., 2011).

Mais recentemente, tem sido mostrado que a formação de esferoides celulares a partir da técnica de cultivo 3D, pode-se dar a partir da associação de um grupo de células à nanopartículas magnéticas (NPMs) que possuem compatibilidade. Esta estratégia ocorre quando as culturas são submetidas a um campo magnético específico gerado por ímãs de neodímio, orientado à formação de esferoides, ou outras formas como por levitação ou impressão celular (SOUZA, G.R. et al., 2010).

A cultura 3D por meio de magnetismo promovido por NPMs vem sendo utilizada para formar principalmente estruturas miméticas aos esferoides tumorais (TSENG, H. et al., 2015). Sendo assim, ela abre também uma oportunidade para estudar uma diversidade muito grande de outros organismos (DURMUS, N.G. et al., 2015), como bactérias, fungos, nematoides e outras células, como hemácias.

O principal representante destas NPMs utilizadas para promover levitação de células, vem sendo as nanopartículas de óxido de ferro, que são na maioria das vezes sintetizadas a partir da coprecipitação de  $Fe_2^+$  e  $Fe_3^+$  utilizando bases fortes como o hidróxido de sódio (NaOH), por exemplo, formando estruturas magnéticas como  $Fe_3O_4$  (magnetita) e  $\gamma-Fe_2O_3$  (maghemita) (LAURENT et al., 2008).

Conseqüentemente ao cultivo tridimensional com células animais, abre-se uma oportunidade para a realização de experimentos com organismos procariontes. A partir disso, uma utilidade alternativa para seguir esse caminho é o movimento de *swarming* que diversos microrganismo realizam. Este por sua vez é utilizado pelas bactérias para acessar novas fontes de nutrientes, aumentar o tamanho da comunidade e colonizar nichos. Além disso, as colônias formadas por *swarming* de diferentes gêneros bacterianos compartilham várias características dinâmicas comuns, que podem ser o alinhamento de células adjacentes e seu movimento coordenado multicelular; a baixa curvatura de suas trajetórias; a baixa freqüência de tumores de células; a formação de vórtices dinâmicos e circulares das células; a motilidade cooperativa das células em todas as superfícies. Muitas das forças físicas e interações que moldam o movimento coletivo nessas comunidades não foram identificadas e caracterizadas, em parte por limitações das técnicas experimentais disponíveis. Assim, muito do que é conhecido sobre essa área de microbiologia advém de teorias, simulações e modelos (SWIECICKI, J. et al., 2013).

Neste contexto, a proposta desta dissertação foi desenvolver NPMs e modificar as suas superfícies com quatro tipos de carboidratos (galactose, glicose, sacarose e maltose) para que adicione a estas compatibilidades com microrganismos, no intuito de modular a formação de *swarming* com uso de campos magnéticos gerados por ímãs de neodímio.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanopartículas magnéticas (NPMs) revestidas com carboidratos para a formação de impressos celulares de microrganismos em placas de cultivo com meio sólido para avaliar a influência do comportamento celular com relação ao campo magnético gerado por ímãs de neodímio.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e recobrir NPMs com carboidratos;
- Caracterizar as NPMs com e sem cobertura com carboidratos pelos métodos de espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta;
- Caracterizar a adição/ligação dos carboidratos na superfície das NPMs utilizando espectroscopia Raman;
- Quantificar o conteúdo de açúcares redutores após as sínteses das NPMs;
- Caracterizar as NPMs utilizando microscopia de força atômica;
- Avaliar o potencial citotóxico das NPMs nos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Modificar bactérias com NPMs e submeter à magnetização e posteriormente contabilizar as colônias;
- Magnetizar as bactérias expostas às NPMs e modular a formação de *swarming* bacteriano em placas contendo os ímãs dos tipos  *Holding*,  *Ring* e  *Spheroid*.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Os cultivos tridimensionais vêm sendo apresentados unicamente com células animais, abrindo-se então uma oportunidade para a realização de experimentos com bactérias, principalmente com a aplicação de NPMs. A partir disso, uma estratégia alternativa para seguir esse caminho é o controle do movimento de *swarming* que diversos microrganismos realizam. Este por sua vez é utilizado pelas bactérias para acessar novas fontes de nutrientes, aumentar o tamanho da comunidade e colonizar novos nichos. Além disso, as colônias formadas por *swarming* de diferentes gêneros bacterianos compartilham várias características dinâmicas comuns. Muitas das forças físicas e interações que moldam o movimento coletivo nessas comunidades não foram identificadas e caracterizadas, em parte por limitações das técnicas experimentais disponíveis na formação desse processo. Com isso, a formação de biofilmes como modelos e conseqüentemente o desafio para atingir estes microrganismos com novos fármacos se torna limitado, bem como as avaliações dos mesmos se dão por metodologias estabelecidas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Nanopartículas Magnéticas (NPMs)

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma classe de nanomateriais que variam entre 1 e 100 nm de diâmetro, que na presença de um campo magnético fornecido por um ímã, direcionam sua movimentação na sua direção (TADIC et al., 2014). As NPMs têm sido o foco de muitas pesquisas recentemente porque apresentam propriedades promissoras que podem ser utilizadas em diversas aplicações como a biomedicina e remediação ambiental (MOHAMMED et al., 2017), direcionamento de fármacos específicos para tecidos (RAMASWAMY et al., 2015), agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (HUANG et al., 2010), sensores de biomoléculas específicas ou fatores ambientais (GHADIALI; STEVENS, 2008) e também, podem ser empregadas como plataformas às quais uma variedade de agentes químicos ou biológicos terapeuticamente ativos podem ser conjugados para aumentar a seletividade de nanopartículas hipertermicamente ativas (BAÑOBRE-LÓPEZ, M. et al, 2013).

As propriedades físico-químicas que as NPMs apresentam estão diretamente correlacionadas com o tamanho das partículas em estrutura cristalina e morfologia, estas que por sua vez estão relacionadas com o método de síntese escolhido e o controle de seus parâmetros (pH, concentração de reagentes e temperatura). Os efeitos de tamanho e de superfície ampliam o caminho na busca de novos materiais que possam ter grande influência nas propriedades dos sistemas magnéticos (ROTO, R. et al, 2016).

O diâmetro seco tipicamente menor do que 20 nm de NPMs, permite formar um único domínio magnético, enquanto aquelas que apresentam um diâmetro acima desse valor, tendem a se dividir em múltiplos domínios que tendem a diminuir a energia magnetostática (MAHMOUDI, M. et al., 2011). As regiões de magnetização uniforme são separadas por uma região de transição (parede de domínio), que minimizam a energia magnética interna livre e conseqüentemente, conforme as dimensões das partículas são reduzidas, este tamanho dos domínios também diminui. Assim, as NPMs que apresentam o

tamanho abaixo ao de seu diâmetro seco, são denominadas por nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs). Estas se apresentam com os momentos magnéticos alinhados na mesma direção como se fosse um monodomínio magnético, constituindo a configuração mais favorável e com características de superparamagnetismo (Gupta, A. K., Gupta, M., 2005).

Além de serem extremamente estáveis, pela capacidade de formação de monodomínios, a diminuição do tamanho faz com que grande parte dos átomos que constituem o material se concentre na superfície da NPM. Devido à quebra de simetria da rede cristalina, as NPMs apresentam efeitos de superfície e tendem a concentrar grande parte dos momentos magnéticos nessa camada. Portanto, a razão superfície/volume é aumentada, afetando as propriedades químicas e magnéticas, característica favorável para funcionalizá-las com os mais diferentes compostos (SABALE, S. et al., 2017).

Para uniformizar e controlar a morfologia, distribuição de tamanho, polidispersividade, cristalinidade e conseqüentemente as propriedades magnéticas das NPMs, têm-se a necessidade da uniformização dos parâmetros físicos e químicos envolvidos na síntese. Ademais, o controle durante a síntese auxilia no desempenho deste nanomaterial, sendo então possível a previsão e modelamento do comportamento das NPMs em sistemas complexos (MAJIDI, S. et al., 2014).

### **2.1.1 Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro**

As propriedades físicas e químicas das NPMs dependem em grande parte do método de síntese e da estrutura química. Estas podem variar de 1 a 100 nm de tamanho e podem exibir um comportamento de superparamagnetismo (LU, An-hui et al, 2007).

As ferritas ou nanopartículas de óxido de ferro (estruturas cristalinas), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), são as NPMs mais exploradas do ponto de vista científico e tecnológico. Estas, por sua vez, possuindo tamanho em escala nanométrica, apresentam características superparamagnéticas, o que impede a auto-aglomeração, exibindo um comportamento magnético



somente quando um campo magnético externo é aplicado (SINGAMANENI, S. et al., 2011).

Assim como outras nanopartículas, as superfícies das NPMs são frequentemente modificadas por surfactantes, sílica, carboidratos silicones ou derivados do ácido fosfórico e outras moléculas orgânicas para aumentar sua estabilidade em suspensão (TONG, S. et al., 2010). A superfície das NPMs de maghemita ou magnetita são relativamente inertes e normalmente não permitem ligações covalentes fortes com moléculas para sua funcionalização. No entanto, a reatividade das NPMs pode ser melhorada pelo revestimento de uma camada de sílica em sua superfície (KRALJ, S. et al., 2010).

As principais moléculas que são usualmente utilizadas para o recobrimento de NPMs são as moléculas orgânicas ou surfactantes (ácidos graxos, carboidratos, fenóis e moléculas com grupos hidrofóbicos) (GUPTA, A. K; GUPTA, M. 2005), polímeros (dextran, gelatina, quitosana, polietilenoglicol, álcool polivinílico, poli ácido láctico, alginato e poli metilmetacrilato) (WU, W. et al. 2008) e moléculas biológicas (proteínas, polipeptídeos, anticorpos e DNA) (AKBARZADEH, A. et al. 2012). Além destas pode ser realizado a cobertura das NPMs com moléculas inorgânicas como a sílica (ASHTARI, P. et al., 2005), metais e não metais como o ouro, prata, platina e paladium (MANDAL, M. et al., 2005), e com óxidos metálicos como ZnO, MgO, CaO, SnO<sub>2</sub> e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (NATILE, M. M; GLISENTI, A. 2003).

Das diversas aplicações de NPMs, algumas dependem do uso de campos magnéticos para a manipulação das suas propriedades, o que depende a eficácia do mesmo com relação ao da partícula e do campo gradiente (SILVA, A.K.A. et al., 2012). Sendo assim, a força exercida sobre nanopartículas superparamagnéticas de núcleo único é não muito eficaz devido ao seu diâmetro pequeno e momento magnético (GRZEŚKOWIAK, B.F. et al., 2014). As interações intramoleculares do tipo dipolo-dipolo magnético e o campo-dipolo pode levar ao agrupamento e à formação de partículas lineares com tamanhos micrométricos relativamente grandes, que conseqüentemente geram agregados com uma diminuição drástica na área de superfície específica (TOMBÁ CZ, E. et al., 2015).

## 2.1.2 Tipos de Síntese e Fabricação de Nanopartículas Magnéticas

Pesquisas realizadas nas últimas décadas descrevem várias abordagens para a síntese de NPMs de maneiras eficientes, controladas e monodispersas. As metodologias mais comuns são as de decomposição térmica, síntese hidrotérmica, microemulsão, síntese por sonicação e principalmente a de coprecipitação por hidrólise alcalina em meio aquoso (WU, W. et al 2008). Além disso, NPMs também podem ser preparadas por outros métodos, tais como síntese eletroquímica (PASCAL et al., 1999), técnicas de pirólise a laser (BOMATÍ-MIGUEL, O. et al., 2008) e utilizando microrganismos (BHARDE, A.A. et al., 2008).

### 2.1.2.1 Método por coprecipitação

O método mais convencional para obtenção de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  é por coprecipitação. Este consiste na mistura de íons férricos e ferrosos em uma razão molar tipicamente de 2:1 em soluções básicas à temperatura ambiente ou a alta temperatura. O tamanho e forma das NPMs de óxido de ferro dependem do tipo de sal utilizado (como cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), a razão de íons férricos e ferrosos, a temperatura de reação, o valor de pH, a força iônica dos outros parâmetros da reação (por exemplo, taxa de agitação, velocidade de queda da solução básica). Recentemente, a síntese por coprecipitação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e suas morfologias correspondentes, estruturas e propriedades magnéticas obtidas em diferentes temperaturas de reação foram investigadas (WU et al., 2010).

No processo de coprecipitação é importante observar que as variáveis podem afetar significativamente o tamanho, a morfologia, a homogeneidade e o comportamento magnético das NPMs formadas (SONG,Q.; ZHANG, Z.J., 2004), são: I) o valor de pH final da solução utilizada durante a síntese; II) a ordem e a velocidade da adição dos reagentes; III) a razão/proporção molar e concentração dos íons metálicos da reação; IV) o tipo de ânion adotado; V) o valor da temperatura de precipitação empregada; e VI) a velocidade de agitação da solução.

A metodologia empregada para síntese de NPMs pela rota de coprecipitação baseia-se em duas etapas principais. Inicialmente, ocorre a nucleação, na qual há a formação dos cristais induzidos pela saturação de monômeros na solução e posteriormente, o crescimento das partículas (MURRAY, C.B. et al 2000). Este método atende às seguintes características: (a) são produzidas espécies pouco solúveis formadas sob condições de supersaturação, como produto da reação, (b) a nucleação tende a ser um mecanismo durante a síntese para que as partículas sejam formadas, (c) os processos secundários como o crescimento de partículas maiores pela dissolução de partículas menores e a agregação das partículas (coalescência) afetam expressivamente o tamanho, a morfologia e as propriedades, e (d) as condições necessárias para induzir a precipitação são o resultado da interação dos parâmetros que influenciam a reação química, determinando as características finais do produto (VAYSSIÈRES, L. et al., 1998).

Durante as etapas de síntese, a precipitação dos compostos não garante a formação dos nanoparticulados ou monodispersos, sendo assim o ideal para reações de síntese com formação de produtos nessa escala seria que a etapa de nucleação ocorresse de forma rápida e o seu crescimento de maneira lenta (CUSHING, B.L. et al 2004). Além disso, como resultado de sua grande área superficial e de forças como van der Waals e dipolo-dipolo, NPMs são termodinamicamente instáveis e tendem a se aglomerar devido às forças de atração, mesmo a distâncias consideráveis. Assim sendo, é importante o uso de um agente estabilizante (surfactantes, polímeros) que diminua a atração entre elas, fazendo com que as etapas finais do processo de precipitação envolvam a terminação do crescimento e a estabilização das partículas (BALAKRISHNAN, S. et al, 2009).

### **2.1.3 Aplicações das Nanopartículas Magnéticas**

Ao longo das últimas décadas, NPMs apresentam interesse significativo em diferentes campos de aplicações como a biomedicina (por exemplo, ressonância magnética por imagem (MRI), a administração de medicamentos, a hipertermia), e também aplicações mais industriais (por

exemplo, catálise, tratamento de águas). Diferentes surfactantes e polímeros são amplamente utilizados para o revestimento de NPMs, funcionalizadas às superfícies, e diminuem suas agregações. Além disso, modulam a adsorção de biomoléculas e, na maioria dos casos, aumentam a estabilidade da dispersão (LIU, T. et al., 2009). Ademais, o potencial e a versatilidade da química magnética resultam da rápida e fácil separação das NPMs, eliminando processos de separação entediante e dispendiosos geralmente aplicados em química de nanomateriais. Ainda, as NPMs podem ser guiadas por um campo magnético até o local desejado, como por exemplo em âmbitos biomédico e no tratamento de câncer (BIEHL, P. et al., 2018).

O interesse em nanotecnologias e materiais em nanoescala, particularmente NPMs, cresceu recentemente e aplicações têm atraído a atenção tanto da pesquisa quanto de diversos setores químico, ambiental e biomédico (LI et al., 2016). Com a gama de aplicações das NPMs nos mais diversos campos, uma alternativa para a pesquisa vem sendo a utilização destas para o cultivo tridimensional com células tumorais, formando pequenos esferoides, miméticos aos de tecidos encontrados em pacientes (SOUZA, G.R. et al. 2017).

## **2.2 Cultivo celular tridimensional**

Os ensaios baseados em cultivo de células têm sido amplamente utilizados na descoberta de fármacos há várias décadas. Historicamente, células mantidas em monocamadas bidimensionais (2D) cultivadas em uma variedade de substratos planares eram a única opção prática para triagem baseada em células (*in vitro*), quando provaram ser um meio conveniente e eficaz para selecionar moléculas candidatas a fármacos. Hoje em dia, os modelos de cultivo celular 2D podem ser utilizados para prever com eficácia as possíveis respostas de drogas *in vivo* para muitos alvos (CUKIERMAN, E. 2001). No entanto, é evidente que esses cultivos bidimensionais apresentam desvantagens associadas à perda de arquitetura específica do tecido, estímulos mecânicos e bioquímicos modificados e interações célula-célula e célula-a-matriz alteradas, tornando-os modelos relativamente limitados prever

respostas de drogas para certas doenças, como câncer (BISSELL, M.J. et al 2003).

Recentemente a implementação acelerada de cultivos 3D de células aplicáveis ao desenvolvimento precoce de fármacos, sustentado principalmente pela necessidade de melhorar continuamente a produtividade da pesquisa e desenvolvimento na área farmacêutica (PAUL, S.M. et al., 2010). O uso de culturas de células 3D, juntamente com modelos celulares, como células-tronco e células primárias, permitiria maior previsibilidade de eficácia e eventual toxicidade em humanos antes que as drogas fossem validadas em testes clínicos (PAMMOLLI, F. et al, 2011). Os modelos de culturas de células 3D e co-cultura são vantajosos na medida em que permitem a avaliação da eficácia e segurança de medicamentos em um contexto mais próximos das condições *in vivo* do que as culturas de células 2D tradicionais, mas também eliminam as diferenças de espécies (vs. modelos animais) que frequentemente impedem a interpretação dos resultados pré-clínicos, permitindo o teste de drogas diretamente nos sistemas com células humanas (BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. 2013).

O desenvolvimento e aplicação de modelos de cultura celular 3D avançados compostos por vários tipos de células distintas fornece não apenas uma abordagem atraente para decodificar certos aspectos-chave de sinalização intra e intercelular, mas também contribuem como fontes não genéticas no contexto de diversidades genética e epigenética em populações de células cancerígenas. Ademais, eles também podem facilitar estudos detalhados sobre os eventos e mecanismos de reprogramação celular que ocorrem em diferentes tipos de crescimentos em um formato de cultura 3D, e oferecer oportunidades para a descoberta de novos nós em redes de sinalização intra e intercelulares e validação de alvos moleculares no desenvolvimento de drogas (THOMA, C.R. et al., 2014).

Além disso, as células necessitam de matriz extracelular (MEC) para se fixarem e adaptarem ao meio em que se encontram, como também para comunicação com as outras células (MARX, 2006; BHADRIRAJU, 2002; BIRGERSDOTTER; 2005).

### **2.2.1 Cultivo celular tridimensional utilizando NPMs**

As metodologias de cultivo celular 2D passaram a serem realizadas também de forma tridimensional (3D), sendo assim, a partir de uma cultura em monocamada, simplesmente descolando as células do fundo da placa (em modelos de células aderentes), para formar estruturas 3D como é o caso dos esferoides multicelulares. Essa alternativa é capaz de aumentar a interação entre as células e o ambiente, mimetizando um determinado tecido, por monocultura ou cocultura. Adicionalmente, as culturas 3D podem ser realizadas de diversas formas, sendo elas a alteração do meio de cultura, inibição do processo de aderência das células com a superfície da placa utilizando ágar (JAGANATHAN et al.,2014 e BARRERA-RODRÍGUEZ; FUENTES, 2015), ou até mesmo utilizando estruturas poliméricas denominadas *scaffolds* (KLEIN et al., 2011).

Mais recentemente, tem sido mostrado que a formação de um esferoide celular a partir da técnica de cultura 3D pode-se dar a partir da associação de células à NPMs recobertas por moléculas orgânicas que promovem biocompatibilidade quando aplicados *in vivo*. Esta estratégia ocorre quando as culturas são submetidas a um campo magnético específico gerado por ímãs de neodímio, orientado à formação de esferoides, ou outras formas como impressão celular (SOUZA et al.,2010).

A cultura 3D por meio de magnetismo promovido por NPMs vem sendo utilizada para formar principalmente estruturas miméticas a esferoides tumorais (TSENG et al., 2015). Sendo assim, ela abre também uma oportunidade para estudar uma diversidade muito grande de outros tipos de células ou organismos (DURMUS et al., 2015), como bactérias, fungos, nematoides e outras células, como as hemácias.

### **2.3. *Swarming* bacteriano**

As bactérias têm sido tradicionalmente definidas como organismos unicelulares que crescem como indivíduos dispersos em um ambiente planctônico. Recentemente, essa percepção começou a mudar com a

crescente conscientização do papel dos biofilmes nos quais as bactérias sésseis secretam matriz extracelular e agregam-se como grupos multicelulares. Em certas condições, as bactérias se tornam altamente móveis e migram sobre o substrato, em um processo conhecido como *swarming*. Pesquisas com biofilmes renovaram o interesse pela motilidade de bactérias, muitas vezes regulada de maneira oposta e antagônica à formação de biofilme (VERSTRAETEN, N. et al., 2008).

### 2.3.1 *Swarming* e suas características

A motilidade do *swarming* é definida por uma translocação rápida (2–10 µm/s) e coordenada de uma população bacteriana através de superfícies sólidas ou semi-sólidas, sendo um exemplo de multicelularidade bacteriana e comportamento de enxame (HARSHEY, R.M. 2003). Esse comportamento multicelular tem sido observado principalmente em condições laboratoriais controladas e depende de dois elementos críticos: (i) a composição nutricional e (ii) a viscosidade do meio de cultura (ou seja, a porcentagem de ágar). Uma característica particular desse tipo de motilidade é a formação de padrões dendríticos, formados por enxames migratórios que se afastam de um local inicial. Embora a maioria das espécies possa produzir gavinhas quando fazem o enxameando, algumas espécies como *Proteus mirabilis* formam círculos concêntricos em vez de padrões dendríticos (KEARNS, D.B; LOSICK, R. 2004).

Em algumas espécies, a motilidade de *swarming* requer que a autoprodução de biossurfactantes ocorra. Esta síntese de biossurfactantes geralmente está sob o controle de um sistema de comunicação intercelular denominado *quorum sensing*. Acredita-se que as moléculas de biossurfactante atuem diminuindo a tensão superficial, permitindo assim que as bactérias se movam através de uma superfície (DANIELS, R. et al, 2004).

As bactérias sofrem diferenciação morfológica que as diferencia de seu estado planctônico. Células localizadas na frente de migração são tipicamente hiperelongadas, hiperflageladas e agrupadas em estruturas multicelulares (RATHER, P.N. 2005). O papel fundamental da motilidade de enxameamento permanece desconhecido. No entanto, observou-se que bactérias ativas de

*Salmonella typhimurium* apresentam uma resistência elevada a certos antibióticos em comparação com células indiferenciadas (KIM, W. et al., 2003).

A formação de *swarming* de diferentes espécies de microrganismos compartilham várias características dinâmicas comuns: (i) o alinhamento de células adjacentes e seu movimento coordenado em jangadas multicelulares; (ii) a baixa curvatura de suas trajetórias; (iii) a baixa frequência de quedas celulares; (iv) a formação de vórtices dinâmicos e circulares de células; e (v) a mobilidade cooperativa das células através das superfícies. Muitas das forças físicas e interações que moldam o movimento coletivo nessas comunidades não foram identificadas e caracterizadas, em parte devido às limitações das técnicas experimentais disponíveis para formação de *swarming* (COPELAND, M. F.; WEIBEL, D. B. 2009).



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas por Rota de Coprecipitação**

O estabelecimento do protocolo para esta rota de síntese foi desenvolvida pela mestra Tatiane de Melo Pereira, membro do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO). Em uma Balança semi-analítica (Q520-3, Quimis, Brasil) pesou-se 0,811 g (0,1 M) de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Cloreto Férrico III – Proquímios, Brasil) e 0,379 g (0,05 M)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sulfato de Ferro – NEON, Brasil), sendo ambos diluídos em cada béquer de vidro com 50 mL de água Tipo I à temperatura ambiente. Posteriormente, estas soluções foram reunidas em um béquer de vidro de 200 mL, apresentando uma coloração alaranjada, migrando para o marrom. Em seguida, a solução resultante foi colocada em agitador magnético com aquecimento (LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil). Sob agitação magnética, a solução foi aquecida até 80°C e identificou-se que a coloração ficou turva, e foram adicionados 35 mL (0,8 M) de NaOH (hidróxido de sódio – ATRIOM, Brasil). Neste momento observou-se a imediata mudança de coloração da solução para marrom escuro, indicando a coprecipitação e formação das NPMs. Esta reação foi mantida por 1,5 h sob agitação magnética e a temperatura constante de 80°C. Ao final da síntese, a solução contendo as NPMs foi separada em cinco béqueres com um volume igual de 27 mL. Um destes béqueres foi separado e a solução decantada magneticamente com o auxílio de um ímã de neodímio em suporte. Posteriormente, as partículas foram lavadas e decantadas por mais três vezes com água do Tipo I e medido o pH, até que o mesmo atingisse o valor igual a 7, indicando a neutralidade da suspensão do material final obtido. Por fim, o material foi diluído para 10 mL com água do Tipo I e armazenados em um tubo tipo Falcon de 15 mL (Alfa Brasil) e nomeado e rotulado de NPM-SC, correspondente ao material sem cobertura.

#### **3.2 Cobertura das Nanopartículas Magnéticas com Carboidratos**

A cobertura das NPMs foi otimizada a partir de reações de síntese utilizando como referência diversos protocolos disponíveis na literatura vigente do tema. Para realizar a cobertura das NPMs, selecionaram-se quatro carboidratos distintos: galactose, glicose, sacarose e maltose. Dos outros quatro materiais sepados, cada um recebeu a adição de um carboidrato diferente. Em uma Balança semi-analítica (Q520-3, Quimis, Brasil) foram pesados separadamente 13,51 mg (0,3 mM) de galactose (Merck, Alemanha) e glicose (Vetec, Brasil), e 25,67 mg (0,3 mM) de sacarose (Proquímios, Brasil) e maltose (INLAB, Brasil). O segundo béquer foi mantido sobre a chapa de aquecimento ao qual foi adicionada a galactose, em que se manteve agitando por 20 min. O mesmo foi feito para os outros béqueres, sendo que cada um recebeu um dos carboidratos restantes. Ao final do tempo estimado para a cobertura das NPMs, realizou-se a decantação magnética destes, lavando-as três vezes com água do Tipo I e medido o pH, até que o mesmo atingisse o valor igual a 7, indicando a neutralidade do material. Em seguida os materiais foram armazenados em tubos tipo Falcon individuais, rotulados como NPM-Gal (NPMs recobertas por galactose), NPM-Gli (NPMs recobertas por glicose), NPM-Sac (NPMs recobertas por sacarose) e NPM-Mal (NPMs recobertas por maltose). Todos os materiais foram armazenados ao abrigo de luz e à temperatura ambiente.

### **3.3 Caracterização das NPM pelo Método de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ)**

As amostras de NPMs foram diluídas na proporção de 1:500 e distribuídos em cinco microtubos de polipropileno tipo *ependorf* de 1,5 mL (Axygen, EUA) onde foram identificadas e pipetadas 5 µL de cada suspensão de NPMs, adicionando posteriormente 995 µL de água Tipo I, completando o volume final de 1 mL. Posteriormente, uma amostra de cada vez foi colocada na cubeta (célula capilar DTS1070) no volume de 950 µL e todas foram analisadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (PZ). O DLS foi realizado com ângulo de 173° utilizando laser de He-Ne (4 mW) operando a 633 nm e

três medidas foram realizadas a 25°C em modo de corrida automática. O PZ também foi determinado com o mesmo número de réplicas e temperatura com a execução de vinte aquisições.

### **3.4 Caracterização das NPMs por Microscopia de Força Atômica (MFA)**

Em microtubos de polipropileno diluiu-se as amostras de NPMs na proporção de 1:99 em água do Tipo I. Desta suspensão foram coletados 2 µL e depositados em cima de porta-amostras recobertos com mica muscovita recém clivada. Após 2 h de secagem, o material seco foi colocado no microscópio e analisado. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão) com a leitura no modo dinâmico-fase de força constante utilizando *cantilever*. O escâner tem um alcance de 125 µm nas direções XY e 7 µm na direção Z; na direção de traço; com o início das análises feito num campo de 50 x 50 µm e à temperatura ambiente de aproximadamente 22°C. As imagens foram processadas utilizando o software off-line SPM-9600. O processamento consistiu em um nivelamento automático de ajuste de plano da superfície no eixo X, bem como o seu background e correção de linhas no eixo X. Em seguida, pelo mesmo *software*, obteve-se a contagem e a medida em relação à altura topográfica das nanopartículas pelas suas distribuições passando pelos passos *Analyse*, *Particle* e depois *Labeling*, sendo medidas pelo menos 150 partículas por amostra.

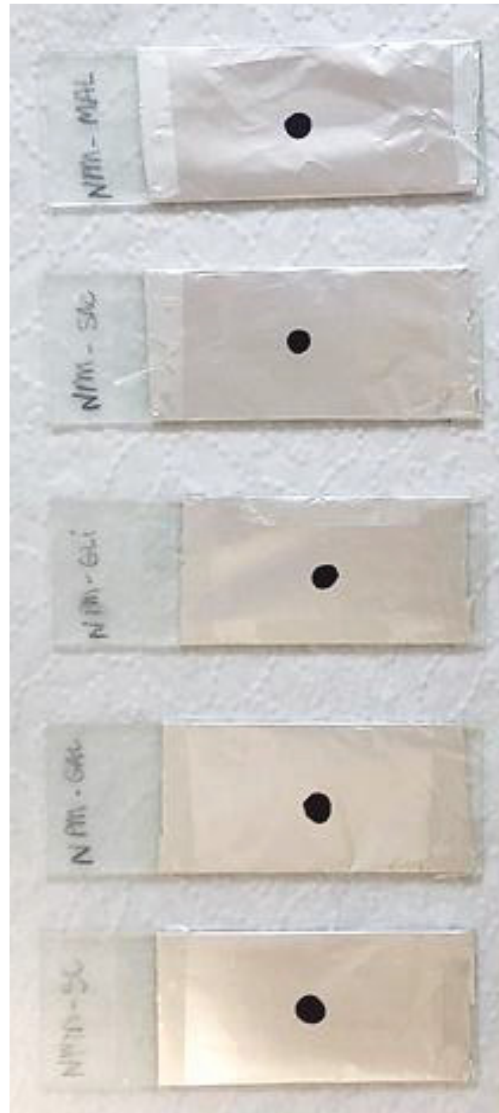
### **3.5 Ensaio para detecção de açúcar redutor - teste de *Benedict***

A solução de Benedict foi preparada utilizando uma Balança semi-analítica (Quimis, Brasil) e pesando os materiais nas concentrações de 0,108 M de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (sulfato de cobre - MALLINCKRODT), 0,943 M de NaCO<sub>3</sub> (carbonato de sódio P. A. - NEON), 0,67 M de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O (citrato de sódio P. A. - Dinâmica) e Água tipo III (qsp 1000 mL). Em cinco tubos de vidro de 10 mL, foram adicionados 20 µL de cada uma das amostras de NPMs, sendo devidamente rotulado cada um, a fim de avaliar se as moléculas de

açúcar interagiram com as nanopartículas. Como controles positivos, foram utilizados 20 µL dos quatro carboidratos em suas respectivas concentrações iniciais, além de glicina como controle negativo, no intuito de comparar com a possível não interação. Também, em outros cinco tubos, amostras do sobrenadante de cada síntese foram adicionadas para avaliar se durante as lavagens com água do tipo I os carboidratos foram removidos. Após isso, 3 mL da solução de Benedict foi adicionada em cada tubo. Em seguida 1,80 mL de cada NPM foi adicionado em cada tubo, para um volume final de 5 mL. Os tubos foram colocados em banho-maria (Quimis, Brasil) à 75°C por 3 min. Para validar a presença de açúcar redutor nas amostras, a solução deve mudar de uma coloração azulada, modificando para tons de verde, vermelho ou marrom.

### **3.6 Microscopia de Luz e Espectroscopia Raman**

Cinco lâminas de vidro (Carvalhoes, Brasil) foram revestidas com a parte fosca de papel alumínio (Wyda Pratic, Brasil) voltada para fora e presas com fita adesiva no verso, mantendo a superfície mais nivelada e lisa possível. Cada lâmina foi identificada com os nomes das NPMs anteriormente sintetizadas (NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal) e posteriormente adicionou-se com um micropipetador 1DV10 (HTL LAB SOLUTIONS) 10 µL de suspensão em cada lâmina recoberta (Figura 1), esperando a secagem do material em dessecador (Kartell™) por um período de 2 h. Em seguida, em um microscópio Raman Alpha 300 RA (WITec, Alemanha) todas as cinco amostras de NPMs foram analisadas nas condições de: modo de aquisição de espectro único, com objetiva de 100x, filtro de 785 nm, comprimento de onda a 784,925 nm, temperatura de -60°C, tempo de Integração de 0,23372 segundos, com número de 100 acumulações. Esta metodologia proporciona a obtenção de espectros referentes aos materiais analisados e conseqüentemente a comparação quantitativa da influência das coberturas das nanopartículas magnéticas com os quatro tipos de carboidratos. Adicionalmente, com uma lente objetiva 40x do microscópio, foram obtidas imagens ópticas dos respectivos materiais para a comparação final dos mesmos.



**Figura 1.** Deposição das amostras de NPMs com e sem cobertura de carboidratos em lâminas de vidro envolvidas com papel alumínio. Cerca de 10  $\mu$ L de amostra de NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal foram colocados sobre o papel alumínio, alocados para secagem e fotografadas.

### **3.7 Cultivo de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

As bactérias utilizadas durante todos os ensaios com os microrganismos foram da *American Type Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup>) sendo uma Gram negativa a *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup>8739 e a outra Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923. Já para o crescimento em meio sólido, além do meio Luria-Bertani (Sigma Aldrich, Alemanha) líquido foi adicionado

1,5% p/v de ágar bacteriológico (Vetec, Brasil) para preparo de meio semi-sólido. Ambos sempre submetidos a autoclave vertical de bancada (Idealclave, Brasil) para garantir a esterilização do material, que por consequência evita a contaminação de experimentos futuros. Depois do descongelamento dos microrganismos que se encontravam em tubos criogênicos (TPP, Suíça) a -80°C em Ultrafreezer (Sanyo, Japão), com o auxílio de uma alça de platina, foram coletados o equivalente a 10 µL, espalhados em zig-zag em placas separadas e colocadas em incubadora bacteriológica (LUCA-81/81) à 37°C, deixado *overnight* para o crescimento e desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC).

### **3.8 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura utilizada durante o ensaio biológico foi obtida a partir da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial da Embrapa Uva e Vinho com a Dra. Bruna Carla Agustini, identificada por CMIA 20B em tubos criogênicos. Para o crescimento submerso foi utilizado o meio de cultivo celular YPD que é composto por 1% p/v de extrato de levedura, 2% p/v de peptona e 2% de dextrose e água tipo I, ajustando o pH para 6,5. Após a solubilização dos componentes, o meio foi submetido a autoclave vertical de bancada (Idealclave) para garantir a esterilização do material. Depois do descongelamento dos microrganismos que se encontravam em tubos criogênicos (TPP) a -80°C em ultrafreezer (Sanyo), com o auxílio de uma alça de platina, foram coletados o equivalente a 10 µL, espalhados em zig-zag em placas separadas e colocadas em incubadora bacteriológica (LUCA-81/81) à 37°C, deixado *overnight* para o crescimento e desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC).

### **3.9 Ensaio para a Detecção da Concentração Mínima Inibitória (CIM)**

Para avaliar a possível atividade antimicrobiana das NPMs, utilizou-se da metodologia de CIM para identificar em qual concentração equivalente à de

ferro, os microrganismos teriam o crescimento inibido. Sendo assim, dentro de uma cabine de fluxo unidirecional horizontal (Veco, Brasil), uma UFC foi coletada com o auxílio de uma alça de platina e espalhada em cada tubo tipo Falcon de 50 mL contendo meio de cultura LB líquido (2% p/v), e incubada em shaker (Luca 222) a 37°C por período *overnight*. Após esse período de crescimento, coletou-se 1 mL do meio de cultivo contendo microrganismos, transferido para cubetas de poliestireno e determinada a densidade óptica (OD) com o auxílio de biofotômetro (*Eppendorf*) utilizando um comprimento de onda à 600 nm. A suspensão foi ajustada para uma turbidez equivalente a 0,05 UA, diluindo-se as mesmas em meio LB. Os microrganismos foram adicionados em microplacas de 96 poços, num volume de 180 µL e em seguida 20 µL das NPMs com ou sem cobertura de carboidratos foram adicionadas por cima, variando as concentrações em 1 mM, 800, 600 e 400 µM de ferro total. Além destas, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram utilizados como controles positivos do experimento. Em seguida as partículas foram adicionadas ao meio de cultivo, entretanto em poços separados, para verificação de possíveis efeitos nas leituras de OD. A CIM foi definida como aquela em que não há crescimento celular visível de 24 à 72 h de exposição ao nanomaterial, em incubação a 37°C. Todos os testes foram realizados em triplicatas experimentais, sendo que a CIM foi considerada a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas das três réplicas avaliadas.

### **3.10 Ensaio de Magnetização bacteriana**

As bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram crescidas em meio de cultivo celular LB (2% p/v) medidas suas respectivas ODs e corrigidas adicionando meio de cultivo para uma OD final de 0,05. Utilizando uma microplaca de 96 poços, em triplicatas, 180 µL de bactérias foram adicionadas em seis fileiras, respeitando uma coluna para a diferenciação da Gram negativa e Gram positiva. Em seguida, 20 µL as NPMs com ou sem coberturas com os carboidratos foram adicionadas por cima dos microrganismos na concentração de 800 µM, e deixada a microplaca em incubadora bacteriológica por 2 h, a fim de assegurar a interação das NPMs com as respectivas bactérias. Além

destas, uma triplicata de *E. coli* e uma de *S. aureus*, não tiveram a adição de nanopartículas, denominadas por BAC-SN (bactérias sem nanopartículas). Após o tempo de incubação, a microplaca foi colocada em cima de uma placa de acrílico contendo ímãs de neodímio (*driver*) que promovem o campo magnético do tipo  *Holding* (n3D BioSciences, EUA), para arrastar as NPMs junto com os microrganismos. Depois de 2 mins de magnetização, com o auxílio de uma alça de platina, o meio sobrenadante de um dos poços de cada triplicata foi coletado e espalhado em movimentos repetitivos sobre placas Petri contendo meio LB sólido (2% LB p/v e 1,5% ágar p/v). Em seguida, as placas foram acondicionadas em incubadora bacteriológica e aguardado *overnight* para a formação das colônias isoladas. Com o auxílio do *software* ImageJ 1.52f, as colônias bacterianas isoladas foram contadas, fazendo as seguintes modificações em cada imagem: (i) image > type > 8-bit; (ii) image > adjust > threshold, para limiarizar a imagem; (iii) process > binary > fill holes, para preencher os espaços em branco; (iv) analyze > analyze particles, para a contagem das colônias. E posteriormente no *software* Origin Pro 8 plotadas em gráfico de barras.

### **3.11 *Swarming* bacteriano com adição de NPMs**

Para avaliar a potencial modulação da formação de *swarming* bacteriano, bem como o comportamento e desenvolvimento dos microrganismos, um ensaio das bactérias com as NPMs foi desenvolvido. Em três microplacas de cultivo celular com seis poços, foi adicionado 2 mL de meio LB sólido (2% Luria Bertani e 1,5% Ágar bacteriológico) até cobrir o fundo. Em seguida, da mesma forma que anterior, as bactérias foram preparadas com as respectivas NPMs e incubadas à 37°C por 2 h. Estas foram adicionadas em microplacas de seis poços na seguinte sequência de associação com as NPMs, da esquerda para a direita: NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac, NPM-Mal e BAC-SN (bactéria sem adição de nanomaterial, como controle). Após a incubação, as bactérias foram ressuspensas delicadamente, coletados 5 µL com uma micropipeta e adicionado em cima dos meios de cultivo sólido, concomitantemente associado à uma placa de acrílico contendo

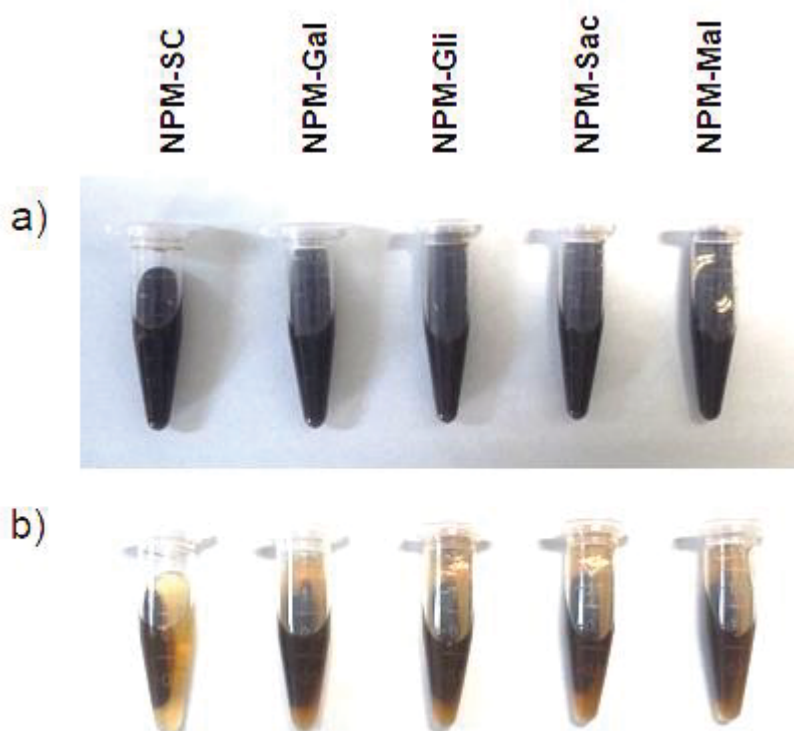


ímãs de neodímio que promovem diferentes campos magnéticos. Estes por sua vez são *Ring*, *Spheroid* e  *Holding* (n3D BioSciences). Tanto para *E. coli*, quanto para *S. aureus* seguiu-se exatamente esses passos. As microplacas contendo os microrganismos magnetizados permaneceram em incubadora bacteriológica por dez dias, até o desenvolvimento e formação do *swarming*. Além disso, todos os dias foram obtidas fotografias das placas para acompanhar o desenvolvimento microbiano.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

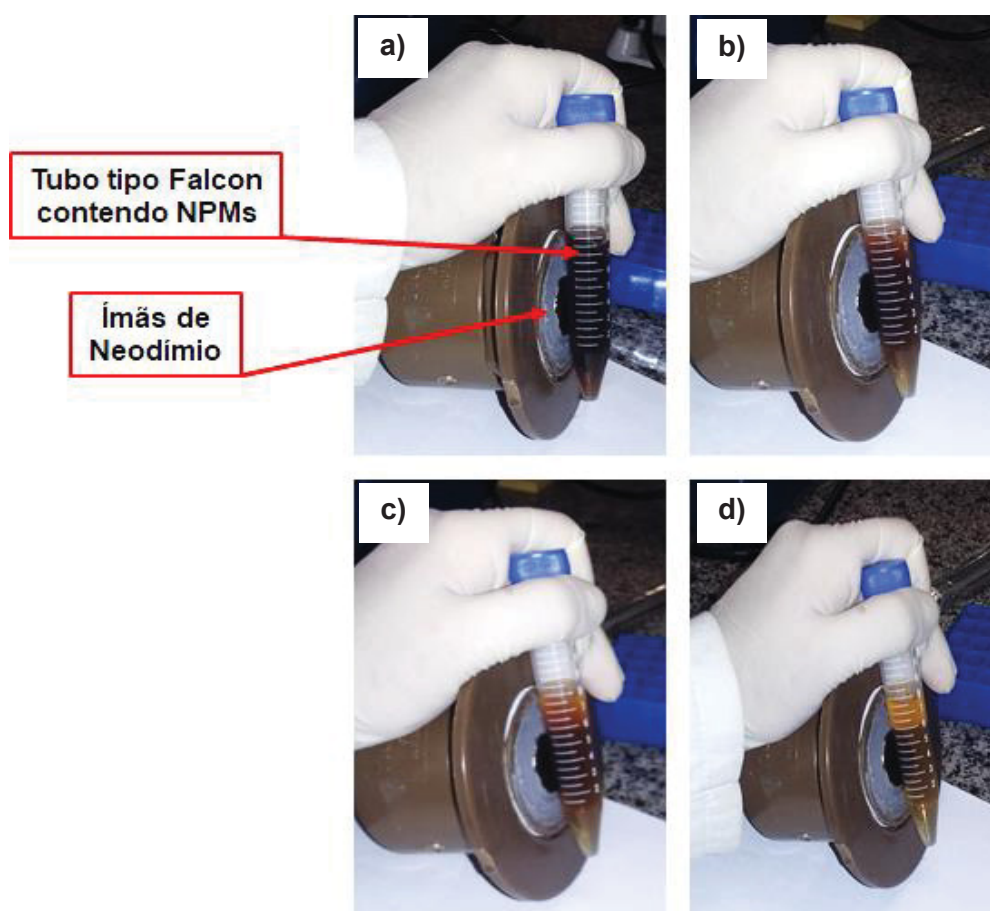
### 4.1 Aparência e atração magnética pelas NPMs

Ao término das reações de síntese pelo método de coprecipitação e recobrimento das NPMs com carboidratos, visualmente todas elas apresentaram características semelhantes com relação à coloração com um tom de marrom-escuro (Figura 2a). As sucessivas lavagens com a água Tipo I foram essenciais para reduzir o pH inicial da síntese, de alcalino para neutro. Conseqüentemente, a avaliação da atração magnética das NPMs foi realizada de maneira visual (Figura 2b) utilizando ímãs de neodímio com campos magnéticos consideravelmente fortes.



**Figura 2.** Amostras das NPMs sintetizadas pelo método de coprecipitação com e sem cobertura de carboidratos. Em a) se encontram microtubos de polipropileno contendo NPMs após a suas respectivas sínteses, com cores semelhantes. Já em b) utilizando um ímã de neodímio demonstrou-se a atração magnética para a parede dos tubos em um intervalo de 30 s.

Além disso, as NPM-SC apresentaram um poder de atração magnética mais forte do que o das NPMs recobertas com carboidratos. Na Figura 3, ilustra-se o processo de verificação visual da atração das NPMs pelo campo magnético gerado por ímãs de neodímio. Observa-se que o nanomaterial ao passar do tempo se aglomera próximo à localização em que se encontra o ímã, fazendo com que a solução mude sua coloração de marrom-escuro, demonstrando as NPMs livres, para marrom-translúcido, indicando a atração do nanomaterial pelo campo magnético.



**Figura 3.** Atração das NPMs pelo campo magnético gerado por ímãs de neodímio. Na imagem é comparado o processo de arraste do nanomaterial pelo campo magnético evidenciado pela mudança de cor da solução, de marrom-escuro (NPMs livres) para marrom-translúcido (NPMs atraídas pelo ímã). Em a) marcado pelo tempo inicial de 10 s, b) 10 s, c) 15 s e d) 20 segundos, como o tempo final.

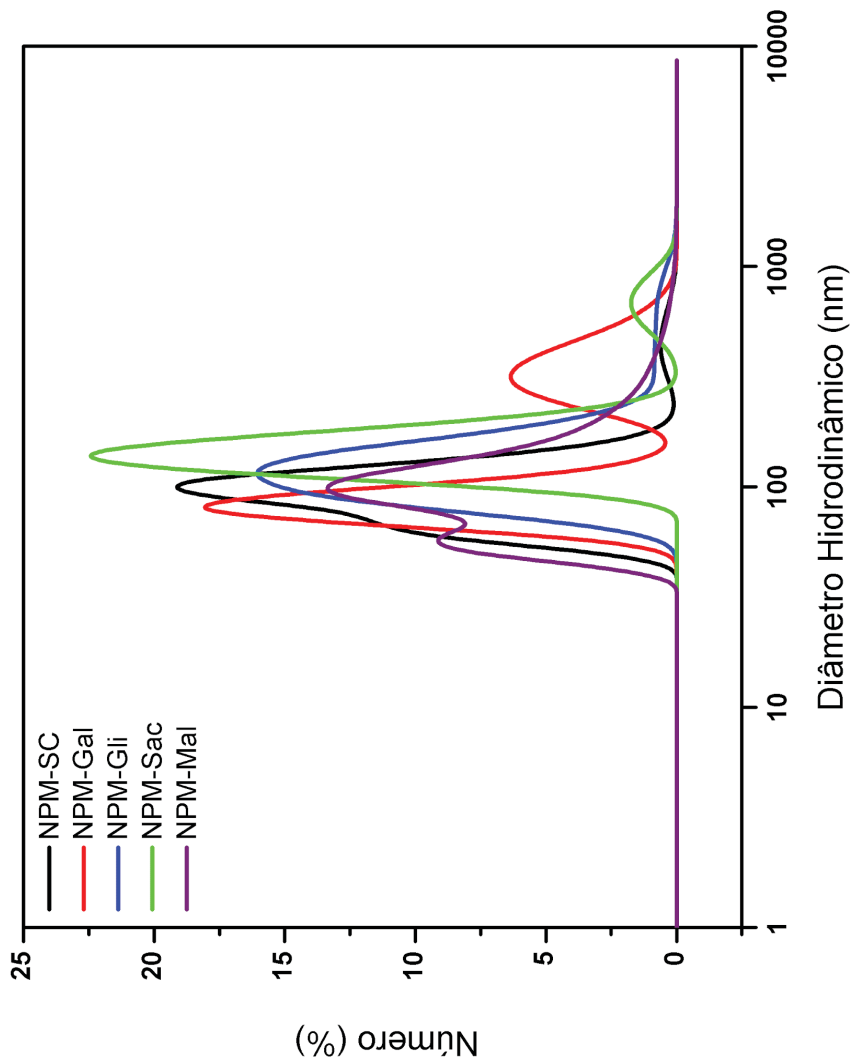
## 4.2 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta das NPMs sintetizadas

A metodologia de DLS fornece informações quanto ao tamanho do material com o diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e *Z-average*; e a mobilidade eletroforética fornece informações sobre o potencial Zeta (PZ) de superfície.

A Figura 4 mostra a distribuição dos DH obtidos que foram plotados em curvas, mostrando a variação do tamanho das NPMs sintetizadas. Foram realizadas três reações de síntese, com as quais se obtiveram resultados semelhantes. As amostras de NPM-SC e NPM-Gli apresentam uma distribuição mais homogênea e com formação de picos específicos, cada uma. Já as amostras de NPM-Gal, NPM-Sac e NPM-Mal apresentaram dois picos com tamanhos distintos, apresentando distribuições heterogêneas e com subpopulações distintas.

Como as NPMs por si apresentam comportamento magnético devido à disposição dos elétrons na camada de valência, tornando-as paramagnéticos e formando seus próprios campos, é esperado o desencadeamento da formação de aglomerados que formam e desfazem constantemente, aumentando o desvio padrão dos seus referidos DH, bem como de seus Pdl's (TOMBÁ CZ, E. et al., 2015).

A Tabela 1 apresenta os PZs de superfície das NPMs sem cobertura e com cobertura com os carboidratos, analisadas um dia após as reações de síntese. A técnica aplica uma corrente elétrica de alta voltagem, de caráter destrutivo, com a qual se consegue determinar o valor do PZ em mV do material. Além disso, observa-se também os dados referentes ao Índice de Polidispersividade, o qual pode variar de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 0, menos polidispersa é a amostra e que as partículas apresentam características estruturais semelhantes, o que pode ser confirmado pelas análises feitas por Microscopia de Força Atômica (Figuras 9 a 13). Porém, quanto mais próximo de 1, mais polidispersa é a amostra analisada, mostrando que as características estruturais de subpopulações presentes em um material são bem distintas entre si.



**Figura 4.** Distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio em número (%) das NPMs com e sem cobertura de carboidratos obtidos por DLS. As amostras de NPM-SC (linha preta) e NPM-Gli (linha azul) apresentam uma distribuição mais homogênea e com formação de picos específicos, cada um. Entretanto, as amostras de NPM-Gal (linha vermelha), NPM-Sac (linha verde) e NPM-Mal (linha roxa) mostraram dois picos com tamanhos distintos, apresentando distribuições heterogêneas e com populações distintas.

**Tabela 1.** Potenciais Zeta (PZ) e índices de polidispersividade (Pdl) das NPMs com e sem cobertura de carboidratos.

	<b>Amostras</b>				
	<b>NPM-SC</b>	<b>NPM-Gal</b>	<b>NPM-Gli</b>	<b>NPM-Sac</b>	<b>NPM-Mal</b>
<b>PZ (mV)</b>	-12,00 ± 0,40	-13,80 ± 1,60	-10,60 ± 0,20	-9,40 ± 0,60	-0,80 ± 0,20
<b>Pdl</b>	0,51 ± 0,04	0,43 ± 0,08	0,57 ± 0,06	0,58 ± 0,04	0,35 ± 0,05

As NPM-SC sintetizadas pela metodologia de coprecipitação apresentaram PZ negativo, bem como as NPMs recobertas com carboidratos. Entretanto, a adição dos carboidratos para a cobertura das nanopartículas mostrou que os valores de PZ das NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal aumentaram e para NPM-Gal diminuiu, quando comparadas às NPM-SC. Isso infere que as adições de glicose, sacarose e maltose, aumentam da carga superficial das nanopartículas, em contraste com a adição de galactose que a faz diminuir. Já os respectivos valores de *Z-average* e Intensidade das NPMs com e sem cobertura com os carboidratos, se encontram na Tabela 2.

**Tabela 2.** *Z-Average* e Intensidade das NPMs com e sem cobertura de carboidratos.

	<b>Amostras</b>				
	<b>NPM-SC</b>	<b>NPM-Gal</b>	<b>NPM-Gli</b>	<b>NPM-Sac</b>	<b>NPM-Mal</b>
<b>Z-Average (nm)</b>	481,1 ± 25,88	480,9 ± 39,11	527,0 ± 43,54	714,2 ± 16,60	339,9 ± 3,91
<b>Intensidade (nm)</b>	434,0 ± 63,62	465,6 ± 56,65	871,6 ± 211,8	607,1 ± 29,39	570,4 ± 56,64

A forma de interação dos carboidratos com as NPMs sintetizadas pode ser justificada pela adsorção química, a qual é um tipo de adesão que envolve uma reação química entre uma superfície e o adsorbato gerando novas ligações químicas na superfície do adsorvente. Sendo assim, a forte interação entre o adsorbato e a superfície do substrato cria novos tipos de ligações eletrônicas. Por isso, mudanças no diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, *Z-Average*, intensidade e potencial Zeta são distintos entre as amostras.

Durante as sínteses das NPMs apresentadas neste trabalho, ocorreu a adição de quatro tipos de carboidratos (Galactose, Glicose, Sacarose e Maltose), sendo dois deles classificados como monossacarídeos e dois como dissacarídeos. As nanopartículas magnéticas com e sem cobertura com carboidratos, sintetizadas e apresentadas neste trabalho, mostraram características distintas entre elas, como os diâmetros hidrodinâmicos, potencial Zeta e Índice de Polidispersividade.

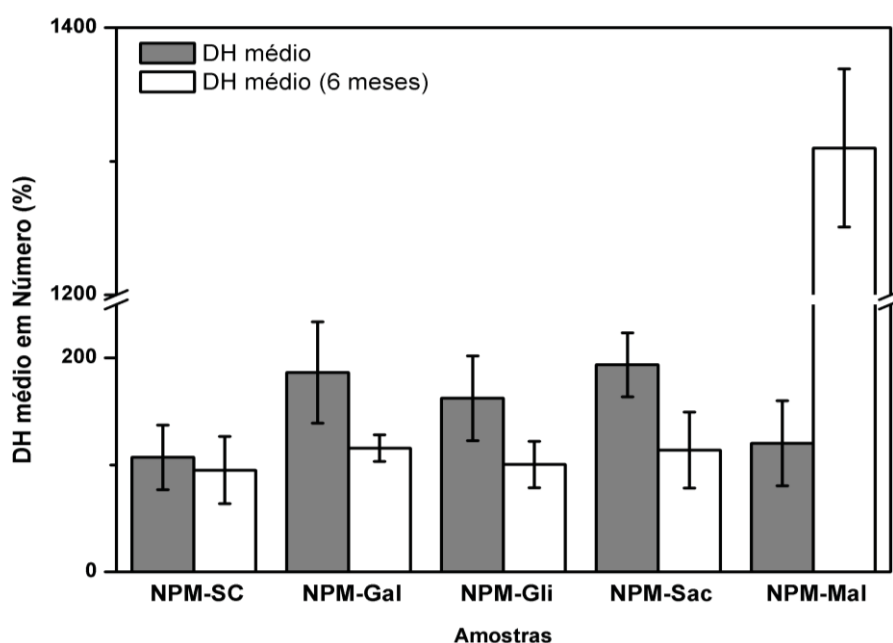
O DH médios das cinco amostras encontra-se entre 100 a 200 nm, caracterizando como nanomateriais submicrométricos. Além disso, o potencial Zeta das mesmas se encontraram carregados negativamente, que variaram entre -13,80 a 0,80 mV. Estes valores implicam que estas nanopartículas possuem uma estabilidade incipiente, segundo Doostmohammadi et al. (2011). Os seus respectivos Pdl, variando entre 0,4 a 0,6 das cinco nanopartículas sintetizadas, são classificados como moderados e estes dizem sobre a homogeneidade do material, ao qual quanto mais próximo de 1,0 quer dizer que a amostra analisada é heterogênea e quando mais próximo de 0,0 mais homogêneo.

O tamanho das NPMs, bem como o PZ e Pdl podem ser diferentes dependendo do método de síntese aplicado, bem como os reagentes utilizados e procedimentos feitos durante todo o processo (MAJIDI et al., 2014). Outro fator que implica essas modulações, são os tipos de moléculas que podem ser adicionadas como agentes estabilizantes e que possam atuar como coberturas, durante à síntese das mesmas.

Para as aplicações biomédicas, no estudo de Kang et al. (2015), é mostrado as diversas associações de nanopartículas, dentre elas as NPMs, com carboidratos distintos. Além disso, relatam a adição destas moléculas aos

nanomateriais por suas aplicações, principalmente como carreadores de fármacos para o tratamento de cânceres e HIV (EL-BOUBBOU et al., 2010). Entretanto durante o seu artigo ele mostra que as NPMs associadas com os carboidratos, possuem moléculas ao redor das partículas, em sua grande maioria composta por TEOS (FARR et al., 2014) ao qual em sua extremidade uma molécula de glicose ou galactose fixam para a associação com proteínas celulares de membrana.

As NPMs sintetizadas durante o desenvolvimento deste trabalho foram analisadas após um período de 6 meses, no intuito de verificar se as características se mantinham ao longo do tempo de armazenamento e se estas são adequadas. A Figura 5 corresponde à comparação realizada entre os diâmetros hidrodinâmicos médios de um dia após a síntese (colunas na cor cinza) e 6 meses após (colunas na cor branca). Percebeu-se que as NPMs com e sem cobertura de carboidratos seguiram a mesma tendência de diminuir o diâmetro hidrodinâmico médio ao passar dos meses, exceto para a NPM-Mal na qual ocorreu o contrário, ou seja, houve o aumento das nanopartículas.



**Figura 5.** Comparação entre os DH médios após as sínteses de NPMs e 6 meses depois. As colunas em cinza correspondem aos diâmetros hidrodinâmicos médios de um dia após a síntese e as colunas na cor branca, 6 meses depois. Percebeu-se que as NPMs com e sem cobertura de carboidratos seguiram a mesma tendência de diminuir o diâmetro hidrodinâmico médio ao passar dos meses, entretanto, para a NPM-Mal ocorreu o contrário, ou seja, houve o crescimento das nanopartículas.



A síntese de NPMs pelo método de coprecipitação pode promover à formação de diferentes tamanhos de partículas, bem como o produto resultante desta. Ferritas como magnetita, maghemita, hematita e goetita podem identificadas após diferentes técnicas para a metodologia acima. Durante o trabalho realizado, a síntese de NPMs promoveu a formação de nanomaterial de coloração escura, em um tom marrom, e com atração magnética considerável, quando colocadas próximas a um campo magnético. Para tal, receberam os nomes NPM-SC para as nanopartículas sintetizadas normalmente, NPM-Gal para as nanopartículas recobertas com galactose, NPM-Gli recobertas com glicose, NPM-Sac recobertas com sacarose e NPM-Mal aquelas recobertas com maltose.

Todas as cinco nanopartículas sintetizadas, recobertas ou não com os carboidratos, apresentaram como diâmetros hidrodinâmicos médios valores acima de 100 nm, configurando-as como partículas sub-micrométricas. O potencial Zeta de superfície das NPMs revelou estruturas carregadas negativamente, sendo que para NPM-Mal o seu valor foi próximo a nulo. O valor do índice de polidispersividade indicou que as amostras apresentaram valores que variaram de 0,4 à 0,6; considerados moderados, e que estas partículas são heterogêneas.

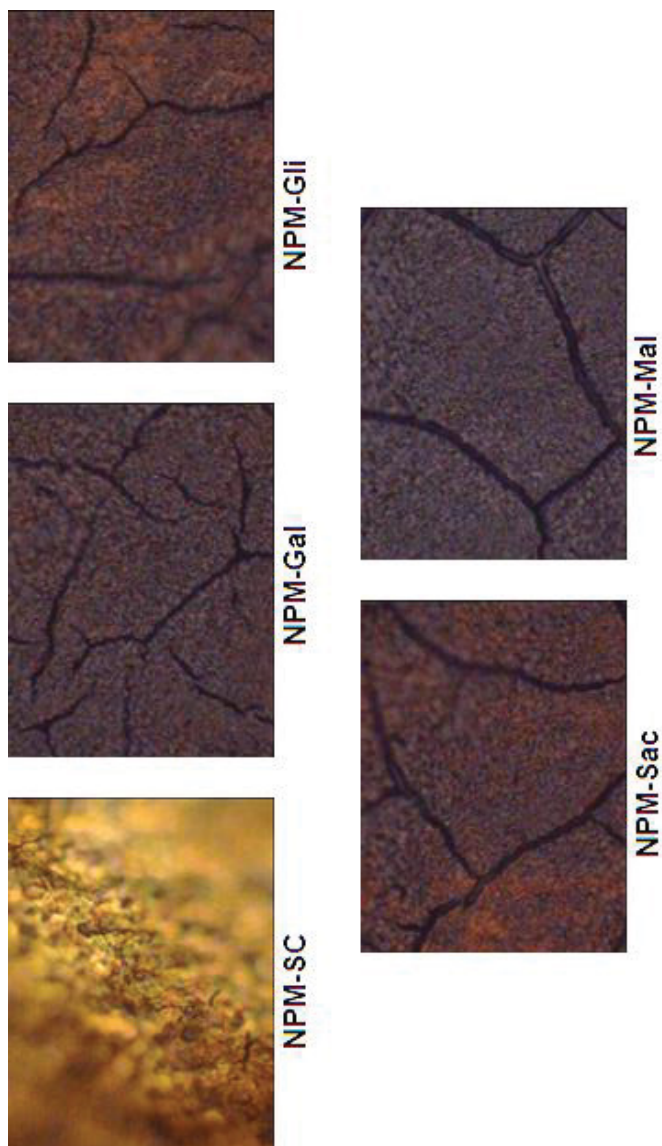
Com isso, durante a síntese das nanopartículas magnéticas, a adição dos carboidratos mostrou ser um fator que implica na variação das características de DH, PZ e Pdl, bem como já abordado na literatura, mesmo quando comparado à síntese que não houve a adição de carboidrato. Entretanto, quando comparado aos outros tipos de associações dessas NPMs com distintas moléculas, observa-se que existe elas se mantêm ao redor destas, por estrutura criada ao redor do nanomaterial. Em contraposição, os carboidratos utilizados e adicionados nas sínteses foram idealizados para que interagisse com a partícula de maneira em que houvesse uma adsorção química.

### **4.3 Captura de Imagens por microscopia de luz e espectros obtidos por espectroscopia Raman**

As fotografias das amostras das NPMs pipetadas e identificadas nas lâminas de vidro envolvidas com papel alumínio foram capturadas digitalmente, utilizando a câmera de telefone celular (Figura 1), em que foi observada uma pequena variação da coloração entre as amostras.

A microscopia de luz é utilizada para examinar pequenos objetos não visíveis a olho nu, ou detalhes enobres que não são permitidos enxergar sem o auxílio de equipamentos. Quando colocadas no suporte e ajustado o foco, as NPMs foram fotografadas utilizando a ocular do microscópio com um aumento de 40 vezes (Figura 6). Não há uma diferença visual entre as amostras de NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal, mas sim destas quando comparadas à de NPM-SC. As rachaduras existentes nas fotografias podem ter sido provocadas durante o processo de secagem do material no dessecador.

No intuito de avaliar o ambiente químico das NPMs e eventualmente detectar os picos referentes à presença de grupamentos químicos dos carboidratos contidos na superfície e conseqüentemente permitir uma comparação entre elas, foram localizadas e selecionadas regiões sem rachaduras e posteriormente focadas com a objetiva e incididas com laser para aquisição de espectros Raman.



**Figura 6.** Imagens fotografadas utilizando uma lente de 40x, por microscopia de luz das NPMs com e sem cobertura de carboidratos. Estas referem-se às amostras dionadas sobre o papel alumínio numa lâmina de vidro. Acima (da esquerda para direita) estão as NPM-SC, NPM-Gal e NPM-Gli; abaixo (da esquerda para a direita) estão as NPM-Sac e NPM-Mal. Não há uma diferença visual entre as amostras de NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal, mas sim destas quando comparadas à de NPM-SC. As rachaduras existentes nas fotografias podem ter sido provocadas durante o processo de secagem do material no dessecador.

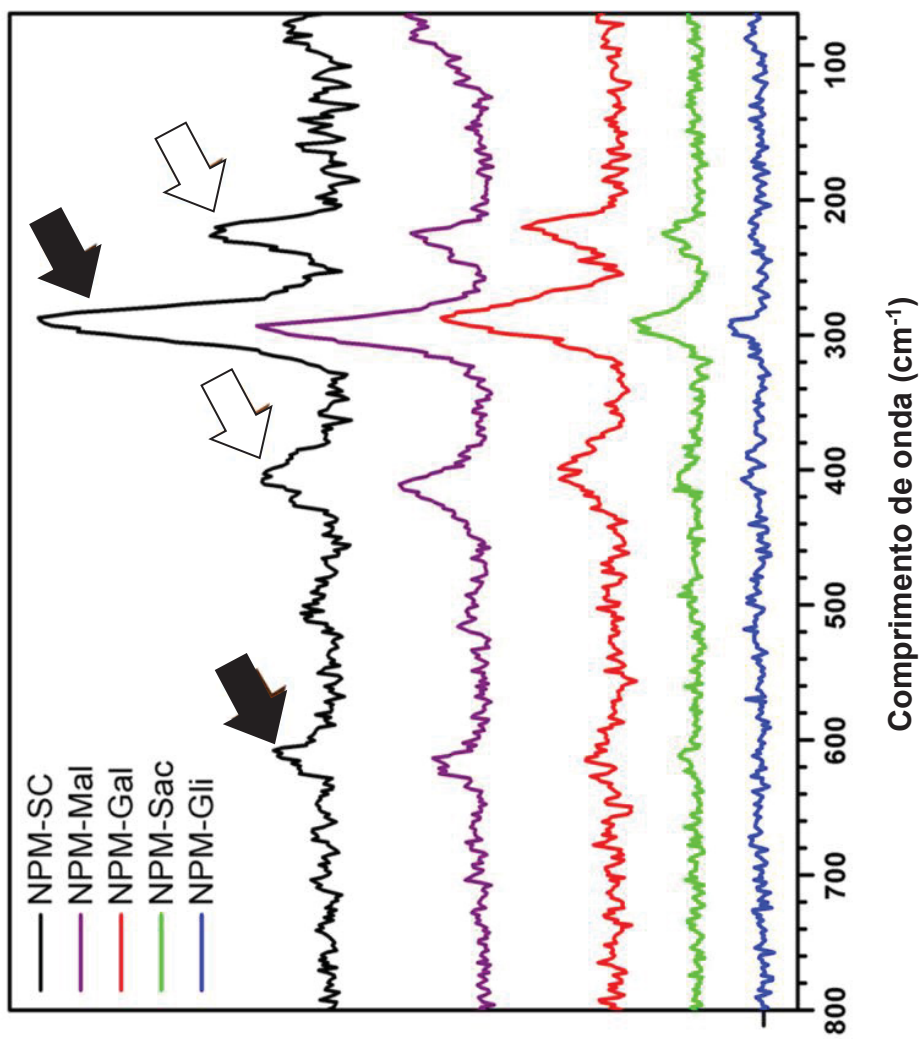
Com isso adquiriu-se os espectros mostrados na Figura 7. Tendo como base o espectro da amostra contendo as NPM-SC foram detectados vários picos e bandas representativos do material analisado, destacando-se particularmente quatro deles referentes aos cerne das NPMs. As setas de cor preta indicam os picos referentes a NPMs constituídas por magnetita (290 e 615  $\text{cm}^{-1}$ ) e as setas de cor branca indicam os picos referentes a NPMs constituídas por maghemita (225 e 410  $\text{cm}^{-1}$ ). Isso implica que a metodologia para a síntese de NPMs por coprecipitação empregada formou nanopartículas constituídas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Quando analisados os espectros das amostras com as NPMs recobertas com carboidratos, foram identificados os mesmos quatro picos que se destacaram na amostra de NPM-SC, mas com supressão de sinal. Isso pode ser causado pela adsorção das moléculas de carboidratos nas superfícies das NPMs, diminuindo a intensidade dos sinais.

As NPM-Gal e NPM-Mal, que foram recobertas galactose e maltose em cada uma delas, respectivamente, apresentaram um espectro semelhante ao das NPM-SC, pressupondo que os carboidratos adicionados durante a síntese não se associaram fortemente ao nanomaterial. Já os espectros de NPM-Sac e NPM-Gli tiveram a intensidade diminuída quase ao ponto de não emitirem nenhum sinal detectável, sugerindo que os carboidratos sacarose e glicose se associaram às NPMs, interferindo com o sinal.

Observando os espectros emitidos pela Espectroscopia Raman e os picos em destaque, comparados aos trabalhos de Panta (2015), Hanesch (2009), Li, Church e Woodhead (2012), que foram para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mencionados são os de 295, 310, 540, 600 e 670  $\text{cm}^{-1}$ , já para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  são os de 215, 350, 400, 512, 665 e 730  $\text{cm}^{-1}$ , confirmam a presença de maghemita e magnetita das amostras analisadas de NPMs com e sem cobertura de carboidratos sintetizadas neste trabalho.

Com relação aos carboidratos adicionados durante as sínteses das NPMs, após as suas análises via espectroscopia Raman, não foram observados os seus respectivos espectros. Quando investigado os mesmos, de forma não associada à nanopartículas os autores Enejder et al. (2005), Mcglashen et al. (1995), Ilaslan et al. (2015) e Li et al. (2012), informaram os espectros de galactose, glicose, sacarose e maltose, respectivamente.



**Figura 7.** Espectros Raman das NPMs com e sem cobertura de carboidratos. As NPM-SC são identificadas pela linha preta; as NPM-Gal pela linha vermelha; as NPM-Gli pela linha azul; as NPM-Sac pela linha verde e as NPM-Mal pela linha roxa. Nas setas pretas pode se observar os picos referentes à magnetita (290 e 615  $\text{cm}^{-1}$ ) e nas setas brancas os picos referentes à maghemita (225 e 410  $\text{cm}^{-1}$ ). Observou-se que as NPM-SC e NPM-Mal possuem espectros bem definidos, quando comparados aos de NPM-Gal, NPM-Sac e NPM-Gli, os quais indicam modulação do espectro pela associação do carboidrato na superfície das nanopartículas.

Com a técnica de espectroscopia Raman, não foi possível identificar os picos e bandas correspondentes à presença de carboidratos adsorvidos na superfície das NPMs. Contudo foi possível identificar picos referentes à presença de ferritas, como maghemita e magnetita com picos bem definidos na amostra de NPM-SC. Com relação às outras amostras, estes mesmos picos foram possíveis de serem identificados, porém com uma menor intensidade no espectro, inferindo que alguns carboidratos podem estar adsorvidos na superfície dos nanomateriais e eventualmente suprimindo os sinais dos óxidos de ferro nos espectros Raman.

Como reflexo destas abordagens, não sendo possível identificar os picos referentes aos grupamentos químicos presentes em carboidratos nas NPMs sintetizadas, especulou-se que estes carboidratos podem estar associados às nanopartículas por adsorção química e que por este estão interferindo nos espectros de NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac e NPM-Mal, quando comparado a NPM-SC que não recebeu a adição de qualquer açúcar.

#### **4.4 Detecção de açúcar redutor pelo teste de Benedict**

A fim de determinar a presença de carboidratos que poderiam estar associados às NPMs foi realizado o ensaio para a quantificação de açúcar redutor pelo teste de Benedict. Quando há a presença de açúcares redutores na amostra, estes tendem a formar íons  $\text{Cu}^0$ , que se complexam com o citrato de sódio e decantam, modulando a coloração da solução variando entre tons de verde, laranja e vermelho. Na prática, quanto maior a presença de açúcares redutores em uma amostra, mais avermelhada a sua solução vai se tornando.

Seguindo este raciocínio, para as NPMs, quanto mais carboidratos associados à superfície, maior seria a variação de cor da solução no ensaio de Benedict. Caso não houvesse a mudança de cor, haveria a possibilidade de estes não estarem associados (e terem sido lavados durante a síntese), corroborando ou refutando a hipótese da associação por adsorção.

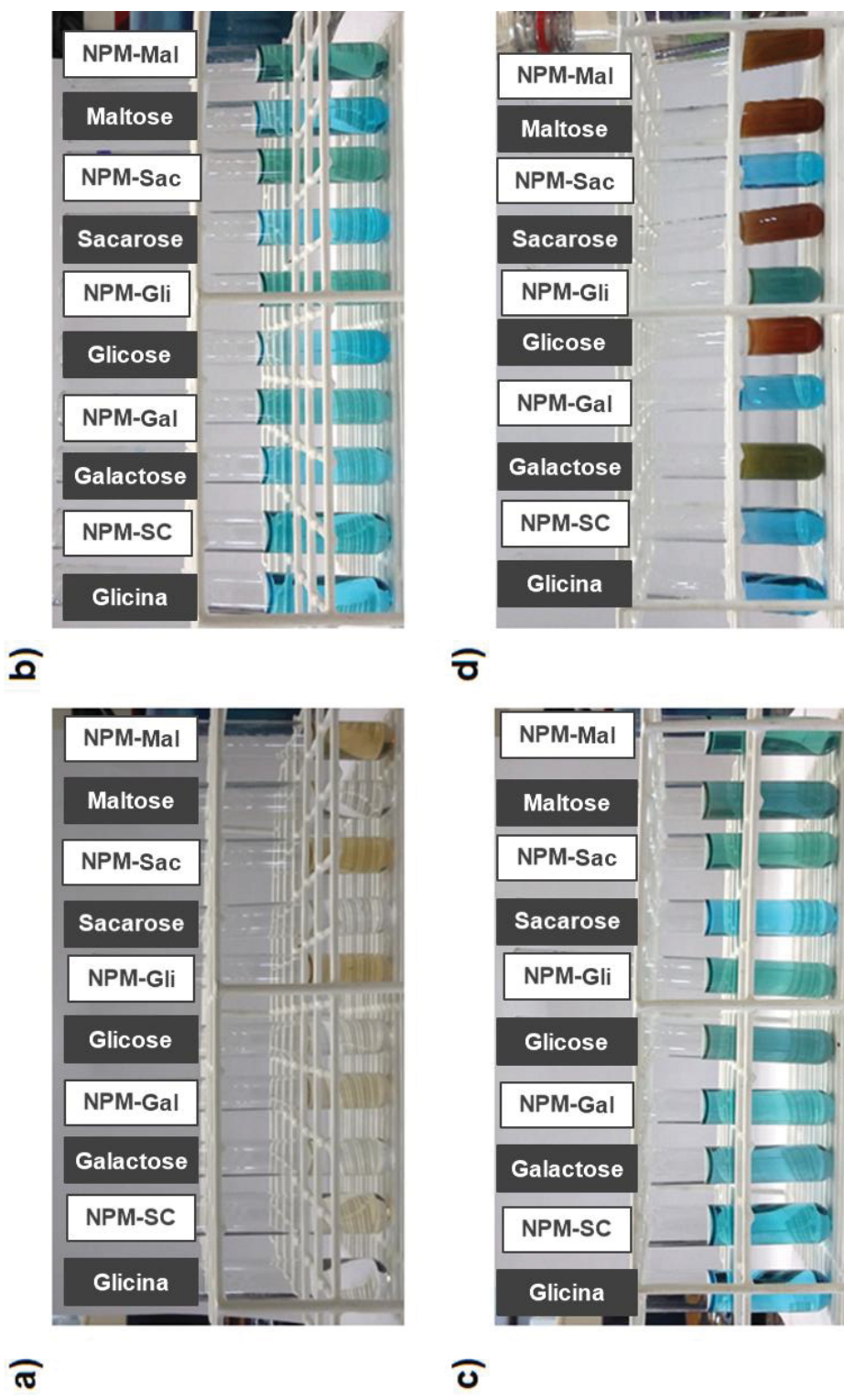
Durante o preparo para o ensaio, na Figura 8a, pode ser observada a disposição das amostras em seus respectivos tubos de maneira intercalada com os controles positivos e controle negativo. Da esquerda para a direita

estão os tubos marcados e contendo Glicina (Gly - Controle Negativo), NPM-SC, Galactose (Gal - Controle Positivo), NPM-Gal, Glicose (Gli - Controle Positivo), NPM-Gli, Sacarose (Sac - Controle Positivo), NPM-Sac, Maltose (Mal - Controle Positivo) e NPM-Mal. Nota-se que os tubos que contém as amostras de NPMs estão com a coloração marrom-translúcido.

Após a adição da solução de Benedict, na Figura 8b observa-se que nos controles positivos e negativo não há mudança na coloração, entretanto quando comparado aqueles tubos que contém as NPMs, nota-se uma ligeira alteração por conta da presença do nanomaterial, que por si só já possui sua própria cor.

Os dez tubos foram tampados e colocados em banho-maria a 37°C por 3 min cronometrados. Ao final deste intervalo de tempo, retirou-se o material da água e de maneira visual foi observada a mudança de coloração das amostras. Na Figura 8c, tanto o aminoácido glicina (controle negativo) quanto NPM-SC que não apresentam nenhum tipo de carboidrato associado, não houve mudança de coloração da solução. Para os controles positivos, exceto o de sacarose, ocorreu uma ligeira mudança nas suas colorações, indicando a presença de açúcares redutores. Já para as outras NPMs, não houve diferença entre as amostras quando comparado com a imagem anterior, indicando que mesmo que eventualmente associados, os carboidratos não foram detectados na superfície das NPMs.

Ao comparar os resultados obtidos por espectroscopia Raman e os de detecção de açúcares redutores pelo teste de Benedict, foi possível especular que os carboidratos galactose e glicose tendem a estar ligados na superfície das NPMs, influenciando diretamente nos espectros formados. Já sacarose e maltose, aparentam não estar associados às NPMs, mantendo próximos os seus espectros quando comparados à NPM-SC.



**Figura 8.** Detecção de açúcar redutor pelo ensaio de Benedict. Na imagem representada por a) encontram-se as amostras de controle e das nanopartículas sintetizadas, intercaladas, diluídas em água Tipo I. Em b) as mesmas amostras com adição da solução de Benedict, à temperatura ambiente. A figura representada por c) mostra a variação de coloração das amostras após 3 min em banho-maria à 37°C. Já em d) amostras controle e do sobrenadantes das sínteses de NPMs após a adição da solução de Benedict e mantido no banho-maria por 3 min à 37°C, indicando que os sobrenadantes de NPM-Gli e NPM-Mal estavam com parte dos carboidratos diluídos e que consequentemente não aderidos na superfície das NPMs.



A fim de compreender a possível interação dos carboidratos com as NPMs desde o início do processo de recobrimento, foi feito novamente mais um ensaio para a detecção de açúcar redutor, só que desta vez a análise foi feita com a água coletada a partir da primeira decantação magnética. Com isso, a Figura 8d corrobora algumas suspeitas com relação à hipótese da adição de carboidrato nas NPMs. Desta vez, a disposição das amostras foi, da esquerda para a direita estão os tubos marcados e contendo Glicina (Gly - Controle Negativo), os sobrenadantes de NPM-SC e NPM-Gal, Galactose (Gal - Controle Positivo), o sobrenadante de NPM-Gli, Glicose (Gli - Controle Positivo), o sobrenadante de NPM-Sac, Sacarose (Sac - Controle Positivo), o sobrenadante de NPM-Mal e Maltose (Mal - Controle Positivo).

A química dos carboidratos adicionados para as coberturas das NPMs pode estar relacionada diretamente com as respostas obtidas neste experimento. Glicose e galactose são estruturas monoméricas, ou seja, são compostas por apenas uma única unidade de carboidrato em sua composição. Já sacarose e maltose são estruturas de dissacarídeos. A primeira apresenta uma molécula de glicose unida com uma molécula de frutose por uma ligação glicosídica do tipo  $\alpha$ -1,2, e a segunda possui duas unidades de glicose unidas por uma ligação glicosídica do tipo  $\alpha$ -1,4. Essas configurações podem contribuir para associações dos carboidratos com a superfície das NPMs.

Confirmou-se que glicina, os sobrenadantes de NPM-SC e NPM-Gal não induzem a mudança da coloração da solução comparado aos controles. Entretanto o sobrenadante de NPM-Gli demonstra que nem todo o carboidrato adicionado se associa às NPMs. Já os sobrenadantes de NPM-Sac e NPM-Mal conseguem formar precipitados de  $\text{Cu}^0$ , indicando a presença de açúcares redutores, ou seja, que estes não estão se associando às NPMs em concentrações efetivas.

As estratégias utilizadas para a associação de carboidratos na superfície de nanopartículas, particularmente em NPMs, baseia-se na funcionalização de sílica, para em que sua porção final, seja associado monossacarídeos, como a manose, glicose, galactose, fucose e até mesmo moléculas de N-acetilglicosamina, como mostrado por El-boubbou et al. (2010), e Gruden e Huang (2007). Além disso, os ensaios para a obtenção de nanopartículas com essas características são direcionadas com o objetivo de se associarem às

células tumorais principalmente, como tecnologias biomédicas. Em contrapartida, não se observa trabalhos em que ocorre a combinação entre carboidratos e NPMs para atuar no cultivo de microrganismos, a não ser para sua ação citotóxica como demonstrado por Arakha et al. (2015).

Sendo assim, o ensaio para a detecção de açúcares redutores pela metodologia de Benedict, mostrou que os carboidratos glicose e galactose se associaram com as NPMs durante o processo de síntese, mesmo após as sucessivas lavagens com água do Tipo I e decantações magnéticas. Já os carboidratos sacarose e maltose não tiveram indício de associação às NPMs, visto que o sobrenadante destes nanomateriais, após a síntese, continham açúcares redutores que permitiram a mudança de coloração das reações com a solução de Benedict. Além disso, quando analisado os espectros por espectroscopia Raman, essas constatações são então corroboradas.

#### **4.5 Morfologia e diâmetro seco (Altura) das NPMs por microscopia de força atômica**

Assim que as NPMs foram depositadas na superfície de mica muscovita, foi identificado que estes materiais secavam de maneira ligeiramente rápida, quando comparado aos outros tipos de nanomateriais sintetizados rotineiramente no laboratório.

Na Figura 9 encontram-se as imagens em plano bidimensional (a) e tridimensional em altura topográfica (b) das NPM-SC, nas dimensões de 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ . Observa-se que há uma dispersão de partículas com características heterogêneas, em que agregados particulados e polidispersos são encontrados. Quando investigada a dispersão do diâmetro seco em altura das NPM-SC, elaborou-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura, largura da distribuição e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal. Foi identificado que a média em altura destas nanopartículas é de  $85,76 \pm 0,24$  nm; a média da largura é de  $17,87 \pm 0,56$  nm; com um  $R^2$  de 0,996.

Na Figura 10 encontram-se as imagens em plano (a) e tridimensional em altura topográfica (b) das NPM-Gal, nas dimensões de 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ .

Diferentemente da amostra anterior, observamos uma quantidade de nanopartículas altamente dispersas, caracterizando-se como fortemente homogênea, com poucos aglomerados identificados. Posteriormente um histograma de distribuição topográfica (c) foi construído, mostrando a média em altura, largura e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal. Identificamos que a média em altura destas nanopartículas é de  $51,96 \pm 0,71$  nm; a média da largura é de  $16,34 \pm 2,02$  nm e com um  $R^2$  de 0,907.

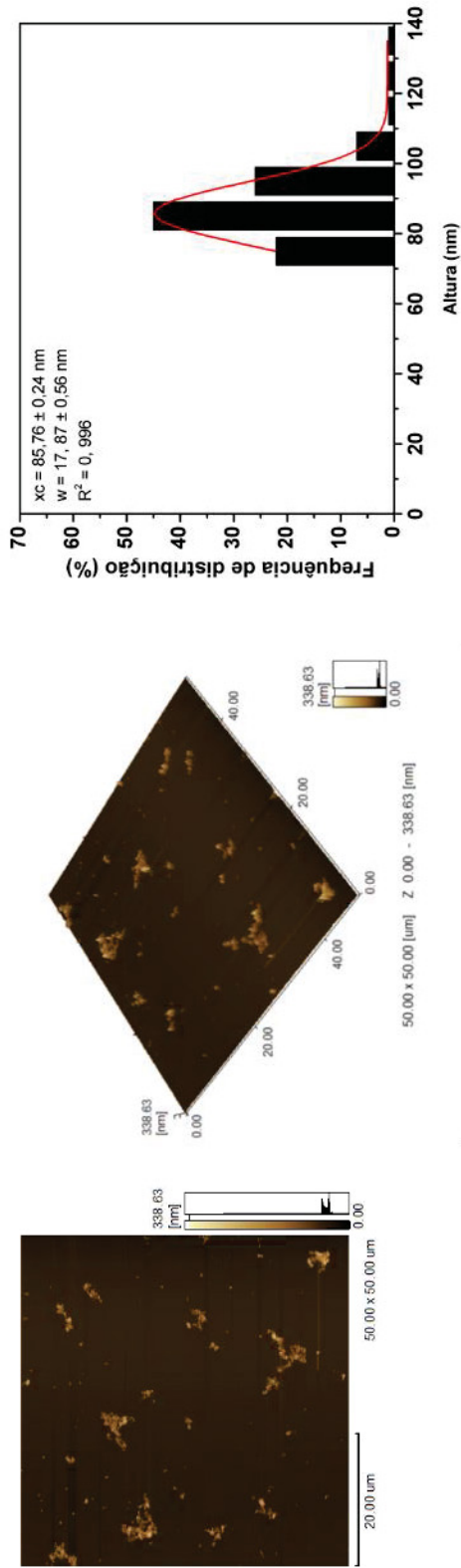
Na Figura 11 encontram-se as imagens em plano (a) e tridimensional em altura topográfica (b) das NPM-Gli, nas dimensões de  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ . Estas nanopartículas possuem estruturas morfológicas semelhantes às NPM-Gal, com relação à sua dispersividade, homogeneidade e pouca formação de aglomerados particulados. O histograma de distribuição topográfica (c) mostra a média em altura, largura e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal. Foi identificado que a média em altura destas nanopartículas é de  $65,43 \pm 0,67$  nm; a média da largura é de  $19,82 \pm 1,63$  nm e com um  $R^2$  de 0,972.

Na Figura 12 encontram-se as imagens em plano (a) e tridimensional em altura topográfica (b) das NPM-Sac, nas dimensões de  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ . Essa amostra se assemelha morfológicamente comparando às NPM-Gal e NPM-Gli com relação à dispersividade homogênea das partículas devido aos poucos aglomerados formados e também contendo partículas individuais. Após a formação das imagens, um histograma de distribuição topográfica (c) foi construído, mostrando a média em altura, largura e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal. Identificamos que a média em altura destas nanopartículas é de  $50,18 \pm 0,38$  nm; a média da largura é de  $15,68 \pm 1,01$  nm e com um  $R^2$  de 0,985.

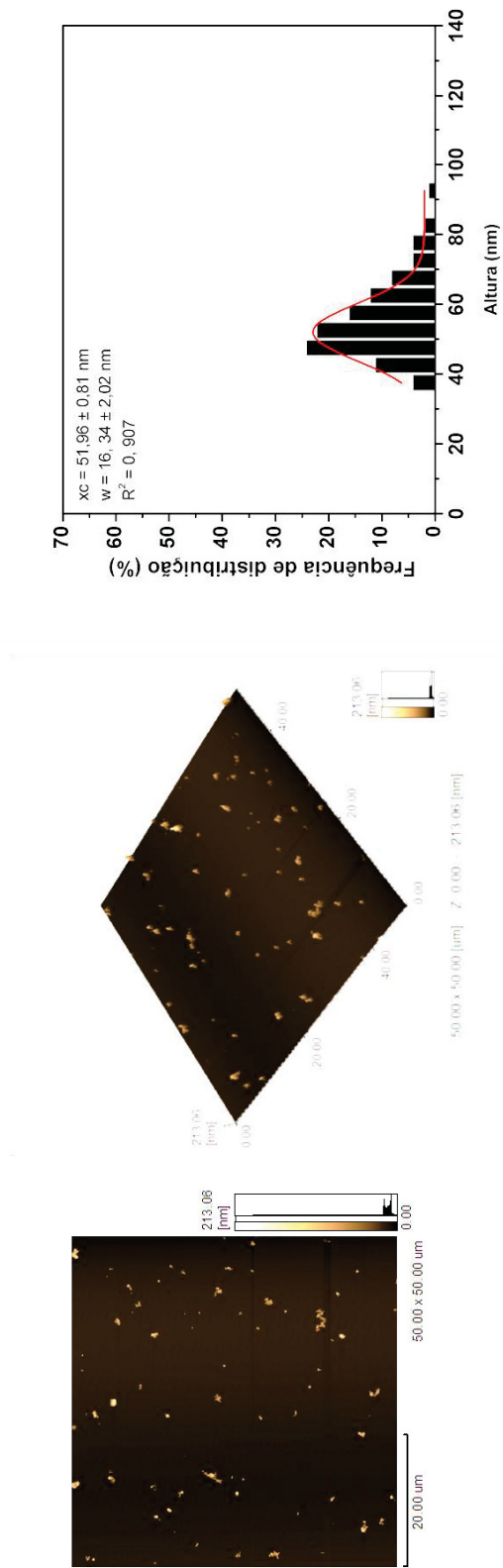
Por último, na Figura 13 encontram-se as imagens em plano (a) e tridimensional em altura topográfica (b) das NPM-Mal, nas dimensões de  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ . Ao observar a amostra analisada, identificamos que há principalmente a formação de aglomerados de partículas e poucas de maneiras monodispersas, sendo assim, esta é uma amostra altamente heterogênea. O histograma de distribuição topográfica (c) mostra a média em altura, largura e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de

distribuição normal. Foi identificado que a média em altura destas nanopartículas é de  $98,54 \pm 0,47$  nm; a média da largura é de  $6,15 \pm 0,90$  nm e com um  $R^2$  de 0,927.

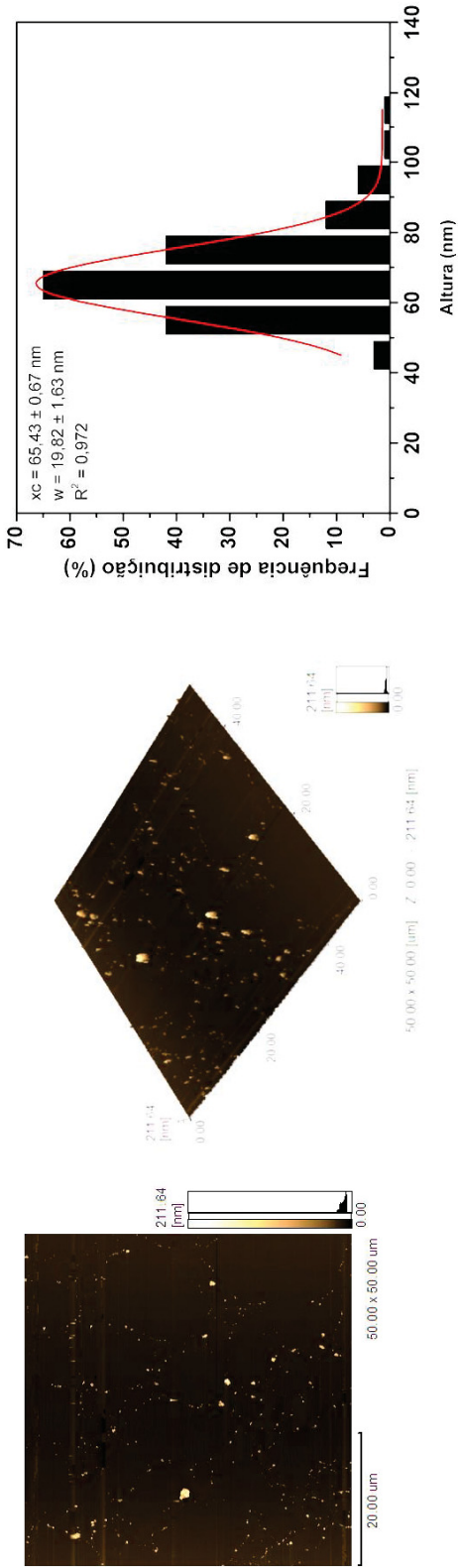
Quando observamos os trabalhos de ZHANG et al. (2009), CORDOVA et al. (2017) e GONÇALVES et al. (2017) as amostras de nanopartículas magnéticas analisadas apresentaram características distintas às desenvolvidas neste trabalho. Os nanomateriais mostraram ser menores tanto com relação à média topográfica em altura, quanto em comprimento. Isso se deve aos materiais utilizados para a funcionalização das mesmas, como a sílica, bem como o método de síntese empregada, variando pelos métodos de coprecipitação e decomposição térmica. Além disso, os materiais se encontraram com uma menor agregação, comparados às partículas desenvolvidas neste trabalho, ou seja, com uma maior homogeneidade das NPMs. WANG et al. (2013) utilizou a microscopia de força atômica para analisar sua NPMs que possuíam fluorescência, como característica final após a sua síntese. Nos mesmo, foi possível perceber que ocorreu aglomerações das nanopartículas e que os tamanhos tanto da altura topográfica, quanto do comprimento eram maiores do que as desenvolvidas neste trabalho, na escala micrométrica.



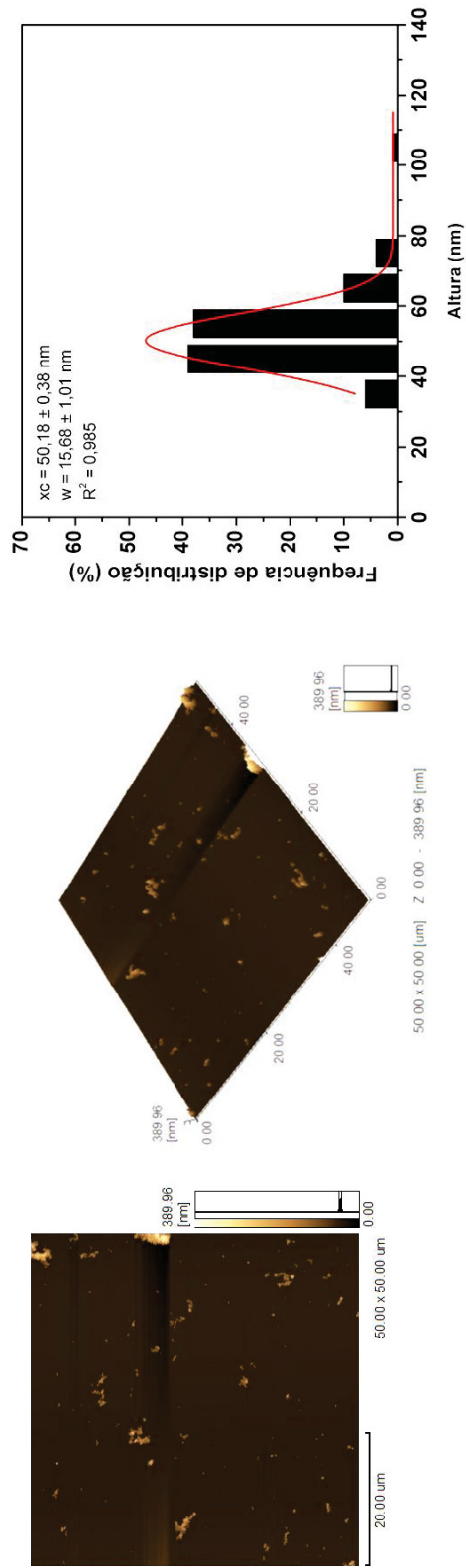
**Figura 9.** Imagens obtidas por microscopia de força atômica a partir das NPM-SC e histograma de distribuição da topografia em altura (nm). Em (a) encontra-se a imagem correspondente da amostra analisada em plano bidimensional (a) e tridimensional em altura topográfica (b), nas dimensões de 50 μm x 50 μm. Já em (c) encontra-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura (85,76 ± 0,24 nm), largura da distribuição (17,87 ± 0,56 nm) e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal (0,996).



**Figura 10.** Imagens de Microscopia de Força Atômica e Histograma de distribuição da topografia em altura (nm) das NPM-Gal. Em (a) encontra-se a imagem topográfica (b), nas dimensões de 50 μm x 50 μm. Já em (c) encontra-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura (51,96 ± 0,81 nm), largura da distribuição (16,34 ± 2,02 nm) e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal (0,907).

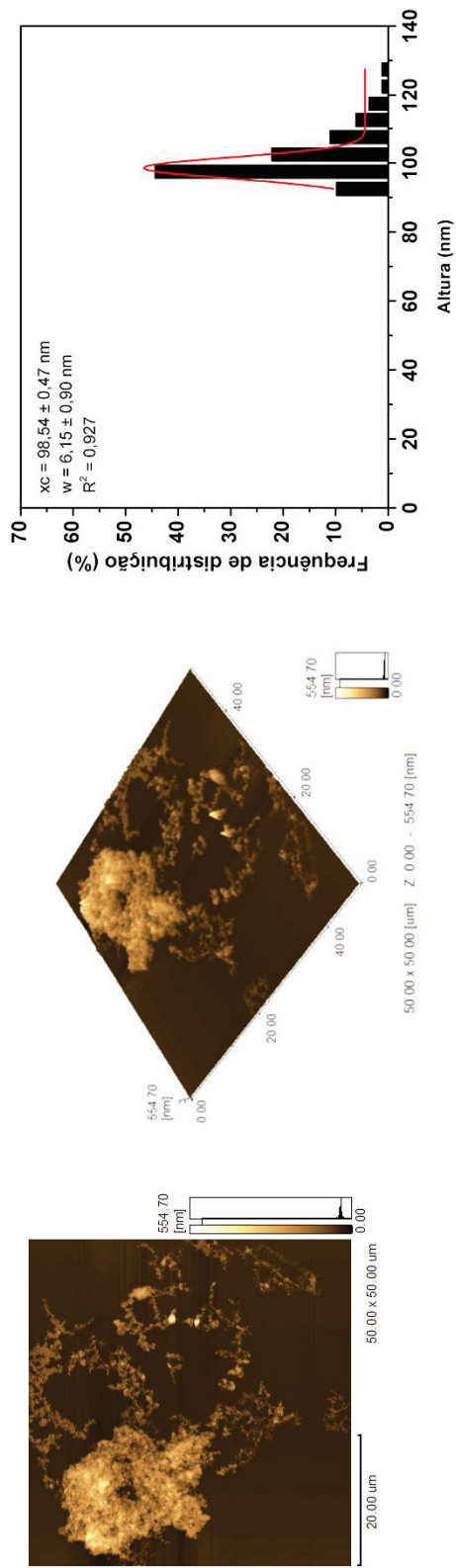


**Figura 11.** Imagens de microscopia de Força Atômica e Histograma de distribuição da topografia em altura (nm) das NPM-Gli. Em (a) encontra-se a imagem correspondente da amostra analisada em plano bidimensional (a) e tridimensional em altura topográfica (b), nas dimensões de 50 μm x 50 μm. Já em (c) encontra-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura (65,43 ± 0,67 nm), largura da distribuição (19,82 ± 1,63 nm) e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal (0,972).



**Figura 12.** Imagens de Microscopia de Força Atômica e Histograma de distribuição da topografia em altura (nm) das NPM-Sac. Em (a) encontra-se a imagem topográfica correspondente da amostra analisada em plano bidimensional (a) e tridimensional em altura topográfica (b), nas dimensões de 50 µm x 50 µm. Já em (c) encontra-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura (50,18 ± 0,38 nm), largura da distribuição (15,68 ± 1,01 nm) e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal (0,985).

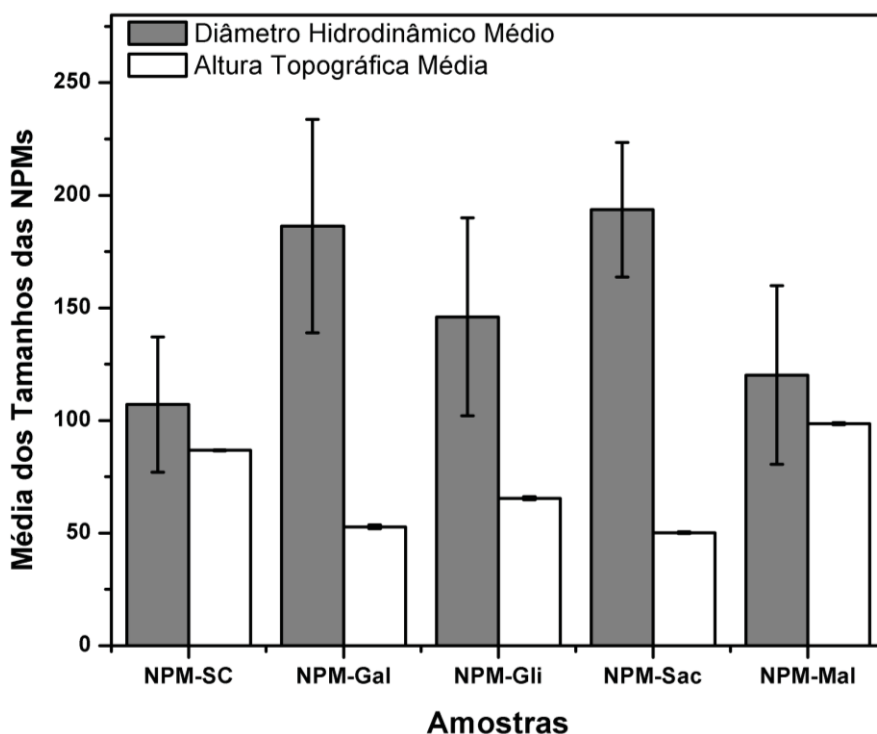




**Figura 13.** Imagens de Microscopia de Força Atômica e Histograma de distribuição da topografia em altura (nm) das NPM-Mal. Em (a) encontra-se a imagem correspondente da amostra analisada em plano bidimensional (a) e tridimensional em altura topográfica (b), nas dimensões de 50 μm x 50 μm. Já em (c) encontra-se um histograma de distribuição topográfica (c) que mostra a média em altura (98,54 ± 0,47 nm), largura da distribuição (6,15 ± 0,90 nm) e o coeficiente de determinação elaborado a partir de uma curva gaussiana de distribuição normal (0,927).

Para a comparação dos resultados obtidos utilizando o DLS e a MFA, foi elaborado o gráfico representado pela Figura 14, que apresenta a média, em número, do diâmetro hidrodinâmico médio das NPMs analisadas por DLS, comparado média topográfica em altura analisadas por MFA.

Interessantemente, as amostras de NPMs analisadas por microscopia de força atômica mostraram características distintas com relação às suas morfologias, agregação de material e grau de homogeneidade. Todas estas possuem em tamanho médio da altura topográfica das amostras menor do que 100 nm. Comparando ao diâmetro hidrodinâmico médio das mesmas na Figura 3, há uma variação expressiva entre elas, que é justificado pela camada de solvatação presente quando analisadas via DLS, enquanto aquelas analisadas por MFA se encontram em ambiente seco.



**Figura 14.** Comparação entre as médias dos valores de diâmetros hidrodinâmicos médio obtidos por espalhamento de luz dinâmico e a média da altura topográfica das amostras obtidos por microscopia de força atômica. As colunas de coloração cinza, mostram os diâmetros hidrodinâmicos médios das NPMs com e sem cobertura de carboidratos. Já as colunas brancas, mostram média da altura topográfica das mesmas. Quando comparados ao diâmetro hidrodinâmico médio e a média da altura topográfica, há uma variação expressiva entre elas, que é justificado pela camada de solvatação presente quando analisadas via DLS, enquanto aquelas analisadas por MFA se encontram em ambiente seco.

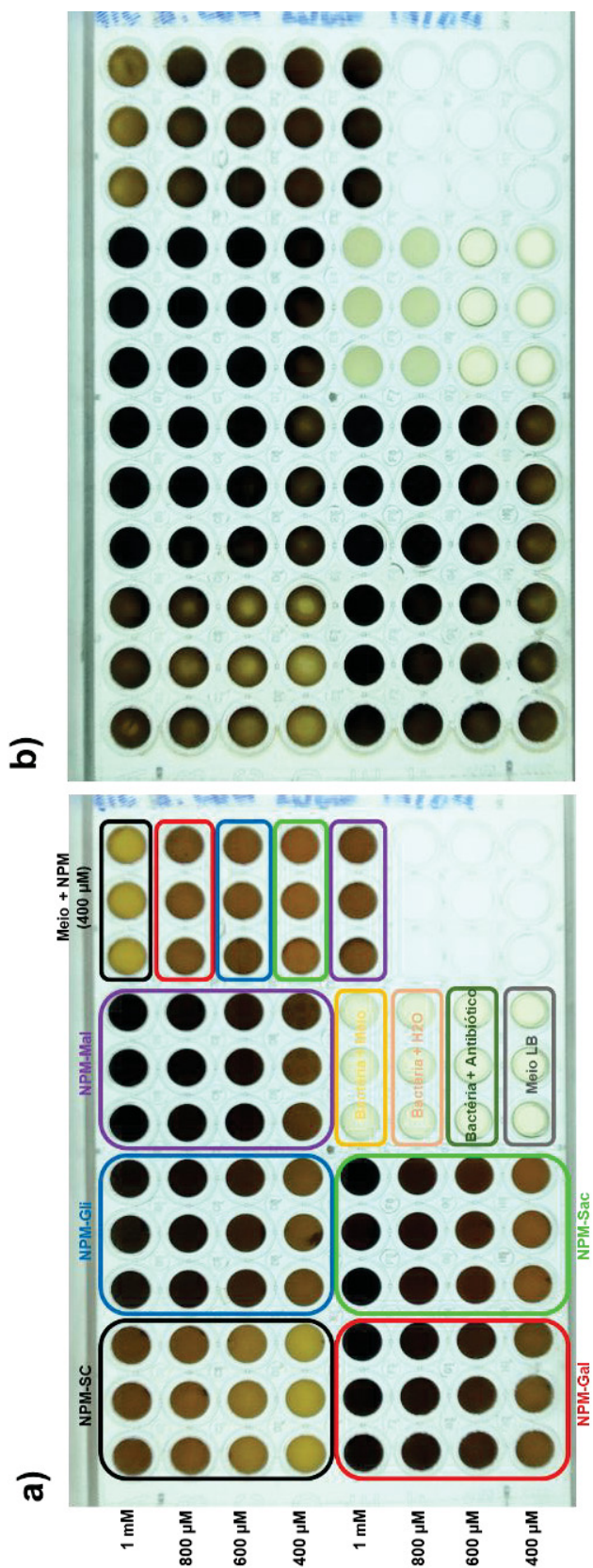
As imagens obtidas por microscopia de força atômica mostraram a topografia em altura das amostras analisadas contendo as NPMs. Ficou evidente que as NPMs com e sem cobertura com carboidrato apresentaram características morfológicas distintas. As aglomerações dos nanomateriais se destacaram em NPM-SC e principalmente em NPM-Mal, a qual mostrou aglomeração de partículas. Enquanto isso, as outras amostras NPM-Gal, NPM-Gli e NPM-Sac mostraram um nível de homogeneidade do material considerável. Em média, a altura média de todas as NPMs foram menores do que 100 nm, contrariamente aos valores de diâmetro hidrodinâmico determinados, mas sendo justificado pela camada de solvatação que ocorre no mesmo.

#### **4.6 Ensaio de toxicidade das NPMs em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae***

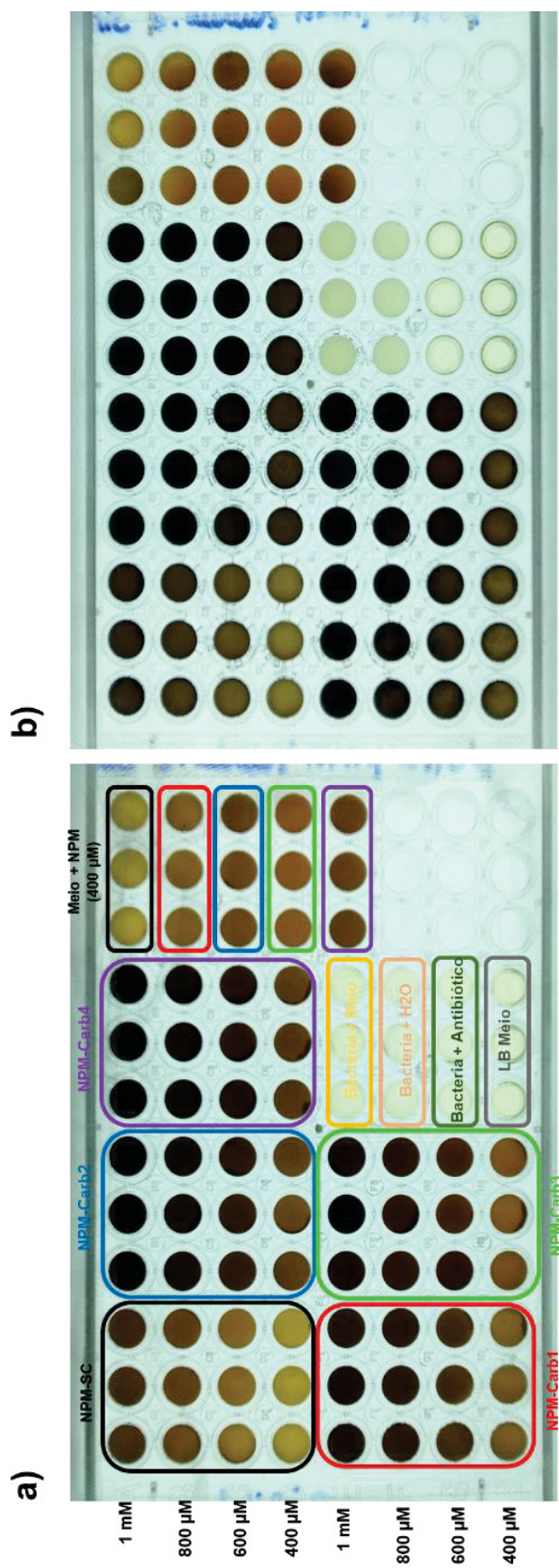
A partir das análises feitas e constatando os DH, Pdl, PZ e se há a presença de carboidratos na superfície das nanopartículas magnéticas, com os espectros Raman obtidos, a avaliação de toxicidade das NPMs em microrganismo foi realizada. O intuito dos testes de toxicidade foi avaliar se as NPMs apresentavam alguma citotoxicidade sobre as bactérias e leveduras. Sendo assim, uma resposta positiva ou negativa poderia informar sobre a possibilidade de aplicação destes nanomateriais para o cultivo celular 3D de microrganismos.

As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram expostas às NPMs por 72 h, sendo monitoradas visualmente a cada 24 h e suas respectivas microplacas foram fotografadas.

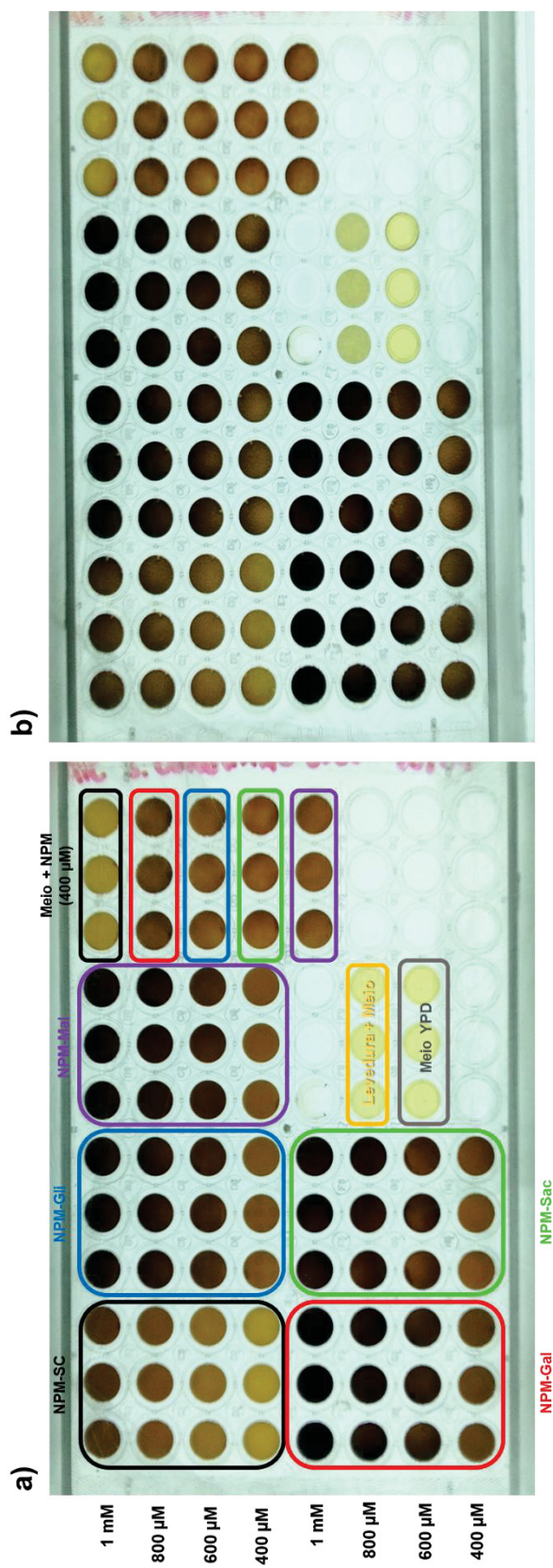
Nenhuma das NPMs apresentou citotoxicidade expressiva contra os organismos investigados nas diferentes concentrações testadas. Na Figura 15 é mostrada a placa contendo *E. coli*, na Figura 16 *S. aureus* e na Figura 17 *S. cerevisiae*, sendo sempre em a) representando o dia inicial do CIM e em b) o último dia, contabilizando 72 horas de incubação dos microrganismos associados às nanopartículas com e sem cobertura com os carboidratos.



**Figura 15.** Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) em *Escherichia coli*. As amostras de NPMs com e sem cobertura de carboidratos foram testadas nas concentrações de 1 mM, 800, 600 e 400 µM (de ferro), durante 72 h. Em (a) encontra-se a placa no início do ensaio com suas respectivas posições das amostras e controles. Já em (b), encontra-se a mesma placa ao final do ensaio. Não foram identificadas atividades citotóxicas das NPMs em nenhuma concentração.



**Figura 16.** Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus*. As amostras de NPMs com e sem cobertura de carboidratos foram testadas nas concentrações de 1 mM, 800, 600 e 400 µM (de ferro), durante 72 h. Em (a) encontra-se a placa no início do ensaio com suas respectivas posições das amostras e controles. Já em (b), encontra-se a mesma placa ao final do ensaio. Não foram identificadas atividades citotóxicas das NPMs em nenhuma concentração.



**Figura 17.** Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) em *Saccharomyces cerevisiae*. As amostras de NPMs com e sem cobertura de carboidratos foram testadas nas concentrações de 1 mM, 800, 600 e 400  $\mu$ M (de ferro), durante 72 h. Em (a) encontra-se a placa no início do ensaio com suas respectivas posições das amostras e controles. Já em (b), encontra-se a mesma placa ao final do ensaio. Não foram identificadas atividades citotóxicas das NPMs em nenhuma concentração.

As nanopartículas magnéticas desenvolvidas e funcionalizadas com moléculas como ATPS, PEG, ou até mesmo TEOS, possuem como finalidade atingir níveis tóxicos para *E. coli* e *S. aureus* e reduzir a sua população, como apresentado por DARWISH et al. (2015) e CHEN et al. (2012) funcionalizando suas NPMs com carboximetilquitosana. Além disso, as concentrações testadas nos microrganismos foram cerca de quinze vezes menores do que a aqui foi testada. Em contrapartida, foi demonstrado por AZEVEDO (2003) a não toxicidade destes tipos de nanomaterias para com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*). Além disso as NPMs de maghemita e magnetita são consideráveis com baixíssima toxicidade para células animais, sendo utilizadas constantemente como ferramentas biomédicas, assim mostrado por DOBSON (2018) e GAO et al. (2014).

Quando testadas nos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, em quatro concentrações distintas abaixo de 1 mM de equivalente em ferro, as NPMs com e sem cobertura com carboidrato não apresentaram atividade citotóxica para os mesmos, observando por inspeção visual. De certa forma, algumas NPMs são descritas como tóxicas para bactérias, sendo estas com tamanhos bem menores do que as obtidas neste estudo e com características de SPIONs. Mas ao mesmo tempo, magnetitas e maghemitas são estabelecidas como um tipo de nanomaterial com uma carga citotóxica muito baixa. Ainda por cima, a adsorção dos carboidratos na superfície das amostras tende a corroborar essa identidade das ferritas, bem como alegar a ausência de toxicidade das nanopartículas.

Os resultados obtidos deste trabalho, como mencionado anteriormente, indicam a presença de magnetita e maghemita como populações presentes nas amostras de NPMs sintetizadas. Isto infere na utilização destas NPMs para o cultivo 3D de bactérias e leveduras, ao mesmo tempo em que caso ocorra associação com os microrganismos possibilitando a utilização de dos campos magnéticos gerados por ímãs de neodímio para o controle da formação de *swarming* e impressão magnética.

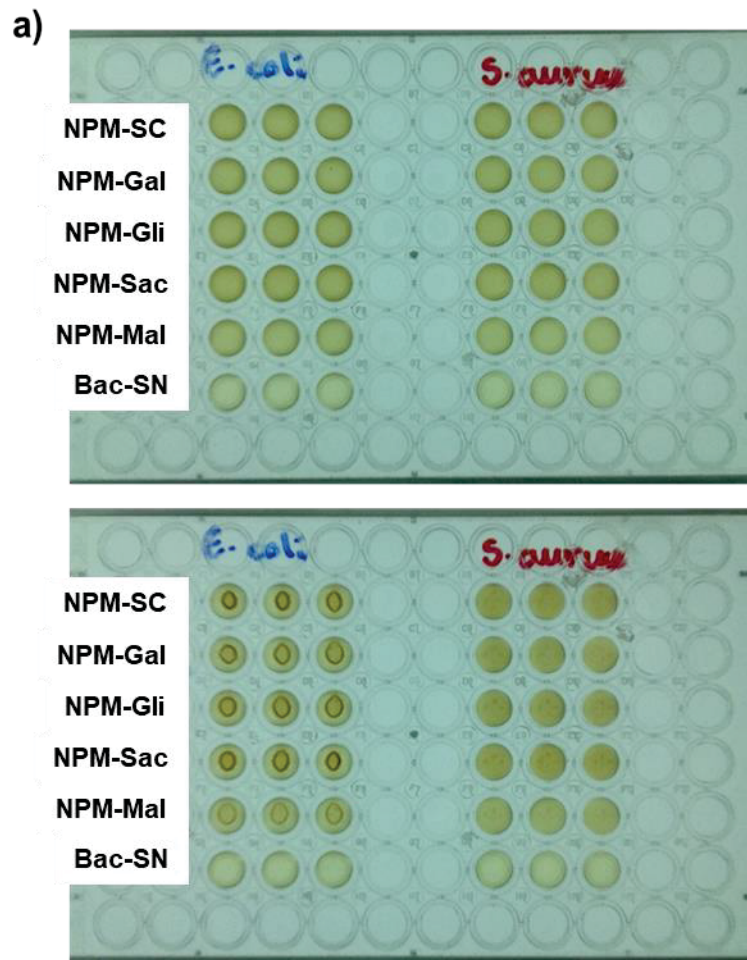
#### 4.7 Formação de colônias bacterianas após a magnetização com NPMs

Após a investigação da possível atividade citotóxica das NPMs com e sem cobertura com carboidratos nas três linhagens de microrganismos, e evidenciado que não ocorreu nenhuma interferência expressiva na viabilidade das células, foi avaliado o potencial magnetizador de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* após a adição de NPMs em meio de cultivo celular líquido.

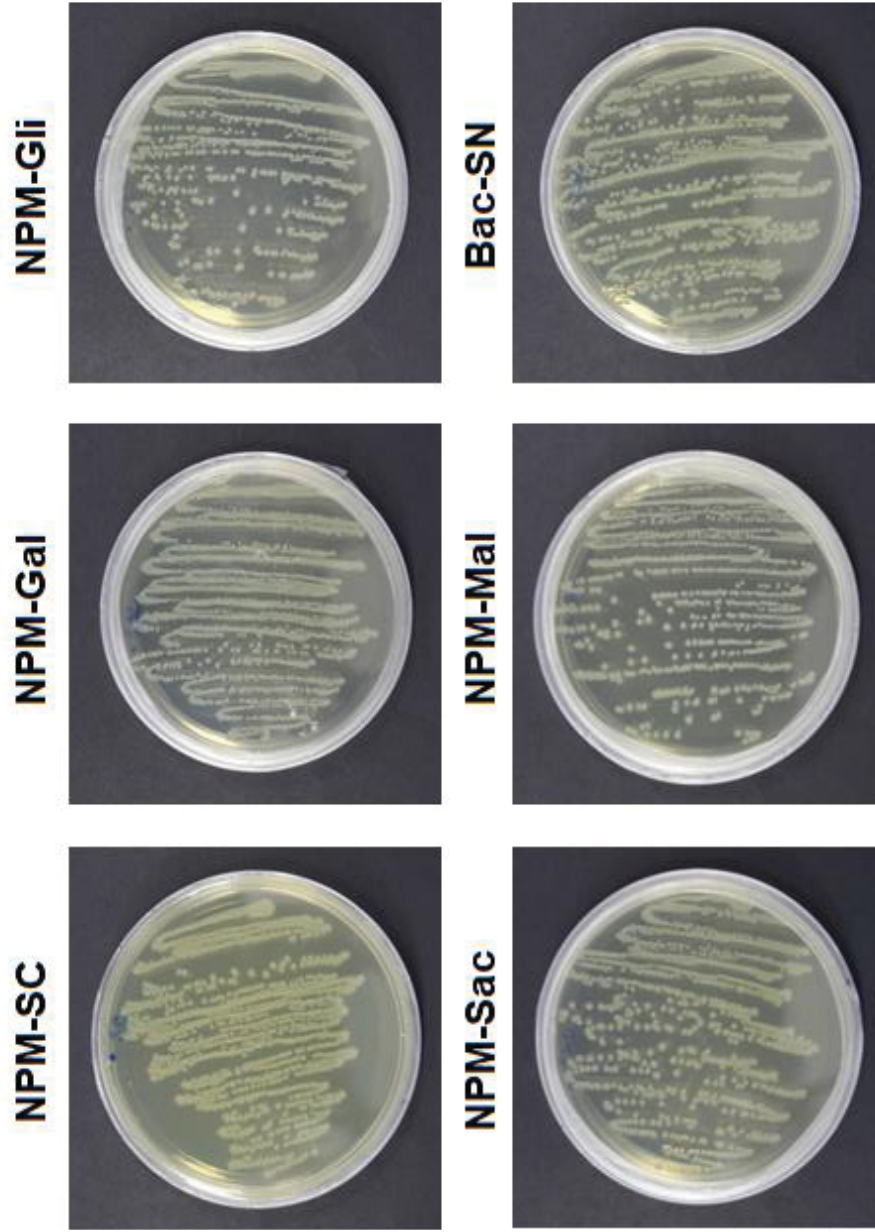
Na Figura 16 são mostradas as microplacas com os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* os quais foram adicionados em triplicatas, e em seguida as NPMs com e sem cobertura de carboidratos foram aplicadas. Após a incubação por 2 h em incubadora bacteriológica à 37°C e utilizando uma placa de acrílico contendo ímãs de neodímio emitindo campos magnéticos que arrastam as NPMs para o fundo, caracterizado por *Holdering*, foi colocada embaixo da microplaca contendo os microrganismos já com o material adicionado sobre os mesmos, levando-os para o fundo de cada poço, como mostrado na Figura 18.

Na Figura 19, encontram-se seis placas Petri com a formação de colônias individuais de *Escherichia coli*, após a magnetização com suas respectivas NPMs e então semeadas em meio semissólido. Da esquerda para a direita são as bactérias associadas com NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac, NPM-Mal e Bac-SN (controle de bactérias sem a adição de nanopartículas). Já na Figura 20, dá-se a mesma sequência que anterior, entretanto com a formação de colônias individuais de *Staphylococcus aureus*.

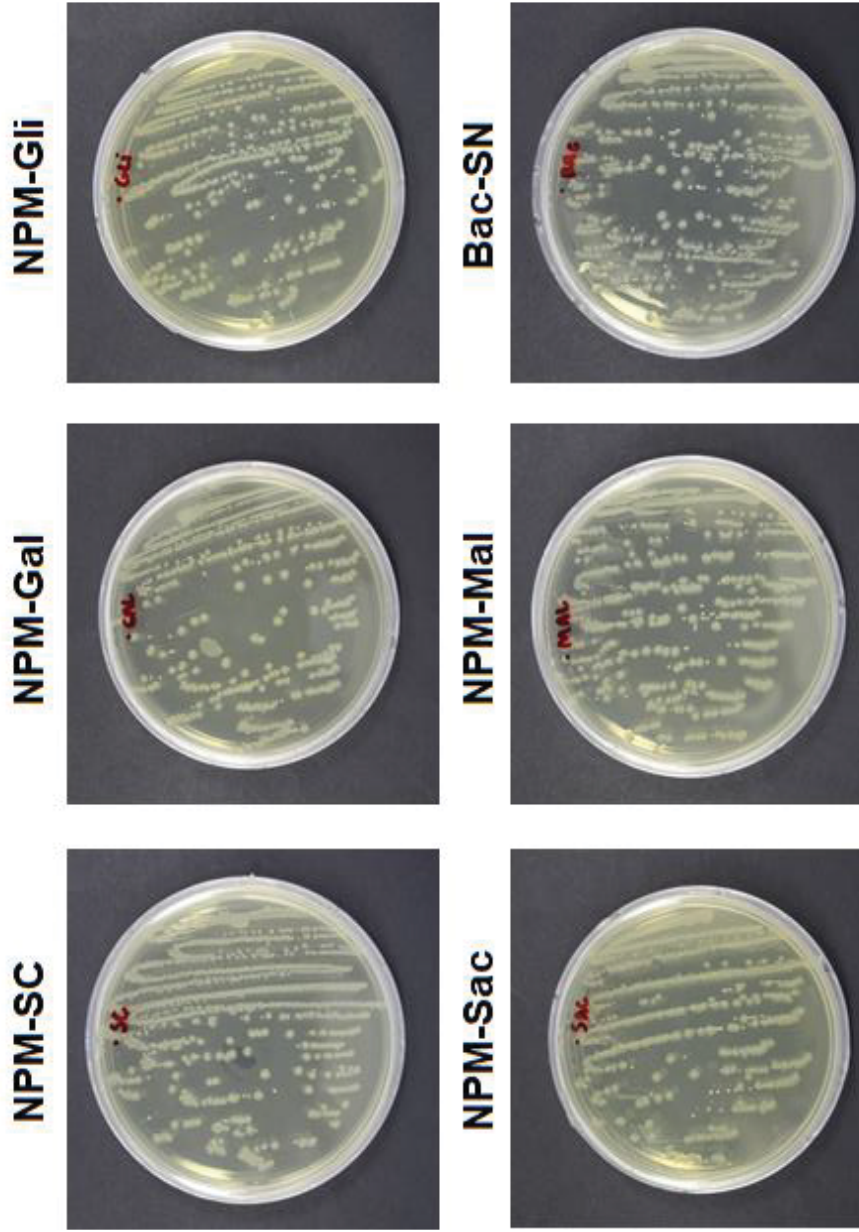




**Figura 18.** Magnetização de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para unidades formadoras de colônias. Em (a) associação dos microrganismos com as NPMs, bem como os controles não associados às partículas (Bac-SN). Já em (b) representa a magnetização dos mesmos utilizando a placa de acrílico contendo os ímãs de neodímio com campos magnéticos na forma de *holding*.

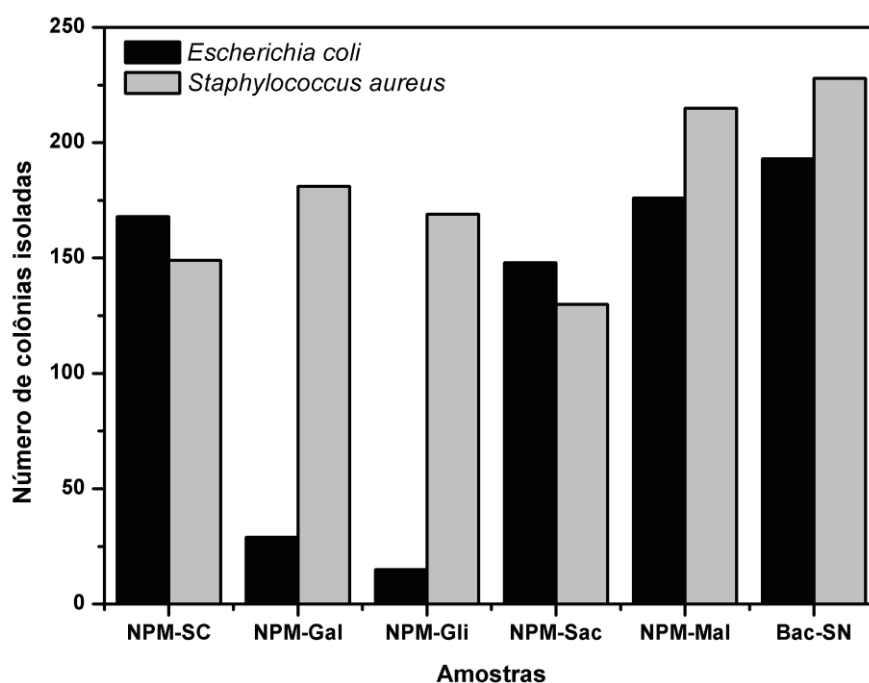


**Figura 19.** Unidades formadoras de colônias isoladas de *E. coli*. Placas de Petri com meio sólido contendo colônias isoladas de *E. coli* após a associação com as NPMs e coleta com alça de platina. Na linha de cima se encontram as bactérias associadas com NPM-SC, NPM-Gal e NPM-Gli, já na linha de baixo encontram-se as bactérias associadas com NPM-Sac, NPM-Mal e Bac-SN.



**Figura 20.** Unidades formadoras de colônias isoladas de *S. aureus*. Placas de Petri com meio sólido contendo colônias isoladas de *S. aureus* após a associação com as NPMs e coleta com alça de platina. Na linha de cima se encontram as bactérias associadas com NPM-SC, NPM-Gal e NPM-Gli, já na linha de baixo encontram-se as bactérias associadas com NPM-Sac, NPM-Mal e Bac-SN.

Em todas as placas foi observado o crescimento das bactérias e a respectiva formação de colônias após a magnetização das mesmas. O número total de colônias contabilizadas pelo *software* ImageJ foram convertidas em um gráfico de colunas representado pela Figura 21. Nela, é possível observar que o número de colônias isoladas de *S. aureus* é maior do que as de *E. coli* após a magnetização com NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Mal e BAC-SN. Já o contrário, ou seja, o número de unidades formadoras de colônias isoladas formadas de *E. coli* maiores do que as de *S. aureus* ocorre após a magnetização com SPM-SC e NPM-Sac.



**Figura 21.** Contagem do número de unidades formadoras de colônias bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* formadas após a magnetização com as NPMs. Em preto, encontram-se as barras correspondentes aos números de colônias formadas por *E. coli*. Já em cinza, encontram-se as barras correspondentes aos números de colônias formadas por *S. aureus*. Observa-se que o número de colônias isoladas de *S. aureus* é maior do que as de *E. coli* após a magnetização com NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Mal e BAC-SN. Já o contrário, ou seja, o número de unidades formadoras de colônias isoladas formadas de *E. coli* maiores do que as de *S. aureus* ocorre após a magnetização com SPM-SC e NPM-Sac.

As nanopartículas magnéticas ligadas aos microrganismos, vem sendo utilizadas como métodos para a remediação ambiental ou para ensaios com

biosensores altamente sensíveis. Para tais aplicações, QIAO et al. (2017) e KOEDRITH et al. (2014) funcionalizaram suas partículas com anticorpos específicos para proteínas da membrana externa de *E. coli*. Isso torna o ensaio, bem como essas aplicações, dispendiosas e bastante onerosas. Quando comparado às NPMs recobertas com carboidratos desenvolvidas neste trabalho, assim como as suas magnetizações sobre os microrganismos estudados, torna-se uma abordagem mais barata e alternativa para a pesquisa.

A magnetização dos microrganismos com as NPMs com e sem cobertura de carboidratos mostrou a diferença da capacidade de associação das mesmas com as duas espécies de bactérias. As nanopartículas NPM-Gal e NPM-Gli foram aquelas que indicaram ser o tipo de material que conseguiu se associar com a *E. coli*, arrastando para o fundo do poço após a aplicação do campo magnético gerado pelo ímã de neodímio na placa de acrílico. Quando avaliada a bactéria *S. aureus*, foi observado que não houve arraste magnético similar dos microrganismos expostos às NPMs recobertas ou não com carboidratos, quando comparados com o ocorrido em *E. coli*.

A compilação de resultados apresentados neste experimento de magnetização dos dois microrganismos para avaliar o número e a formação de colônias isoladas, mostrou que os diferentes nanomateriais sintetizados apresentam respostas distintas. Com isso, foi mostrado que além de tenderem a se associarem diferentemente com relação ao carboidrato adicionado à superfície das NPMs, ocorre uma preferência para com a *E. coli*.

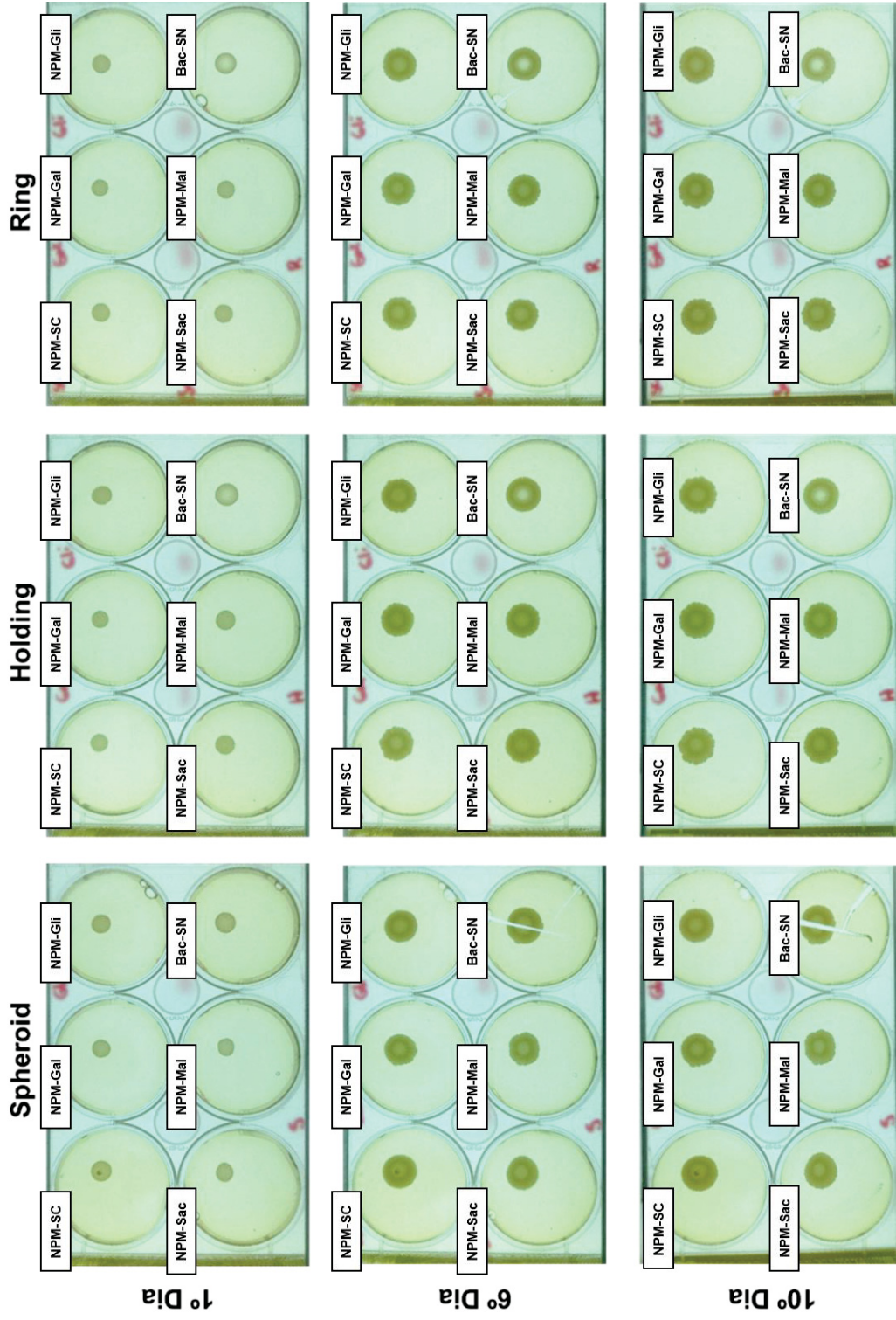
#### **4.8 Avaliação da formação de *Swarming* bacteriano após a exposição com NPMs**

O comportamento dos microrganismos para a formação do *swarming* varia desde o método aplicado, como também o ambiente em que se encontra a bactéria. No presente ensaio, *E. coli* e *S. aureus* foram submetidas à magnetização após associações com as NPMs e submetidas a três tipos de campos magnéticos formados por ímãs de neodímio, denominados por *Ring*, *Spheroid* e  *Holding*.

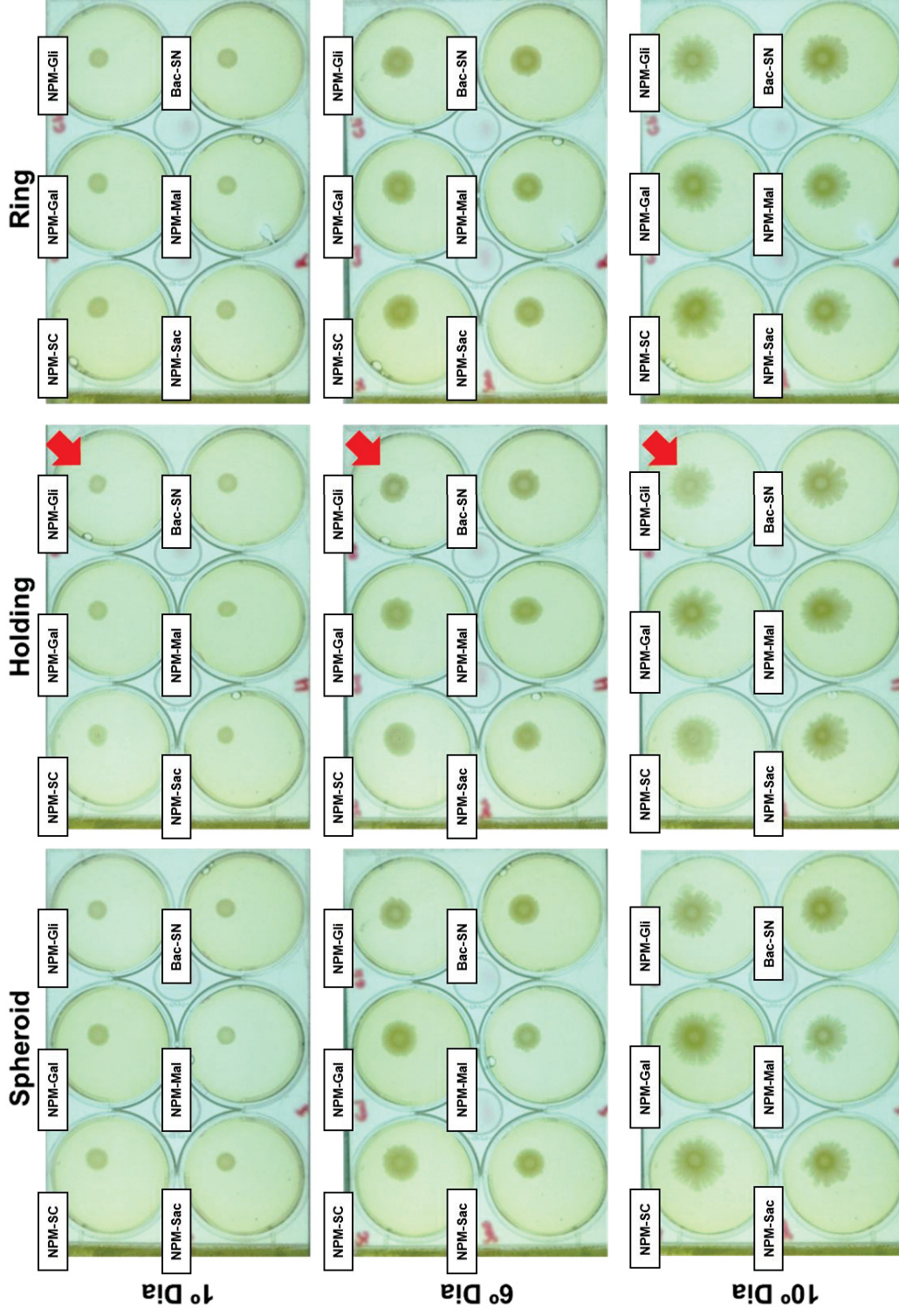
Durante dez dias consecutivos, as microplacas contendo as gotas referentes a cada microrganismo com suas respectivas NPMs associada foram fotografadas. De todas as microplacas observados, verificou-se que para *S. aureus* a metodologia não foi eficiente, configurando na formação de *swarming* normal em todas as partículas associadas, bem como o controle sem a adição de nanomaterial, representado pela Figura 22. Além disso, mesmo com o meio de cultivo rachado na microplaca referente ao campo *Spheroid*, não houve interferência no crescimento dos microrganismos.

Por outro lado, quando visualizada a Figura 23, pode-se identificar que dos três modos de magnetização por influências do campo magnético promovido pelo ímã de neodímio, a *E. coli* associada com a NPM-Gli em  *Holding* resultou numa menor formação de *swarming* quando comparada às condições experimentais dessa bactéria associada aos outros nanomateriais, bem como aquela que não possui associação com alguma nanopartícula. Assim sendo, esta NPM-Gli permitiu modular o desenvolvimento e comportamento da *E. coli*.

Para poder garantir a umidade das microplacas contendo os microrganismos, as mesmas foram envolvidas com parafilme (inicialmente) e trocadas durante os primeiros dias. Por conta do desgaste fácil do material utilizado, foi escolhido o plástico filme para envolver as placas, garantindo assim uma melhor manutenção da umidade destas.



**Figura 22.** Magnetização e modulação da formação de *swarming* em *S. aureus* após a associação das NPMs com e sem coberturas de carboidratos. Da esquerda para a direita encontram-se as bactérias associadas a NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Mal e Bac-SN (bactéria sem adição de nanomaterial, como controle). Em todos os poços não foi identificado a modulação do *swarming*.



**Figura 23.** Magnetização e modulação da formação de *swarming* em *E. coli* após a associação com as NPMs com e sem coberturas com carboidratos. Da esquerda para a direita encontram-se as bactérias associadas a NPM-SC, NPM-Gal, NPM-Gli, NPM-Sac, NPM-Mal e Bac-SN (bactéria sem adição de nanomaterial, como controle). As setas vermelhas correspondem à modulação do *swarming* identificada no poço correspondente às bactérias associadas as NPM-Gli.



As nanopartículas magnéticas, que possuem funcionalização ou não com alguma molécula e que seja aplicada ao cultivo tridimensional de células, vêm sendo aplicadas sumariamente para o desenvolvimento de organoides celulares e também como miméticos tumorais, como JAGANATHAN et al. (2014) demonstra em seu trabalho. Além disso, há a estratégia da bioimpressão magnéticas de células humanas, utilizando estas NPMs, segundo SOUZA et al. (2017). Como há uma oportunidade nesse caminho de associação destas nanopartículas com diferentes células, a proposta e execução da mesma apresentada neste trabalho, tornou-se uma alternativa para o cultivo de microrganismos.

Com a modulação da formação de *swarming* em *E. coli* a partir da associação da mesma com NPMs revestidas com glicose (NPM-Gli) e posteriormente submetidas ao campo magnético  *Holding*  gerados pelos ímãs de neodímio, mostra-se a possibilidade de magnetização deste microrganismo para distintos estudos. Com isso, a formação de biofilme pode ser alterada para mais ou para menos, tendo que as bactérias se encontram mais próximas, podendo ocasionar em *feedback* positivos ou negativos. Isso abre portas para que ensaios para que esta metodologia seja uma nova ferramenta para avaliação e teste de novos fármacos, ensaios para viabilidade e resistência bacteriana a medicamentos existentes.

Durantes os processos de magnetização das bactérias, destacaram-se alguns aspectos específicos em cada NPM e as respostas de ambos microrganismos para com as mesmas. No primeiro momento, após a adição das NPMs em *E. coli* e *S. aureus*, e atração magnética das mesmas utilizando uma placa contendo ímãs de neodímio com campo magnético do tipo  *Holding* , a formação de colônias isoladas indicou que houve uma maior interação de NPM-Gal, NPM-Gli e NPM-Sac com a bactéria Gram negativa do que com a Gram positiva. Além disso, pode-se dizer que ocorreu uma seleção de microrganismo por conta do recobrimento das NPMs com carboidratos distintos. No segundo momento, foi realizado a modulação da formação de *swarming* de ambas as bactérias com a associação das NPMs e submetidas à três diferentes campos magnéticos gerados por ímãs de neodímio, denominados por  *Ring* ,  *Spheroid*  e  *Holding* . Com as microplacas fotografadas, constatou-se que a NPM-Gli associada à *E. coli* e submetida ao ímã com o

campo magnético  *Holding*, modulou a formação do *swarming* deste microrganismo e concentrando os mesmos por mais tempo em um determinado ponto, quando comparado com todas à outras condições.

## 5. CONCLUSÕES

A síntese química das NPMs pelo método de coprecipitação alcalina e posteriormente a adição dos carboidratos galactose, glicose, sacarose e maltose para a cobertura das mesmas, acarretou na formação de nanopartículas com diferentes DH, Pdl e PZ.

A adesão por adsorção dos carboidratos na superfície das NPMs pode ter ocorrido, justamente por ter sido encontrado a modulação dos espectros Raman correspondentes das amostras, quando comparado àquela em que não houve a cobertura. Além disso, pelo ensaio de Benedict's, foi identificado em na síntese de NPM-Mal, a maltose se encontra na suspensão da solução e não aderido à nanopartículas.

Com a relação ao potencial citotóxico das NPMs com e sem a cobertura dos carboidratos sobre os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, em nenhuma concentração estudada foi identificada a susceptibilidade às mesmas.

Os ensaios de magnetização dos microrganismos com as NPMs com e sem cobertura de carboidratos, mostraram que houve uma maior associação das NPM-Gal e NPM-Gli com a *E. coli*, que é corroborado no ensaio para a contagem de unidades formadoras de colônias.

A modulação da formação do *swarming* de *E. coli* foi identificado após a associação das mesmas com as NPM-Gli, quando colocadas sobre um ímã com campo magnético do tipo  *Holding*.

Em virtude do apresentado neste trabalho, a utilização de NPMs modificadas com carboidratos em microrganismos planctônicos, como a *Escherichia coli*, a fim de modular a formação de *swarming* e conseqüentemente a indução de biofilme bacteriano, torna-se uma ferramenta útil para avaliação e teste de novos fármacos, resistência e principalmente para a validação de ensaios 3D com bactérias, como a bioimpressão magnética de microrganismos.

## 6. REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale research letters**, v. 7, n. 1, p. 144, 2012.

ARAKHA, M. et al. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. **Scientific reports**, v. 5, p. 14813, 2015.

ASHTARI, P. et al. An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles. **Talanta**, v. 67, n. 3, p. 548-554, 2005.

AZEVEDO, R. B. et al. Morphological study of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with magnetic fluid. **IEEE transactions on magnetics**, v. 39, n. 5, p. 2660-2662, 2003.

BALAKRISHNAN, S.; BONDER, M. J.; HADJIPANAYIS, G. C. Chemical reduction synthesis and ac field effect of iron based core-shell magnetic nanoparticles. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 24, p. 245005, 2009.

BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397-400, 2013.

BARRERA-RODRÍGUEZ, R.; FUENTES, J. M. Multidrug resistance characterization in multicellular tumour spheroids from two human lung cancer cell lines. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 47, 2015.

BHARDE, A. A. et al. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 11, p. 5787-5794, 2008.

BHADRIRAJU, K.; CHEN, C. S. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. **Drug discovery today**, v. 7, n. 11, p. 612-620, 2002.

BIEHL, P. et al. Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings. **Polymers**, v. 10, n. 1, p. 91, 2018.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation *in vitro*—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 405-412.

BISSELL, M. J.; RIZKI, A.; MIAN, I. S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 6, p. 753, 2003.

BOMATÍ-MIGUEL, O. et al. Calorimetric study of maghemite nanoparticles synthesized by laser-induced pyrolysis. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 2, p. 591-598, 2008.

BRESLIN, S; O'DRISCOLL, L. **Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery**. Drug Discovery Today, [s.l.], v. 18, n. 5-6, p.240-249, mar. 2013.

CHEN, T. et al. Carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles for disruption of biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 40, p. 13164-13172, 2012.

COPELAND, M. F.; WEIBEL, D. B. Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. **Soft matter**, v. 5, n. 6, p. 1174-1187, 2009.

CORDOVA, G.; LEE, B. Y.; LEONENKO, Z. Magnetic force microscopy for nanoparticle characterization. **arXiv preprint arXiv:1704.08289**, 2017.

CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1708-1712, 2001..

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. **Chemical reviews**, v. 104, n. 9, p. 3893-3946, 2004.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 261-289, 2004.

DARWISH, M. S. A. et al. Functionalized magnetic nanoparticles and their effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Nanomaterials**, v. 16, n. 1, p. 89, 2015.

DOBSON, J.; RINALDI, C. (Ed.). **Nanomagnetic Actuation in Biomedicine: Basic Principles and Applications**. CRC Press, 2018.

DOOSTMOHAMMADI, A. et al. Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2311-2316, 2011.

DURMUS, N. G. et al. Magnetic levitation of single cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. E3661-E3668, 2015.

EL-BOUBBOU, K. et al. Magnetic glyco-nanoparticles: a tool to detect, differentiate, and unlock the glyco-codes of cancer via magnetic resonance imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 12, p. 4490-4499, 2010.

ENEJDER, A. M. K. et al. Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, n. 3, p. 031114, 2005.

FARR, T. D. et al. Imaging early endothelial inflammation following stroke by core shell silica superparamagnetic glyconanoparticles that target selectin. **Nano letters**, v. 14, n. 4, p. 2130-2134, 2014.

GAO, Y.; LIU, Y.; XU, C. Magnetic nanoparticles for biomedical applications: From diagnosis to treatment to regeneration. In: **Engineering in Translational Medicine**. Springer, London, 2014. p. 567-583.

GHADIALI, J. E.; STEVENS, M. M. Enzyme-responsive nanoparticle systems. **Advanced Materials**, v. 20, n. 22, p. 4359-4363, 2008.

GRZEŚKOWIAK, B. F. et al. Nanomagnetic activation as a way to control the efficacy of nucleic acid delivery. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 1, p. 103-121, 2014.

GONÇALVES, L. C. et al. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles dispersed in Pluronic F127 hydrogel: potential uses in topical applications**. RSC Advances, v. 7, n. 24, p. 14496-14503, 2017.

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

HANESCH, M. Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy) hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies. **Geophysical Journal International**, v. 177, n. 3, p. 941-948, 2009.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 249-273, 2003.

HOPKINS, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 11, p. 682, 2008.

HUANG, C. et al. Magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging: modulation of macrophage uptake by controlled PEGylation of the surface coating. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 39, p. 8512-8520, 2010.

ILASLAN, K.; BOYACI, I. H.; TOPCU, A. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. **Food Control**, v. 48, p. 56-61, 2015.

JAGANATHAN, H. et al. Three-dimensional *in vitro* co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific reports**, v. 4, p. 6468, 2014.

JAROCH, K.; JAROCH, A.; BOJKO, B.. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable *in vitro-in vivo* extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 297-312, 2018.

KANG, B. et al. Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 22, p. 8301-8325, 2015.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.

KIM, W. et al. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3111-3117, 2003.

KLEIN, F. et al. Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture. **Advanced materials**, v. 23, n. 11, p. 1341-1345, 2011.



KOEDRITH, P. et al. Recent advances in potential nanoparticles and nanotechnology for sensing food-borne pathogens and their toxins in foods and crops: current technologies and limitations. **Sensors Mat**, v. 26, n. 10, p. 711-736, 2014.

KOLA, I. The state of innovation in drug development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 227-230, 2008.

KRALJ, S. et al. Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 13, p. 1847-1853, 2010.

LAURENT, S et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008.

LI, S. et al. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 1, p. 69-74, 2012.

LI, Xiaoming et al. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 5, p. 1285-1296, 2016.

LI, Ying-Sing; CHURCH, J. S.; WOODHEAD, A. L. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 8, p. 1543-1550, 2012.

LIU, Ting-Yu et al. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 52-65, 2009.

LU, An-Hui; SALABAS, E. L; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.

MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 24-46, 2011.

MAJIDI, S. et al. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 722-734, 2014.

MANDAL, M. et al. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. **Journal of colloid and interface science**, v. 286, n. 1, p. 187-194, 2005.

MARX, U. Related Titles. **Drug testing *in vitro***, [s.l.], v. 1, n. 1, p.299-299, 7 dez. 2006.

MCGLASHEN, M. L. et al. Resonance Raman spectroscopy of galactose oxidase: A new interpretation based on model compound free radical spectra. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 14, p. 4918-4922, 1995.

MOHAMMED, L. et al. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, v. 30, p. 1-14, 2017.

MURRAY, C. B.; KAGAN, C.R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual review of materials science**, v. 30, n. 1, p. 545-610, 2000.

NATILE, Marta Maria; GLISENTI, Antonella. New NiO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite catalysts: synthesis and characterization. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 13, p. 2502-2510, 2003.

PAMMOLLI, F.; MAGAZZINI, L.; RICCABONI, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 6, p. 428, 2011.

PANTA, P. C.; BERGMANN, C. P. Raman spectroscopy of iron oxide of nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). **J Mater Sci Eng**, v. 5, n. 217, p. 2169-0022.1000217, 2015.

PASCAL, C. et al. Electrochemical synthesis for the control of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticle size. Morphology, microstructure, and magnetic behavior. **Chemistry of materials**, v. 11, n. 1, p. 141-147, 1999.

PAUL, S. M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203, 2010.

QIAO, Z. et al. Rapid and sensitive detection of *E. coli* O157: H7 based on antimicrobial peptide functionalized magnetic nanoparticles and urease-catalyzed signal amplification. **Analytical Methods**, v. 9, n. 35, p. 5204-5210, 2017.

RAMASWAMY, B. et al. Movement of magnetic nanoparticles in brain tissue: mechanisms and impact on normal neuronal function. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1821-1829, 2015.

RATHER, Philip N. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1065-1073, 2005.

RIBOLDI, S.A. et al. *In vitro* dynamic culture of cell-biomaterial constructs. In: **Characterization of Polymeric Biomaterials**. p. 339-363. 2017

ROTO, Roto; YUSRAN, Yusran; KUNCAKA, Agus. Magnetic adsorbent of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ $\text{SiO}_2$  core-shell nanoparticles modified with thiol group for chloroauric ion adsorption. **Applied Surface Science**, v. 377, p. 30-36, 2016.

SABALE, S. et al. Recent developments in the synthesis, properties, and biomedical applications of core/shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles with gold. **Biomaterials science**, v. 5, n. 11, p. 2212-2225, 2017.

ANDRIOLA S., Amanda K. et al. Magnetophoresis at the nanoscale: tracking the magnetic targeting efficiency of nanovectors. **Nanomedicine**, v. 7, n. 11, p. 1713-1727, 2012.

SINGAMANENI, S. et al. Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 42, p. 16819-16845, 2011.

SOUZA, G. R. et al. Magnetically bioprinted human myometrial 3D cell rings as a model for uterine contractility. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 683, 2017.

SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291, 2010.

SWIECICKI, Jean-Marie; SLIUSARENKO, O.; WEIBEL, D. B. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. **Integrative Biology**, v. 5, n. 12, p. 1490-1494, 2013.

TADIC, M. et al. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. **Applied Surface Science**, v. 322, p. 255-264, 2014.

TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R182, 2003.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 29-41, 2014.

TOMBÁ CZ, E. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponse nanosystems. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 468, n. 3, p. 442-453, 2015.

TSENG, H. et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. **Scientific reports**, v. 5, p. 13987, 2015.

VAYSSIERES, L. et al. Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. **Journal of colloid and interface science**, v. 205, n. 2, p. 205-212, 1998.

VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 496-506, 2008.

TONG, S. et al. Coating optimization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for high T2 relaxivity. **Nano letters**, v. 10, n. 11, p. 4607-4613, 2010.

WANG, Y. et al. Study on performance of magnetic fluorescent nanoparticles as gene carrier and location in pig kidney cells. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 127, 2013.

WU, W. et al. Synthesis and magnetic properties of maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) short-nanotubes. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 9, p. 1474, 2010.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale research letters**, v. 3, n. 11, p. 397, 2008.

ZHANG, Y. et al. Magnetic force microscopy of iron oxide nanoparticles and their cellular uptake. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 4, p. 923-928, 2009.