



Universidade
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS
PARA SAÚDE**

ALINE FERNANDES BARCELOS

**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS Fe_3O_4/Ag NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa***

Anápolis

2022

**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS Fe₃O₄/Ag NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme

Co-orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis

2022

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

FB242 Fernandes Barcelos, Aline
a Atividade de nanopartículas Fe₃O₄/Ag na formação de
biofilme por Pseudomonas aeruginosa / Aline Fernandes
Barcelos; orientador Luciana Rebelo Guilherme;
co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves. -- Anápolis,
2023.
79 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2023.

1. Inibição da formação de biofilme. 2. Pseudomonas
aeruginosa. 3. Nanocompósito. 4. Nanopartículas de
óxido de ferro. 5. Nanopartículas de prata. I. Rebelo
Guilherme, Luciana, orient. II. Lázaro Faleiro Naves,
Plínio, co-orient. III. Título.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autora, autorizo a Universidade Estadual de Goiás (UEG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a **Lei nº 9610/98**, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Estando ciente que o conteúdo disponibilizado é de inteira responsabilidade do autor / autora.

Dados do autor (a)

Nome Completo: Aline Fernandes Barcelos

E-mail: alinefernandesbarcelos1@gmail.com

Dados do trabalho

Título: Atividade de nanopartículas Fe₃O₄/Ag na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

Tipo

() Tese (x) Dissertação

Curso/Programa: Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Concorda com a liberação documento [x] SIM [] NÃO¹

Assinalar justificativa para o caso de impedimento e não liberação do documento:

[] Solicitação de registro de patente;

[] Submissão de artigo em revista científica;

[] Publicação como capítulo de livro;

[] Publicação da dissertação/tese em livro.

- ✓ Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa, prorrogável por mais um ano.
- ✓ Em caso de não autorização, o período de embargo será de até um ano a partir da data formulário de solicitação para extensão de prazo para publicação devidamente justificado, junto à coordenação de curso.

Anápolis, 20 de janeiro de 2022



Assinatura do autor (a)



Assinatura do orientador (a)

**SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 063

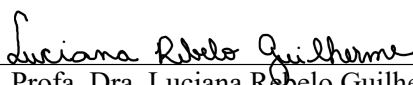
ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – Ao segundo dia do mês de dezembro de 2022, às 09 horas, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme – Orientadora, Profa. Dra. Eryza Guimarães de Castro e Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro, sob a presidência da primeira, e em sessão realizada por videoconferência. Procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: “**Atividade de nanopartículas Fe₃O₄/Ag na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa***” de autoria de **Aline Fernandes Barcelos**, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação **Aline Fernandes Barcelos** que, em 30 minutos procedeu à apresentação do trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi **aprovada** por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa “Monitoramento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 40 minutos, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme, presidente da banca, lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Profa. Dra. Eryza Guimarães de Castro
Membro externo – UNICENTRO



Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro
Membro externo – UFG



Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme
Presidente da Banca



Documento assinado digitalmente

LUCIANA REBELO GUILHERME


Data: 01/02/2023 19:17:14-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Aline Fernandes Barcelos

**“Atividade de nanopartículas Fe₃O₄/Ag na formação de biofilme por
Pseudomonas aeruginosa”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 02 de dezembro de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Documento assinado digitalmente
 LUCIANA REBELO GUILHERME
Data: 01/02/2023 19:17:14-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme
Presidente da Banca
UEG



Profa. Dra. Eryza Guimarães de Castro
Membro externo
UNICENTRO



Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro
Membro externo
UFG

Aos meus pais Wilson e Nilza que através de seus exemplos e esforços me apoiaram nos meus estudos.

Ao meu marido Vítor Garcia que com sua ajuda, apoio, incentivo e compreensão tornou possível a conclusão do trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Goiás pelo apoio através do programa de mestrado em Ciências Moleculares. À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa cedida. À FAPEG pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

À professora Dra. Luciana Rebelo Guilherme, que dividiu um pouco do seu tempo e conhecimento comigo. Agradeço pelas dicas, amizade, incentivo em cada passo dado, que só acrescentou na minha vida acadêmica e pessoal.

Ao Professor Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, pelos conhecimentos divididos, paciência e tempo dedicado ao ensinamento das práticas de microbiologia.

À professora Dra. Roberta Signini pelo apoio na graduação para que eu pudesse dedicar todo o tempo ao mestrado.

Ao professor Dr. Sebastião Willian da Silva – UNB, pelo apoio e contribuição com minha pesquisa.

À doutoranda Gabriela Cândido Ribeiro – UNB, pelos conhecimentos divididos, apoio e ensinamentos passados, foi o início de todo meu desenvolvimento nesta área.

Aos técnicos dos laboratórios Central Analítica (UFG) e LabMic (UFG) Gustavo Amorim Santos e Tatiane Oliveira dos Santos pela atenção e ajuda nas análises de caracterização das minhas amostras.

Aos meus pais Wilson Caetano Barcelos e Nilza Fernandes Barcelos, meus irmãos Romário Caetano Barcelos e Fernando Barcelos Fernandes por todo incentivo, apoio, compreensão e amor recebidos ao longo de toda minha vida.

Ao meu marido Vitor Garcia de Alencar pela compreensão, incentivo, carinho e ajuda.

Aos meus amigos de laboratório e do mestrado: Julliane Chaves Arruda, Milena Araújo, Ádrian Brito, Reuber Mendes Rocha e Charles Lima Ribeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram pela concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Nanotecnologia e Nanomateriais.....	19
2.2	Nanopartículas de óxido metálico.....	20
2.2.1	Síntese e funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro.....	22
2.2.1.1	Método de coprecipitação.....	23
2.3	Magnetita	23
2.4	Nanopartículas de prata.....	25
2.5	Nanopartículas de crescimento misto	27
2.5.1	Nanopartículas do tipo <i>core-shell</i>	27
2.5.2	Nanopartículas do tipo núcleo-satélite.....	29
2.5.3	Nanopartículas do tipo heterodímero.....	30
2.6	Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	32
2.7	Atividades biológicas dos nanomateriais	32
2.7.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.7.2	Formação de biofilme	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA.....	39
4.1	Síntese e funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro.....	39
4.2	Síntese de nanopartículas de prata	39
4.3	Síntese do nanocompósito Fe ₃ O ₄ /Ag	40
4.4	Potencial Zeta e Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	40
4.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	41
4.6	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.7	Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	42
4.8	Espectroscopia de absorção atômica	42
4.9	Bioensaios	42
4.9.1	Ensaio de letalidade com <i>Artemia salina</i>	42

4.9.2	Ensaio para a formação de biofilme	44
4.9.2.1	Obtenção e manutenção das bactérias	44
4.9.2.2	Ensaio de formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Espectroscopia de absorção atômica	48
5.2	Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	48
5.3	Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho	49
5.4	Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	51
5.5	Microscopia eletrônica de transmissão	52
5.6	Difração de elétron de área selecionada (SAED)	55
5.7	Estudo de toxicidade das nanopartículas pelo teste de letalidade de <i>Artemia salina</i>	56
5.8	Formação de biofilme	57
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS.....	63

Quadro 1 Levantamento de sínteses de nanopartículas de prata 26

FIGURAS

Figura 1	Íons metálicos nos sítios octaédricos e tetraédricos	24
Figura 2	Representação de nanopartícula <i>core-shell</i>	27
Figura 3	Representação de nanopartícula núcleo-satélite	29
Figura 4	Representação de nanopartícula heterodímero	31
Figura 5	Representação das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	33
Figura 6	Representação do mecanismo de destruição do biofilme	34
Figura 7	Aspecto macroscópico do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 em ágar cetrimide	35
Figura 8	Etapas da formação de biofilme	37
Figura 9	Espectros de absorção na região do UV-vis	49
Figura 10	Espectros das amostras pelo método FTIR e FTIR-ATR	50
Figura 11	Micrografias das nanopartículas de a) óxido de ferro; b) prata; c) e d) nanocompósito em diferentes escalas	53
Figura 12	Histograma de distribuição do diâmetro das nanopartículas de a) óxido de ferro; b) prata; c) compósito	54
Figura 13	Difração de elétrons de área selecionada (SAED) das nanopartículas a) prata; b) óxido de ferro; c) nanocompósito	56

ESQUEMAS

Esquema 1	Preparo da água marinha artificial e incubação de cistos	43
Esquema 2	Diluição dos compostos para o teste de letalidade em <i>Artemia salina</i>	43
Esquema 3	Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI)	46

TABELAS

Tabela 1	Resultados obtidos na caracterização das nanopartículas por potencial zeta e DLS	52
Tabela 2	Índices de Miller em relação aos valores de <i>d-spacing</i> conhecidos para prata, óxido de ferro e compósito	55
Tabela 3	Índice de formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Tabela 4	Índice de formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença de nanopartículas	58
Tabela 5	Redução significativa da formação de biofilme na presença de nanopartículas	59

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Fe ₃ O ₄	Óxido de ferro
Ag	Prata
Fe ₃ O ₄ /Ag	Compósito de óxido de ferro/prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AuNPs	Nanopartículas de ouro
NPs	Nanopartículas
NCs	Nanocompósitos
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
ID	Índice de dispersão
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
FTIR	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
ATR	Reflectância total atenuada
UV-vis	Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível
SAED	Difração de elétron de área selecionada
CMI	Concentração mínima inibitória
CL ₅₀	Concentração letal média
BHI	Caldo infusão cérebro coração
SFE	Solução fisiológica estéril
AMA	Água marinha Artificial
TSB	<i>Trypticase soy broth</i>
DO	Densidade óptica (Absorbância)
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
N&N	Nanociência e Nanotecnologia
Fe ³⁺	Íons férricos
Fe ²⁺	Íons ferrosos
γ-Fe ₂ O ₃	Maghemita
α-Fe ₂ O ₃	Hematita
NaBH ₄	Boro-hidreto de sódio
FeCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de ferro II

FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto de ferro III
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
AgNO ₃	Nitrato de prata
Rpm	Rotação por minuto
PVP	Polivinilpirrolidona
PVA	Álcool polivinílico
CTAB	Brometo de cetrimônio
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Mililitros
ufc	Unidade formadora de colônia
nm	Nanômetro
mV	Milivolts
pH	Potencial hidrogeniônico
(m/v)	Proporção massa/volume

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública preocupante, pois as bactérias deixam de responder aos antibióticos. A procura por materiais que contenham propriedades biológicas, sobretudo à atividade antimicrobiana, é uma interessante área de estudo para busca de alternativas aos compostos convencionais no controle de micro-organismos. O desenvolvimento de novas sínteses de nanopartículas de crescimento misto é importante para unir e melhorar as funcionalidades individuais de metais diferentes, permitindo a aplicação desses materiais em sistemas biológicos. As nanopartículas de crescimento misto são materiais nanocompósitos, ou seja, materiais em que pelo menos um de seus componentes apresentam dimensões nanométricas. O nanocompósito é formado pela união de materiais distintos em que estão presentes duas camadas de materiais com o objetivo de obter um produto de maior qualidade em relação a nanopartículas únicas. O objetivo deste trabalho é testar a eficácia de nanopartículas Fe_3O_4 , Ag e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ na inibição da formação do biofilme por micro-organismos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. A síntese da nanopartícula Fe_3O_4 foi realizada pelo método de co-precipitação, a síntese da nanopartícula de prata foi realizada utilizando nitrato de prata e NaBH_4 como agente redutor e o nanocompósito foi sintetizado utilizando as nanopartículas de Fe_3O_4 e a cobertura com a prata utilizando solução de NaBH_4 1% como agente redutor. Para as nanopartículas Fe_3O_4 , o potencial zeta foi igual a -37,7 mV, o DLS apresentou raio hidrodinâmico de 106,7 nm e ID de 0,159, o MET permitiu a visualização de nanopartículas de Fe_3O_4 de morfologia esférica. Para as nanopartículas de prata, o potencial zeta foi igual a -43,5 mV, o DLS apresentou raio hidrodinâmico 63,27 nm e ID de 0,491, o MET permitiu a visualização de nanopartículas de Ag de morfologia esférica e hexagonal. Para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$, o potencial zeta foi igual a -15,1 mV, o DLS apresentou raio hidrodinâmico de 573,9 nm e ID de 0,806, o MET permitiu a visualização de nanopartículas de prata entre as nanopartículas de Fe_3O_4 e o material apresentou morfologia esférica. Os resultados sugerem que a formação do nanocompósito provocou um aumento no estado de agregação das nanopartículas. Sendo assim, as nanopartículas se mostraram estáveis, mas com grande estado de agregação. Foi avaliado a toxicidade (CL_{50}) das três nanopartículas em *Artemia salina*. Os resultados demonstraram que as nanopartículas não apresentaram toxicidade com CL_{50} na concentração máxima testada de $20,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. As nanopartículas de prata com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* para as cepas Pa6, Pa10, Pa13 e Pa ATCC 27853. Os nanocompósitos $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ na concentração de $0,258 / 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram a formação de biofilme nas cepas Pa5, Pa10 e Pa13. Por fim, as nanopartículas de Fe_3O_4 na concentração $0,258 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram formação de biofilme das cepas Pa10 e Pa28.

Palavras-chave: Formação de biofilme. Toxicidade. *Artemia salina*. Nanocompósito.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is a public health concern of concern as bacteria fail to respond to antibiotics. The search for biomaterials which contains biological properties, especially antimicrobial activity, is an interesting area of study to search alternatives to conventional compounds for the control of pathogenic microorganisms. The development of new syntheses of hybrid nanoparticles is essential to improve the individual functionalities of different metals, allowing the application of these materials in biological systems. Hybrid nanoparticles are composite materials formed by joining different materials in two layers of materials. The hybrid nanoparticle has the purpose of obtaining a higher quality product compared to single nanoparticles. The composite nanoparticles will be used for future studies on toothbrush bacteria. The aim of this work is to test the efficacy of Fe₃O₄, Ag and Fe₃O₄/Ag nanoparticles in inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. The synthesis of the Fe₃O₄ nanoparticle was performed by the co-precipitation method, the synthesis of the silver nanoparticle was performed using silver nitrate and NaBH₄ as a reducing agent and the composite nanoparticle was performed using Fe₃O₄ nanoparticles, silver nitrate and solution of 1% NaBH₄ as a reducing agent. For Fe₃O₄ nanoparticles, the zeta potential was equal to -37.7 mV, the DLS presented a hydrodynamic radius of 106.7 nm and an ID of 0.159, the TEM allowed the visualization of Fe₃O₄ nanoparticles with spherical morphology. For silver nanoparticles, the zeta potential was equal to -43.5 mV, the DLS presented a hydrodynamic radius of 63.27 nm and an ID of 0.491, the TEM allowed the visualization of Ag nanoparticles with spherical and hexagonal morphology. For Fe₃O₄/Ag nanoparticles, the zeta potential was equal to -15.1 mV, the DLS presented a hydrodynamic radius of 573.9 nm and an ID of 0.806, the TEM allowed the visualization of silver nanoparticles between the Fe₃O₄ nanoparticles, and the material presented spherical morphology. The results suggest that the formation of the composite increase the aggregation state of the nanoparticles. Thus, the nanoparticles proved to be stable, but with a high state of aggregation. The three nanoparticles were evaluated regarding their toxicity (LC₅₀) in *Artemia salina*. The results showed that the nanoparticles did not show toxicity with LC₅₀ at the maximum tested concentration of 20.5 µg mL⁻¹. Silver nanoparticles with 1 µg mL⁻¹ concentration inhibited biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* for the bacteria Pa6, Pa10, Pa13 and Pa ATCC 27853. The nanocomposites with 0,258 / 1 µg mL⁻¹ concentration inhibited biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* for the bacteria Pa5, Pa10 and Pa13. Lastly, Fe₃O₄ nanoparticles with 0,258 µg mL⁻¹ concentration inhibited biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* for the bacteria Pa10 and Pa28.

Keywords: Biofilm formation. Toxicity. Antimicrobial activity. *Artemia salina*.

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos problemas de saúde pública mais preocupantes, devido às bactérias deixarem de responder aos agentes antimicrobianos. A resistência das bactérias aos antibióticos é um fenômeno natural devido a diversos fatores como o uso inadequado de antibióticos sem receitas médicas, a interrupção do uso do medicamento antes do período pré-determinado ou a utilização excessiva do medicamento e é responsável por consequências clínicas que dificultam o tratamento eficaz de infecções (LOUREIRO *et al.*, 2016).

O processo de desenvolvimento de agentes biológicos antimicrobianos tornou-se necessário devido ao declínio de antibióticos clinicamente eficazes, especialmente para infecções relacionadas a biofilmes refratários. O uso de cateter venoso central (CVC) está altamente associado a infecções sanguíneas hospitalares e seu uso requer uma avaliação sistemática de benefícios e riscos. Nos hospitais é frequente a contaminação bacteriana desses tubos e pode resultar no desenvolvimento de películas protetoras para agentes microbianos, ou seja, desenvolvimento do biofilme. O biofilme fornece uma defesa prática contra agentes antimicrobianos, facilitando a disseminação bacteriana pelo corpo do paciente e o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, como as causadas por infecções de *Pseudomonas aeruginosa* (RIBEIRO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa responsável por infecções hospitalares devido à alta adaptabilidade desta espécie, que pode exibir fenótipos de multirresistência aos fármacos que limitam a eficácia da maioria dos antimicrobianos disponíveis. Neste contexto, novos métodos são necessários para reduzir a morbidade e mortalidade de pacientes que sofrem de infecções por estes micro-organismos. Novas metodologias para um tratamento universal eficaz contra as infecções causadas por *P. aeruginosa* precisam ser desenvolvidas (ARMIJO *et al.*, 2020; BOUCHER *et al.*, 2013; ZAMPERINI *et al.*, 2017).

A nanotecnologia voltada a área da saúde pode permitir o desenvolvimento e caracterização de novos materiais, a serem utilizados em vários âmbitos da odontologia e medicina. Por exemplo, o desenvolvimento de materiais em escala atômica para tratamentos de contaminantes microbianos causados por fungos e bactérias (SHAH *et al.*, 2021). O intuito é sintetizar estruturas estáveis em escala nanométrica para aplicações em diversas áreas de pesquisa. A nanosíntese permite

essa formação de materiais em nanoescala, na qual se incluem os nanocompósitos (NCs) (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Nanopartículas individuais possuem características e aplicações específicas, por isso é importante pensar na possibilidade de trabalhar com o conjunto delas, como os nanocompósitos. A síntese de nanocompósitos objetiva unir as características individuais de cada nanoestrutura para melhorar as aplicações e limitações de um componente individual. Nanocompósitos são nanopartículas híbridas formadas através da síntese do óxido metálico e posteriormente a síntese compósito do metal prata. É comum identificar nas bases de dados que o nanocompósito estudado nesse trabalho possui nomenclatura óxido metálico/metal (SHARMA; JEEVANANDAM, 2013).

O óxido metálico escolhido neste trabalho como a semente da nanopartícula foi a magnetita. A magnetita é um óxido de ferro formado por íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na proporção 1:2 que pode ser representado pela forma molecular Fe_3O_4 . A nanopartícula magnetita pode ser sintetizada pela metodologia de coprecipitação, pois é um método de baixo custo e de fácil manuseio e o solvente de síntese é a água (KHALAFALLA; REIMERS, 1980).

O metal escolhido neste trabalho como parte do compósito foi a prata. As nanopartículas de prata (AgNPs), são estudadas há muito tempo e possuem diversas propriedades conhecidas na medicina, pois compostos a base de prata são considerados altamente tóxicos para os micro-organismos. A prata foi utilizada, pois ela é relativamente mais barata, não tóxica ao ser humano e possui uma variedade de aplicações antimicrobianas (CHEN; GAO; JIANG, 2013).

A síntese de nanocompósitos foi pensada para garantir estabilidade das nanopartículas e aumentar a eficiência do material, pois a prata apresenta alta toxicidade para micro-organismos e o óxido de ferro possui características magnéticas, permitindo estudos futuros explorando análises com uso de campo magnético alternado.

Considerando essas informações, as nanopartículas definidas como objeto de estudos são de prata (Ag), nanocompósito Fe_3O_4/Ag e óxido de ferro (Fe_3O_4), com objetivo de avaliar a atividade das nanopartículas na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Nanotecnologia e Nanomateriais

Segundo recomendação da Comissão de 18 de outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial (2011/696/UE) do jornal oficial da União Europeia:

Por nanomaterial, entende-se um material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50 % ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm. Em casos específicos e sempre que tal se justifique devido a preocupações ambientais e ligadas à saúde, segurança e competitividade, o limiar da distribuição número-tamanho de 50 % pode ser substituído por um limiar compreendido entre 1 e 50 % (COMISSÃO EUROPEIA, 2011).

Essas estruturas são objetos de estudos de diversas áreas da ciência, pois o ramo da nanotecnologia se encontra em constante desenvolvimento. Além disso, as propriedades de diversos nanomateriais ainda são desconhecidas, o que permite estudos em diversas áreas, tais como, alimentícia (PATIÑO VIDAL *et al.*, 2021), farmacêutica (GONG *et al.*, 2007), biotecnológica (FREIRE *et al.*, 2018), médico-hospitalar (DADFAR *et al.*, 2019), odontológica (MOTEVASSELIAN *et al.*, 2017).

O aumento de pesquisas na área da nanotecnologia possibilita desenvolvimento e inovação. A revolução tecnológica, em ritmo acelerado, promove uma competição tecnológica a nível mundial e um avanço econômico e social (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008). Os avanços atuais no desenvolvimento de nanomateriais com aplicações biomédicas abriram novas e empolgantes oportunidades na área da medicina.

Nos últimos anos a nanotecnologia mudou-se dos laboratórios para o mercado e existem diversos produtos utilizando nanotecnologia identificados pelo fabricante no mercado comercial. Além disso, existem diversas matérias primas e itens de equipamentos que são utilizados por nanofabricantes e isso é apenas o início do desenvolvimento e comercialização da nanotecnologia. Esse interesse em materiais nanotecnológicos, faz países desenvolvidos e em desenvolvimento buscarem o contínuo desenvolvimento de novos nanomateriais de baixo custo. A tendência é que sejam destinados altos investimentos nessa área da pesquisa. Os estudos e aplicações de nanomateriais impulsionam o mercado mundial e potencializam o consumo desses produtos (DAVIES; WILSON, 2007).

Apesar do alto investimento em nanotecnologia, é possível observar que a maior quantidade de material desenvolvido, se encontram no meio acadêmico de pesquisas sobre nanotecnologia. Mas a aplicação desses materiais já se encontra em produtos no mercado. O cenário mundial está com foco voltado ao desenvolvimento de nanomateriais no desenvolvimento científico e tecnológico com a utilização de poucos recursos (SANT'ANNA; ALENCAR; FERREIRA, 2013).

O desenvolvimento mundial de nanotecnologia aumentará consideravelmente devido ao interesse das grandes indústrias de utilização desses materiais com o objetivo de gerar lucro e economia para o mercado. O cenário mundial mostra que os maiores desenvolvedores no mercado mundial de nanotecnologia, são os Estados Unidos da América (EUA) com participação em 54% da produção global, União Europeia (UE) com 19% e o Sudeste Asiático com 19%. Contudo, apesar do Brasil não estar entre os primeiros em *rankings* mundiais de desenvolvimento em Nanociência e Nanotecnologia (N&N), ele investe e apresenta médio desenvolvimento nesse setor (SERGEEVICH GOLUBEV *et al.*, 2018; SISNANO DO MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2016).

2.2 Nanopartículas de óxido metálico

Os materiais nanoestruturados atraíram grande atenção devido às suas propriedades ópticas e elétricas, que os tornam potencialmente adequados para aplicações em eletrônica (FRANZOI *et al.*, 2011), óptica (ROGOV; MUGNIER; BONACINA, 2015), e sensores (DOS SANTOS; GRASSESCHI, 2020). É comum observar que estruturas de óxido metálico de ferro apresentam características magnéticas e geralmente utilizam o método de coprecipitação para síntese desses materiais.

É possível identificar óxidos metálicos com diversas morfologias, como: nanofios, nanobastões, nanotubos, nanoanéis e nanofitas. A síntese e investigação desses diferentes óxidos metálicos ajudam não apenas na compreensão dos fenômenos em sistemas nanométricos, mas também no desenvolvimento da nova geração de nanodispositivos. O mesmo acontece com as nanopartículas de óxido metálico, são estruturas com tamanho entre 1 e 100 nanômetros e possuem características que podem variar de acordo com esse tamanho (XU *et al.*, 2015).

Nanopartículas metálicas e de óxido metálico são amplamente utilizadas em trabalhos de diversas áreas de atuação. No trabalho de Daud *et al.* (2015) nanopartículas bimetálicas foram utilizadas para remoção de nitrato de água bruta de abastecimento de água potável, os resultados indicaram que as nanopartículas de Fe/Pt com grande área de superfície foram potencialmente mais eficientes que resinas aniônicas usadas comercialmente para remoção do nitrato de água bruta para abastecimento de água potável.

Nanocatalisadores de TiO₂ suportados em alumina recoberta com carbono (CCA) exibiram maior eficiência na fotodegradação geral sob luz ultravioleta e visível do que sem suporte de TiO₂. As nanopartículas de TiO₂ demonstraram capacidade de degradar completamente poluentes orgânicos em um meio aquoso resultando na formação de produtos e, portanto, tem um enorme potencial para ser usado em processos de tratamento de água (MAHLAMBI; NGILA; MAMBA, 2015).

Muitos trabalhos utilizando óxido de ferro avaliaram aplicações biomédicas, sejam em testes *in vitro*, pré-clínicos ou clínicos. Nanopartículas de óxido de ferro foram utilizadas em estudos pré-clínicos para configurações diagnósticas, terapêuticas e teranósticas (Terapia e diagnóstico juntos). É impossível identificar as amplas aplicabilidades das nanopartículas de óxido de ferro e a integração delas na prática médica (DADFAR *et al.*, 2019). Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas apresentam propriedades médicas e são promissoras na terapia oncológica (especialmente no cérebro, mama, próstata e tumores pancreáticos) (DULÍNSKA-LITEWKA *et al.*, 2019).

Nanopartículas de óxido de zinco e óxido de cobre foram usadas para testar respostas celulares desencadeadas por macrófagos. Os macrófagos são as primeiras células a interagir as duas nanopartículas de óxido metálico causando alteração na expressão de genes que modulam o fenótipo e as funções dos macrófagos, permitindo o uso das nanopartículas em imunoterapias contra o câncer, por exemplo. A revisão mostra vários estudos nessa linha de pesquisa e embora vários estudos tenham comprovado que nanopartículas de óxidos metálicos podem induzir imunotoxicidade em macrófagos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos precisos de toxicidade (GUTIÉRREZ-ARAUJO; VÁZQUEZ-DUHALT; JUÁREZ-MORENO, 2021).

Nanopartículas de óxido de zinco de tamanho menor apresentaram maior inibição de crescimento dos micro-organismos em teste que avaliou a atividade

antibacteriana de suspensões de nanopartículas de ZnO em micro-organismos e a influência do tamanho das nanopartículas nesses testes biológicos. O estudo testou três materiais de tamanho diferentes ($>1 \mu\text{m}$, 8 nm e 50-70 nm) em um ensaio de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, nos testes de partículas maiores ($>1 \mu\text{m}$, 50-70 nm) foram observadas taxa de redução de crescimento de 40-50 % e no teste do material menor (8 nm) a taxa de redução de crescimento foi de 95-99 % (JONES *et al.*, 2008).

2.2.1 Síntese e funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxidos metálicos podem ser sintetizadas utilizando métodos de coprecipitação e decomposição térmica. Essas sínteses possuem métodos experimentais específicos e podem apresentar resultados diferentes de tamanho e aplicação das nanopartículas.

Khalafalla, S. E.; Reimers (1980) sintetizaram fluido magnético de óxido de ferro utilizando o método de coprecipitação. A coprecipitação é um método simples, rápido e barato, que consiste na mistura de soluções aquosas de íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na proporção molar de 2:1 em uma solução básicas de $\text{pH} > 11$, resultando na formação de Fe_3O_4 NPs, esse método é feito utilizando agitação mecânica vigorosa.

Sun e Zeng (2002) sintetizaram as Fe_3O_4 NPs com tamanhos controlados por decomposição térmica. Nesse trabalho o tamanho das nanopartículas variou de 3 a 20 nm de diâmetro. Os autores demonstraram uma reação de decomposição do precursor de ferro em alta temperatura (265 °C) misturando acetilacetato de ferro (III) em éter fenil na presença de álcool, ácido oleico e oleilamina, a mistura foi aquecida com refluxo durante 30 min. Após resfriada à temperatura ambiente, a mistura marrom escura foi tratada com etanol ao ar e formação do precipitado. Essa síntese permitiu a formação de nanopartículas monodispersas de 4 nm.

Controlar essas interações entre nanopartículas e biosistemas é fundamental para seu uso efetivo em biomedicina. A funcionalização das nanopartículas pode melhorar a aplicação para uso na nanomedicina. Nanopartículas conjugadas de RNA-ouro foram sintetizadas para regular genes no contexto de interferência de RNA. Esses materiais conjugados são usados para aproveitar as propriedades cooperativas de ambos os materiais. A nanopartícula desenvolvida foi funcionalizada para que aumente o *knockdown* de genes (técnica da genética molecular em que um organismo

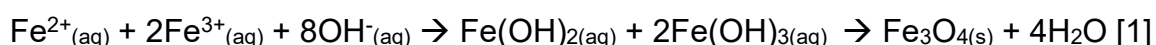
é geneticamente modificado mediante a inserção na célula de pequenos fragmentos ou oligonucleótidos curtos de DNA ou RNA), proporcionando melhorias em comparação com os transportadores lipídicos convencionais. Conforme relatado pelos autores, essas nanopartículas de RNA-ouro, além de serem materiais úteis de regulação de genes intracelulares, podem ser candidatos promissores para aplicações terapêuticas e diagnósticas (GILJOHANN *et al.*, 2009).

Nanopartículas de óxido de ferro (nominalmente magnetita) com diâmetro hidrodinâmico médio de 16 nm foram testadas na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Foi possível identificar a inibição bacteriana por nanopartículas de óxido de ferro e determinado a concentração mínima inibitória (CMI) nas colônias bacterianas PAO1. A aplicação do campo magnético aumenta a ação destas nanopartículas, provavelmente por meio da difusão aprimorada das Fe₃O₄ NPs através das barreiras de mucina e alginato, que são características de infecções respiratórias de fibrose cística (ARMIJO *et al.*, 2020).

2.2.1.1 Método de coprecipitação

O método de coprecipitação é o método mais simples utilizado na síntese de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) (equação 1).

Equação 1 – Reação de precipitação da magnetita (Fe₃O₄).



Esse método consiste na mistura de íons Fe³⁺ (férricos) e Fe²⁺ (ferrosos) na proporção molar de 2:1. Contudo, Khalafalla, S. E.; Reimers, (1980) sintetizam o fluido magnético utilizando a proporção 3:2 de Fe²⁺ e Fe³⁺, respectivamente. Utilizando a proporção ideal em meio aquoso a precipitação da magnetita é realizada utilizando soluções básicas como hidróxido de amônio ou hidróxido de sódio (GIESE, 2018). Após a formação da magnetita ela pode se transformar em maghemita (γ-Fe₂O₃) com a submissão do precipitado à tratamento térmico em altas temperaturas (200°C) por 1 h (DA COSTA; DE SOUZA, 2014).

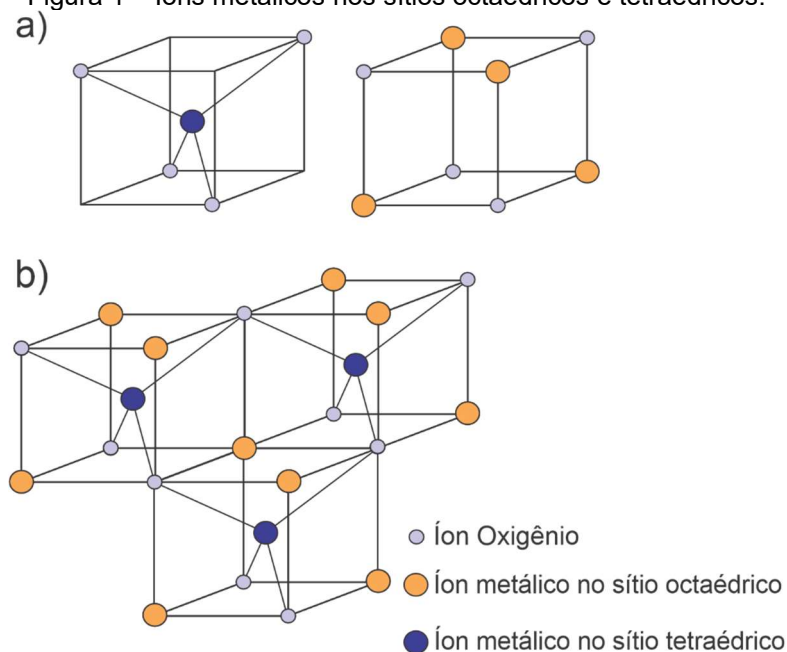
2.3 Magnetita

A magnetita tende a ser um sólido não-estequiométrico, mas essa característica se repete para outros óxidos de ferro, como, FeO e maghemita (Fe₂O₃).

Essa tendência à não-estequiometria está relacionada com a fácil mudança estrutural desses óxidos. Além disso, todos os óxidos de ferro possuem estrutura conhecida como espinélio invertido e formas cúbicas, com íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos interstícios octaédricos ou tetraédricos (Figura 1a) (DA COSTA *et al.*, 1995; MCCAMMON; LIU, 1984).

A magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) apresentam espinélio invertido devido ao empacotamento de íons de oxigênio em um arranjo cúbico de face centrada. Espinélios de ferro são representados pela equação geral $(\text{M}_x\text{Fe}_{1-x})_{\text{tetra}}[\text{M}_{1-x}\text{Fe}_{1+x}]_{\text{octa}}\text{Y}_4$, onde: M é um cátion divalente, Fe um cátion trivalente e Y pode ser os elementos O, S, Se, etc. Os espinélios são divididos em normais ($x=1$) em que $(\text{M})_{\text{tetra}}[\text{Fe}_2]_{\text{octa}}\text{O}_4$ e invertidos ($x=0$) em que $[\text{MFe}]_{\text{octa}}(\text{Fe})_{\text{tetra}}\text{O}_4$. Os íons metálicos de ferro ocupam sítios entre os íons de oxigênio, assim formando as geometrias tetraédricas e octaédricas (Figura 1b).

Figura 1 – Íons metálicos nos sítios octaédricos e tetraédricos.



Uma célula unitária da magnetita contém 8 íons metálicos de sítios A, 16 de sítios B e 32 oxigênios. A magnetita é um óxido de ferro misto com FeO e Fe_2O_3 e é muito usado para obtenção de ferro metálico. Observa-se na estrutura da magnetita íons O^{2-} de empacotamento cúbico, íons Fe^{2+} nos interstícios octaédricos, metade dos íons Fe^{3+} em sítios octaédricos e a outra metade em sítios tetraédricos (HANNICKEL, 2011).

A divisão dos sítios octaédricos e tetraédricos dos íons Fe^{3+} são consideradas igualmente proporcionais 50:50 e por isso possui um momento magnético resultante

nulo. Entretanto, os íons Fe^{2+} estão em maioria nos interstícios das posições octaédricas e são considerados os responsáveis pela magnetização do material. Vale ressaltar que a magnetização da magnetita só pode ser observada com a indução de um campo magnético externo (FARIA; LIMA, 2005).

A magnetita é uma nanopartícula a base de ferro que geralmente se encontra dispersa e estabilizada em solução. Assim, a magnetita pode formar um ferrofluido usualmente granular, de cor preta e fortemente magnético. Esse mineral apresenta solubilidade em ácido clorídrico e possui o elemento químico ferro nos dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} . Um ferrofluido possui características valiosas e é de grande importância científica, tecnológica e ambiental. É possível mencionar algumas aplicações do óxido de ferro em motores, lubrificantes de discos magnéticos, catalisadores, suporte catalítico de metais, núcleo de catalisadores tipo *core-shell*, entre outros (NOVAL; PUENTES; CARRIAZO, 2017; RAJ; MOSKOWITZ, 1990).

2.4 Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata têm atraído muita atenção de pesquisadores nas últimas décadas, levando a estudos em diversas áreas. É possível observar aplicações das nanopartículas de prata na medicina (KIM *et al.*, 2007), catálise (LU *et al.*, 2006), biotecnologia (GARCIA *et al.*, 2021) e bioengenharia (XIE *et al.*, 2019), óptica (WANG *et al.*, 2011), entre outras.

Contudo as nanopartículas de prata possuem como principal característica a capacidade antibacteriana e antifúngica, por isso é comum observar o uso dessas nanopartículas em produtos higiênicos e alimentares, como: desinfetantes, detergentes, sabonetes, xampus, pasta de dente, revestimento de geladeiras, armazenamento de alimentos, entre outras (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

O aumento de organismos microbianos resistentes a antibióticos levou ao ressurgimento do uso de antissépticos à base de prata. Investigações puderam ser feitas com nanopartículas de prata contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foi possível observar a inibição das bactérias *Escherichia coli* em baixas concentrações de nanopartículas de prata, mas os efeitos inibidores em *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações de nanopartículas de prata foram leves. Resultados como esse sugerem que as nanopartículas de prata podem ser inibidoras eficazes contra vários micro-organismos (KIM *et al.*, 2007).

A boa capacidade antibacteriana e antifúngica da prata está na relação entre quantidade de prata *versus* a taxa de íons Ag^+ liberada em contato com esses microorganismos. A prata se liga à parede celular bacteriana e à membrana celular, se ioniza e fica altamente reativa (DUNCAN, 2011).

As AgNPs são um novo tipo de agente antimicrobiano que pode tratar biofilmes e a resistência bacteriana, mas seu mecanismo na formação de biofilme ainda não foi elucidado. Em teste do impacto das AgNPs na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Os resultados demonstraram que as AgNPs inibiram a formação de *P. aeruginosa*. Após, a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que quando exposto a AgNPs, a estrutura do biofilme de *P. aeruginosa* foi destruída, juntamente com redução significativa de sua biomassa. Os resultados ofereceram uma nova visão para esclarecer o mecanismo de AgNPs contra biofilmes. Assim, metodologias de síntese de AgNPs são estudadas para aplicação destas nanopartículas (ZHANG *et al.*, 2020).

As nanopartículas de prata podem ser obtidas por métodos químicos. Existem métodos mais comuns e divulgados para a redução do íon prata Ag^+ para Ag^0 , usando agentes redutores como o NaBH_4 e citrato. Nos métodos contendo o citrato, ele costuma agir como agente redutor e estabilizador, atuando para evitar a aglomeração das nanopartículas (JORGE DE SOUZA; ROSA SOUZA; FRANCHI, 2019).

Quadro 1 – Levantamento de sínteses de nanopartículas de prata.

Reagentes	Solvente	Agente redutor / estabilizante	Proporção mol:mol	Referência
Nitrato de prata e Amônia ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$)	Água	Hidróxido de amônio e sacarídeos	1:10	(PANÁČEK <i>et al.</i> , 2006)
Nitrato de prata	Água	Boro-hidreto de sódio	1:2	(KIM <i>et al.</i> , 2007)
Nitrato de prata	Água	Citrato de sódio atua como as duas finalidades	1:7	(DONG <i>et al.</i> , 2009; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951)
Nitrato de prata	Água	Ácido ascórbico e citrato de sódio	1:3	(QIN <i>et al.</i> , 2010)
Nitrato de prata	Etanol	Etanol / PVP	1:1	(LEE; OH, 2015)
Sulfato de prata	Água	PVA atua como as duas finalidades	1:64	(LEE; MEISEL', 1982)
Nitrato de prata	Água	NaBH_4 / PVA	2,5:1	
Nitrato de prata	Água	Citrato de sódio	0,18:1%	

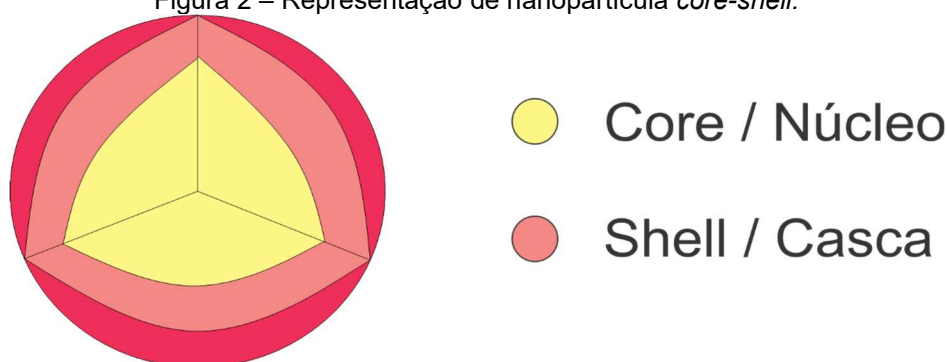
2.5 Nanopartículas de crescimento misto

As nanopartículas de crescimento misto são materiais compósitos, ou seja, formados pela união de materiais distintos em que estão presentes duas camadas ou diferentes materiais diretamente ligados. Esses materiais de crescimento misto tem o objetivo de obter um produto de maior qualidade em relação a nanopartículas únicas, unindo as principais características dos dois materiais (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014).

2.5.1 Nanopartículas do tipo *core-shell*

Nanopartículas *core-shell* são definidas como nanopartículas com um núcleo completamente coberto por uma camada, uma estrutura de superfície uniforme e bem definida. Nanoestruturas do tipo *core-shell* podem ser chamadas núcleo@casca e sua estrutura e representação pode ser observada na Figura 2. Sistemas *core-shell* baseiam-se em estruturas em que um material nanométrico é revestido por outro a fim de se obter um efeito sinérgico entre os constituintes. Por exemplo, recobrir uma nanopartícula magnética com o metal prata permite a atuação compartilhada entre o núcleo magnético e as propriedades antibacterianas da casca de prata para determinadas aplicações.

Figura 2 – Representação de nanopartícula *core-shell*.



Nanopartículas *core-shell* possuem diferentes atividades na área da medicina. Diversos testes, que serão citados posteriormente, com estudos *in vitro* e *in vivo* foram feitos utilizando essas nanopartículas.

Um estudo utilizando nanopartículas Ag@Au e nanopartículas de Au permitiu a avaliação da redução da glicemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os resultados revelaram que ratos diabéticos tratados com AuNPs ou Ag@AuNPs com doses de 0,5 mg kg⁻¹ de peso corporal em dispersão de NPs em água/dia, tiveram seu nível de glicose restaurado. Todos os grupos de ratos foram tratados por vinte e

um dias por via de administração oral por intubação gástrica. Em conclusão, observou-se que as NPs melhoram a condição diabética como uma cura terapêutica econômica em tratamento diabético e suas complicações (SHAHEEN *et al.*, 2016).

Nanopartículas *core-shell* com núcleo de sílica dopada com fulereno e casca de sílica dendrítica também foram utilizadas para estudos com intuito de inibir significativamente o crescimento de células cancerígenas (ABBARAJU *et al.*, 2017).

Em estudos de nanopartículas Fe₃O₄/Ag, foi identificada a síntese usando o método de micela reversa. Neste estudo foi possível identificar o efeito bactericida no que diz respeito a *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. coli*. Além disso, devido ao superparamagnetismo dessas nanopartículas, as nanopartículas puderam ser removidas facilmente de água após o efeito bactericida ter ocorrido e reutilizadas várias vezes no tratamento de água com as bactérias. Esses resultados indicaram que as nanopartículas de Fe₃O₄/Ag podem ter aplicação na desinfecção no tratamento de águas (GONG *et al.*, 2007).

Nanopartículas *core-shell* de Fe₃O₄-aminosilano funcionalizadas com peptídeo antimicrobiano clavanina A (clavA) foram utilizadas para estudo na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Foi modificada a tubulação de cateteres venoso central (CVC) com as nanopartículas para estes testes e os resultados mostraram diminuição da adesão da bactéria em até 70-90% quando comparados ao CVC de controle. Além disso, quando o tratamento térmico é acionado por 5 min a 80°C em uma tubulação que já apresenta biofilme bacteriano (CVC-BF), a viabilidade das bactérias aderidas reduz em até 88%, mas ainda foi observado bactérias remanescentes que poderiam ser tratadas testando materiais com maior resistência térmica. Os resultados obtidos são muito semelhantes aos dos cateteres comerciais impregnados com antibiótico e prata (RIBEIRO *et al.*, 2018).

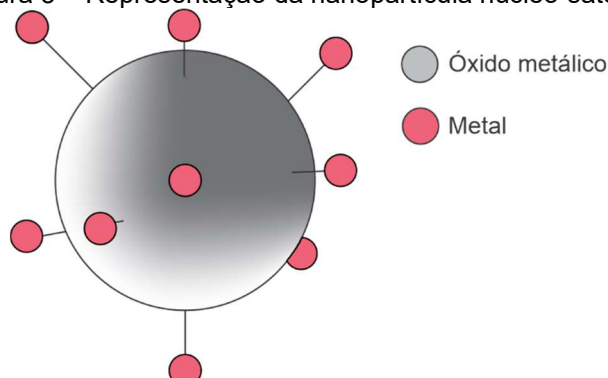
Nanopartículas *core-shell* de Y₂O₃:Tb@SiO₂ foram utilizadas para estudo na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) em ensaio de microplaca com biofilmes cultivados por 24 h, coradas com cristal violeta e quantificadas medindo a absorbância a 470 nm. Uma diminuição dependente da concentração (14-60%) foi registrada na capacidade de formação de biofilme do PAO1, após o tratamento com a *core-shell*. As nanopartículas *core-shell* apresentam potencial inibitório na formação de biofilme que podem ser explorados para tratar infecções resistentes a drogas de *P. aeruginosa* no futuro (HUSAIN *et al.*, 2019).

Barrientos, Iparraguirre e Cavero (2019) sintetizaram nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ para estudo de suas propriedades antibacterianas contra as bactérias *Enterobacter aerogenes* (Gram-negativas) e *Enterococcus faecalis* (Gram-positivas). As nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas pelo método sol-gel e a redução das nanopartículas de prata foi realizada por meio de redução química *in situ* com glicose. As nanopartículas *core-shell* apresentaram diâmetro médio de 28 nm. O teste antibacteriano indicou que o uso do nanocompósito $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ na concentração de 5 mg mL^{-1} permite a inibição total do crescimento das bactérias *Enterobacter aerogenes* e *Enterococcus faecalis* estudadas a partir de uma concentração inicial de 108 bactérias mL^{-1} em um tratamento de 50 min e incubação a 37 °C.

2.5.2 Nanopartículas do tipo núcleo-satélite

As nanopartículas núcleo-satélite possuem um núcleo recoberto de forma irregular (Figura 3) (WENG *et al.*, 2013).

Figura 3 – Representação da nanopartícula núcleo-satélite.



Lee *et al.* (2006) desenvolveram uma nanopartícula do tipo núcleo-satélite, composta por um núcleo de sílica dopado com corantes e múltiplos satélites de nanopartículas de óxido de ferro. O objetivo foi desenvolver uma nova geração de nanossondas fundindo vários corantes fluorescentes e múltiplas nanopartículas magnéticas em uma única nanossonda. Essa nanossonda teria como objetivo ser capaz de fornecer recursos superiores de fluorescência, imagens de ressonância magnética e excelentes sondas de imagem dupla para a detecção de PSAs.

Chen e Wang (2018) desenvolveram uma técnica de injeção sequencial para sintetizar nanopartículas núcleo-satélite de $\text{NaYbF}_4@\text{CaF}_2$, para construir um biossensor revestiram nanofolhas de MnO_2 em nanopartículas de núcleo $\alpha\text{-NaYbF}_4:\text{Tm}@\text{CaF}_2$ para aumentar a sensibilidade de detecção de biotiol.

Comparando com nanopartículas *core-shell*, as nanopartículas núcleo-satélite apresentam maiores proporções de superfície, ou seja, maior volume. Elas foram adequadas para outras modificações de superfície.

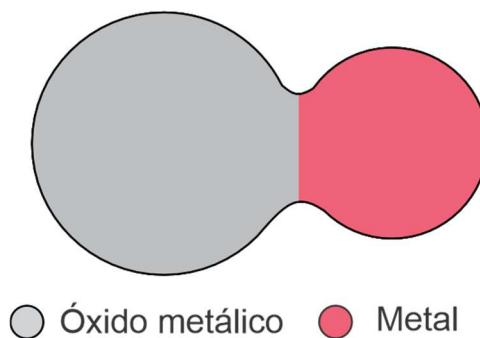
Nanopartículas de ouro e prata em estruturas núcleo-satélite assimétricas do tipo Janus (nanopartícula simples composta por duas faces) foram sintetizadas para melhorar e controlar as propriedades plasmônicas de nanomontagens. O método de montagem tem base na eficiência de dessorção marcadamente diferente de nanopartículas, dependendo do tamanho e do solvente. Esse método apresentado é extensível à preparação de nanomontagens núcleo-satélite composicionalmente heterogêneas (YOON; LIM; YOON, 2012).

Nanopartículas do tipo núcleo-satélite funcionalizadas com ácido borônico foram sintetizadas para enriquecimento avançado de glicopeptídeos e glicoproteínas. Este novo material híbrido é composto por um núcleo de ferrita revestido de sílica com propriedades superparamagnéticas, e numerosos satélites de nanopartículas de ouro, compostas com muitas âncoras de ácido 3-aminofenilborônico, projetadas para capturar moléculas alvo, pois foram altamente específicas para espécies glicosiladas. Além disso, as novas nanopartículas compostas foram aplicadas para enriquecer proteínas glicosiladas de tecidos de câncer colorretal humano para identificação de sítios de N-glicosilação (ZHANG *et al.*, 2009).

2.5.3 Nanopartículas do tipo heterodímero

Nanopartículas do tipo heterodímero diferem das nanopartículas *core-shell* e núcleo-satélite devido a mesma não possuir o recobrimento do núcleo por completo, em uma partícula do tipo heterodímero as nanopartículas de óxido metálico se encontram diretamente ligada a superfície de um metal (Figura 4). Essa estrutura apresenta a superfície com duas nanopartículas de composição química diferente.

Figura 4 – Representação da nanopartícula heterodímero.



Em estudo teórico da resposta óptica bioestável de nanopartículas do tipo heterodímero, composto por um ponto quântico semiconductor com espaçamento próximo e uma nanopartícula metálica, mostra que a natureza bioestável da resposta resulta da interação entre a não linearidade óptica do ponto quântico e sua auto ação originada da presença da nanopartícula metálica. As condições para que ocorra a bioestabilidade podem ser realizadas, por exemplo, para um heterodímero composto por um ponto quântico de CdSe (ou CdSe/ZnSe) estreitamente espaçadas e uma nanoesfera de ouro (NUGROHO *et al.*, 2013).

Nanoestrelas de PbS-Au do tipo heterodímero obtidas da reação com ácido oxálico, concentração e temperaturas ótimas de Brometo de Cetrimônio (CTAB) para deposição seletiva de ouro nas nanoestrelas. Elas são candidatas promissoras para os blocos de construção em nanoescala e possuem aspectos que precisam ser estudados (ZHAO *et al.*, 2010).

Shams, Ghazanfari e Schmitz-Antoniak (2019) fizeram uma revisão descrevendo brevemente os aspectos menos conhecidos dos heterodímeros, incluindo composição eletrônica, morfologia interfacial e propriedades críticas. Foram apresentados exemplos concretos de progressos recentes em síntese e aplicações biomédicas, por exemplo, diagnósticos e tratamentos biomédicos emergentes. O principal benefício dos heterodímeros é o ganho sinérgico de propriedades magnéticas e plasmônicas em estruturas únicas com desempenho principalmente aprimorado quando comparado a componentes individuais.

Wu *et al.* (2021) realizaram uma revisão dos aspectos menos conhecidos dos heterodímeros e apresentaram exemplos de progressos em síntese e aplicações. As propriedades das nanopartículas heterodímeros é de um material versátil que pode ser usado em imagem intracelular, como agente antibacteriano, macromolécula fotocatalítica e biológica, por exemplo. Além disso, a cooperação interdisciplinar entre

disciplinas como química, ciência dos materiais, física, biologia e medicina fornecem às nanopartículas heterodímeros mais opções para modificação e aplicação.

2.6 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

O teste de letalidade com *Artemia salina* foi proposto em 1956, por Michael, Thompson e Abramovitz e aprimorado em 1981 por Vanhaeche e colaboradores. No entanto, seu reconhecimento como teste preliminar para validação toxicológica veio com Meyer em 1982, quando avaliou a toxicidade de extratos brutos de plantas da família *Euphorbiaceae* (LHULLIER; ANTUNES HORTA; FALKENBERG, 2006; PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

Artemia salina é um pequeno invertebrado halofílico pertencente à classe Crustáceo e subclasse Braquiopoda, que vive em água salgada e desempenha papel importante nos ecossistemas aquáticos e marinhos. Seu ciclo de vida compreende os estágios de cisto, náuplios, metanáuplios, pré-adultos e adultos. A *Artemia salina* é muito valorizada por sua aplicação na detecção de toxicidade usando náuplios eclodidos (ensaio de letalidade). O ensaio de letalidade com *Artemia salina* é rápido, conveniente e de baixo custo, por isso é amplamente empregado em pesquisa e toxicologia aplicada (NTUNGWE N *et al.*, 2020).

O teste de letalidade com *Artemia salina* tem um bom relacionamento com outros ensaios laboratoriais. Araújo *et al.* (2011) estudou a toxicidade geral e antitumoral *in vivo* contra Sarcoma 180 de *Crataeva tapia* Bark Lectina (CrataBL). Neste estudo, o teste de toxicidade geral de CrataBL exibiu mortalidade por *A. salina* com CL₅₀ de 71,73 µg mL⁻¹. Enquanto no teste antitumoral *in vivo*, o tratamento de camundongos albinos *Swiss* com CrataBL, a concentração 20 mg kg⁻¹ reduziu significativamente ($p < 0,05$) o volume do Sarcoma 180 em relação ao volume do tumor do grupo controle. Assim, os resultados reforçaram a boa correlação entre esses dois ensaios.

2.7 Atividades biológicas dos nanomateriais

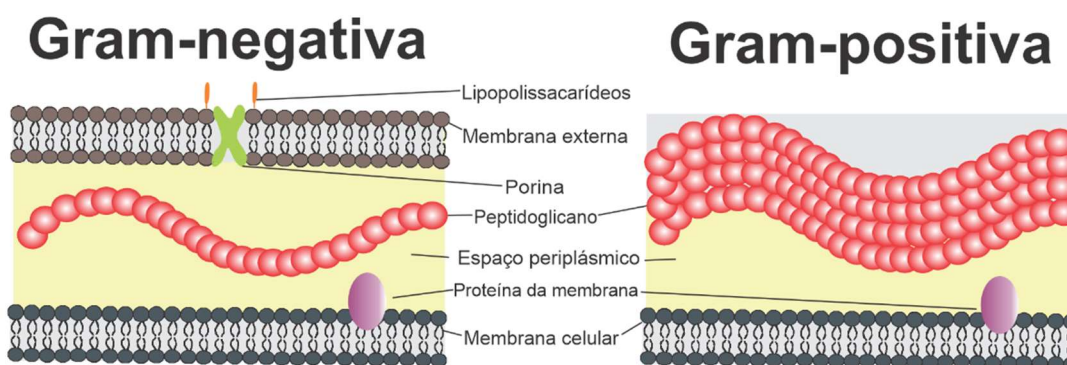
Nanomateriais são capazes de permitir atividade nas áreas médica e farmacêutica, que levam ao desenvolvimento de compostos antimicrobianos voltados

a criação de antibióticos para tratamento de infecções causadas por diversas bactérias.

Bactérias têm estruturas de parede celular diferentes que permitem uma classificação geral como Gram-negativas e Gram-positivas. As diferenças estruturais dessas classificações estão no peptidoglicano, pois as bactérias Gram-positivas exibem uma espessa camada de peptidoglicano e não possuem membrana externa, enquanto as bactérias Gram-negativas exibem uma camada fina de peptidoglicano entre a membrana citoplasmática e a membrana externa (Figura 5) (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015; SHOCKMAN; BARREN, 1983).

A nanotecnologia voltada à área da saúde permite o desenvolvimento e caracterização de nanomateriais a serem utilizados em vários âmbitos da medicina e odontologia, como, por exemplo no desenvolvimento de materiais para tratamentos de contaminantes microbianos causadas por bactérias (BAYGIN *et al.*, 2017).

Figura 5 – Representação das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

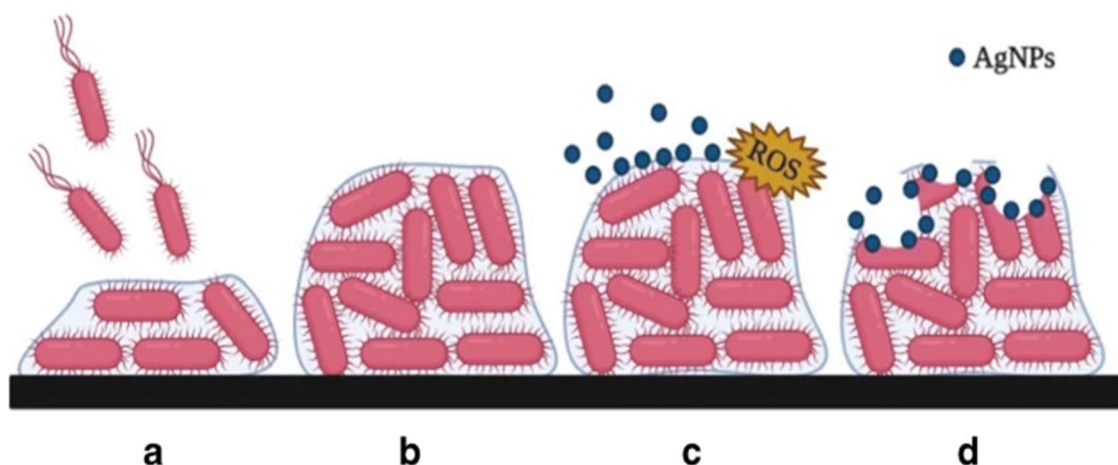


Nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extrato metanólico da bactéria *Spirulina platensis*. As caracterizações de potencial zeta e MET mostraram nanopartículas estáveis (-43,6 mV) esféricas e dispersas com tamanho médio de 29 nm. O potencial de inibição da formação de biofilme das AgNPs (10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi testado contra *Pseudomonas aeruginosa* (Pa14) mostrou um máximo de 85,63 % de inibição da formação de biofilme a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O potencial de AgNPs em inibir a formação inicial de biofilme afirma a potencial aplicação de AgNPs como material de revestimento no futuro (LEWISOSCAR *et al.*, 2021).

Coriolano *et al.* (2021) realizaram uma revisão de literatura relacionada a atividade antibiofilme de nanopartículas de prata contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sensível a antibióticos e multirresistente. O tamanho das AgNPs é um elemento crucial para determinar a atividade terapêutica das nanopartículas, uma vez que partículas menores apresentam maior área de superfície de contato com o micro-

organismo, afetando seu funcionamento vital. O estudo mostra atividade antibiofilme ocasionada pela ruptura da estrutura do biofilme e estresse oxidativo. Conforme observado na Figura 6, As AgNPs agem em 4 etapas, (A) Fixação de células para formar biofilme; (B) Biofilme maduro; (C) AgNPs se ligam à matriz exopolissacarídica do biofilme e causam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); (D) rompimento do biofilme inibindo o crescimento do biofilme em concentrações entre 1 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNPs.

Figura 6 – Representação do mecanismo de destruição do biofilme.



Fonte: Coriolano *et al.* (2021).

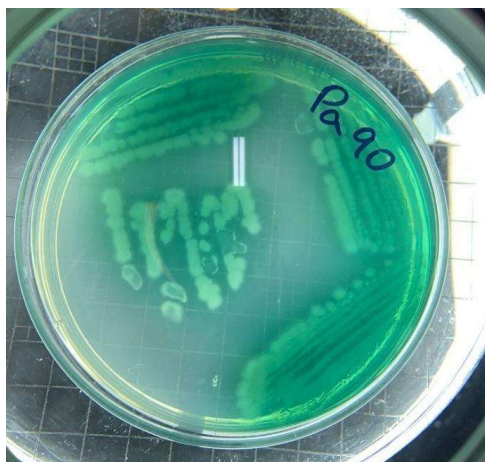
Armijo *et al.* (2020) testaram a atividade antibacteriana de Fe_3O_4 NPs (nominalmente magnetita) e nanocompósito de nitreto de ferro e tobramicina contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). A suscetibilidade e a concentração mínima inibitória (CMI) das NPs foram determinadas nas colônias bacterianas PAO1 usando método de difusão em disco. A CMI de todos os compostos de interesse foi determinada após 60 dias de crescimento, para garantir o estabelecimento completo de colônias de biofilme. Os resultados mostram que o nanocompósito tem o potencial de superar a barreira do biofilme bacteriano. Além disso, a aplicação do campo magnético aumenta a ação, provavelmente por meio da difusão aprimorada das Fe_3O_4 NPs. Esses resultados mostram que Fe_3O_4 NPs são alternativas promissoras de baixo custo para revestimentos de AgNPs.

2.7.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (Figura 7) pertence à família *Pseudomonadaceae*, é um patógeno Gram-negativo, não fermentador e aeróbio. A *P. aeruginosa* é

considerada de maior relevância epidemiológica entre as espécies de *Pseudomonas*, ela está associada a infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BAHMANI *et al.*, 2016; BERNAL-ROSAS; OSORIO-MUÑOZ; TORRES-GARCÍA, 2015; JUAN; PEÑA; OLIVER, 2017; RIVAS *et al.*, 2015; ROSHANI-ASL *et al.*, 2018; STREETER; KATOULI, 2016).

Figura 7 - Aspecto macroscópico do cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 9027 em ágar cetrimide.



P. aeruginosa multiplica-se facilmente em diversos meios de cultivo, dos quais mais relatados na literatura, ágar sangue, ágar MacConkey e ágar cetrimide. Esse micro-organismo desenvolve colônias grandes, redondas, lisas e acinzentadas com odor típico de uva, com capacidade fluorescente de branco a azul-esverdeado na presença de luz ultravioleta de longo comprimento de onda (400 nm) (PROCOP *et al.*, 2017; WAGNER *et al.*, 2016).

A *P. aeruginosa* é uma causadora de infecções e é uma ameaça a saúde, pois possuem necessidade nutricional mínima para o seu crescimento, tolerância de vida a ambiente hostil e a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos (GALES *et al.*, 2001; GONÇALVES, 2015; GUEVARA; SAHAJ; TEDESCO-MAIULLARI, 2015; HORCAJADA *et al.*, 2019).

As infecções causadas por esse patógeno ocorrem de forma súbita, rápida e dura pouco. Em pacientes gravemente doentes, a *P. aeruginosa* contribui com 3% a 15% das infecções da corrente sanguínea, com taxa de mortalidade de 27% a 48%, além disso, mais de 50% das mortes acontecem em poucos dias após a infecção. Ela ocorre de forma aguda devido à produção de toxinas, cronicamente devido à formação de um biofilme espesso, ou podem ocorrer com ambas as formas, que combinadas podem causar septicemia (infecção generalizada). Novas abordagens são necessárias para diminuir a mortalidade de pacientes que têm infecções por *P.*

aeruginosa, pois apesar de extensa pesquisa neste campo, nenhum método eficaz de tratamento universal para a infecção por *P. aeruginosa* foi descoberto devido à alta adaptabilidade e desta espécie (ARMIJO *et al.*, 2020; PRAGASAM *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2016).

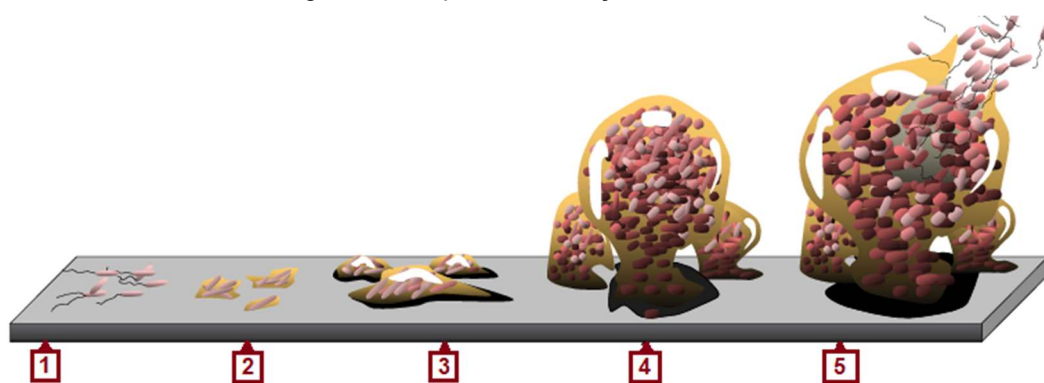
2.7.2 Formação de biofilme

A capacidade de formar um biofilme é uma característica comum de uma variedade de micro-organismos. A *P. aeruginosa* é um importante patógeno e organismo modelo representativo para estudo de biofilme. O biofilme é uma espécie de película protetora formada por uma comunidade estruturada de micro-organismos. O processo de formação de biofilme começa com a adesão inicial irreversível das células bacterianas a uma superfície específica (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; HA; O'TOOLE, 2015; KIM; LEE, 2016; TAYLOR; YEUNG; HANCOCK, 2014).

O sistema de modulação gênica e de proteínas de *P. aeruginosa* permite que as camadas celulares do biofilme se adaptem rapidamente às condições ambientais adversas. Isto pode envolver a bomba de efluxo a múltiplas drogas, que consiste no bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, produzindo resistência bacteriana a determinados antimicrobianos (WANG *et al.*, 2018).

A formação de biofilme ocorre com o agrupamento das bactérias e seu processo de formação ocorre em 5 estágios (Figura 8). (1) Anexo inicial de células isoladas ou aglomerados de bactérias de biofilme; (2) Produção de substância polimérica extracelular para aderir mais firmemente as células a superfície; (3) Desenvolvimento e expansão do biofilme; (4) Biofilme maduro quando o biofilme está em (pseudo) estado estacionário; (5) Dispersão de células únicas. O próximo estágio é o declínio do biofilme e é chamada de fase da morte (KONING, 2010; MONROE, 2007; STOODLEY *et al.*, 2002, 2013).

Figura 8 - Etapas da formação de biofilme.



Fonte: Adaptado de Monroe (2007), Image credit: D. Davis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de nanopartículas de prata, compósito Fe₃O₄/Ag e óxido de ferro na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar a nanopartícula de óxido de ferro (Fe₃O₄) pelo método de coprecipitação;
2. Sintetizar as nanopartículas de prata (Ag);
3. Sintetizar os compósitos Fe₃O₄/Ag a partir das nanopartículas de óxido de ferro e nitrato de prata;
4. Caracterizar as nanopartículas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectroscopia de absorção atômica, espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis), difração de elétron de área selecionada (SAED);
5. Avaliar a toxicidade das nanopartículas pelo método de letalidade de *Artemia salina*.
6. Estudar o impacto das nanopartículas na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese e funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro

A síntese foi realizada pelo método de coprecipitação segundo metodologia descrita por Khalafalla e Reimers (1980) de preparação de fluidos magnéticos aquosos. Em um béquer de 600 mL, 6 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 12 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada, em seguida foram adicionados 25 mL de NH_4OH 30% rapidamente com agitação mecânica de 600 rpm. O béquer contendo o precipitado resultante foi separado por decantação magnética utilizando um ímã permanente de neodímio até as NPs obtidas serem decantadas. O precipitado foi inicialmente lavado com 100 mL de uma solução de NH_4OH 5% (v/v). Posteriormente, o precipitado foi lavado com água destilada e separado por decantação magnética, essa etapa do procedimento foi repetida dez vezes. Por fim, foi adicionado 100 mL de água e a mistura foi armazenada em frasco com identificação na geladeira (KHALAFALLA; REIMERS, 1980).

O pH e condutividade da amostra foram inicialmente medidos. Depois, 5 g de ácido cítrico foram dissolvidos em 30 mL de água. Em um béquer de 50 mL as nanopartículas foram aquecidas a 60 °C em agitação mecânica de 250 rpm. Em seguida, adicionou-se lentamente a solução de ácido cítrico até atingir o pH de 2,5 a 3,5. Com o auxílio de um ímã permanente de neodímio, a dispersão foi lavada duas vezes com água deionizada. Após, adicionou-se 150 mL de água e adicionou-se gota a gota de amônia concentrada para atingir o pH 7. As nanopartículas ficaram dispersas na solução e armazenadas na geladeira. As nanopartículas funcionalizadas foram filtradas em filtro para seringa de membrana 250 nm.

4.2 Síntese de nanopartículas de prata

Em um béquer de 400 mL foram pipetados 3 mL de AgNO_3 0,016 mol L^{-1} e completou-se o volume com água para 200 mL. Em seguida adicionou-se 5 mL de citrato de sódio 0,0054 mol L^{-1} , iniciou a agitação magnética e zerou-se o cronômetro. No tempo de 15 min, adicionou-se de uma vez 8 mL de solução boro-hidreto de sódio (NaBH_4) 0,04 mol L^{-1} que estava armazenado na geladeira. No tempo de 20 min a agitação magnética foi interrompida e a mistura reacional foi mantida destampada no

escuro por 2 h. Todo o procedimento foi realizado em uma caixa escura e a solução foi armazenada em frasco âmbar coberto de papel alumínio (KERESSELIDZE *et al.*, 2012).

4.3 Síntese do nanocompósito Fe₃O₄/Ag

Inicialmente, a amostra de Fe₃O₄ NPs foi colocada no sonicador de ponteira por 20 minutos a 40 % de potência. Em um béquer, foi adicionado 400 µL de nanopartículas Fe₃O₄ e adicionou-se 20 mL de água deionizada, em seguida no sonicador de ponteira adicionou-se gotejando 100 mL de solução de AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹. Ainda no sonicador de ponteira, adicionou-se 500 µL de boro-hidreto de sódio 1 % (m/v), a mistura ficou no sonicador de ponteira por 20 minutos a 40 % de potência. Em seguida, com agitação mecânica de 950 rpm a mistura foi mantida em aquecimento de 80 °C por 2 horas. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes com água deionizada utilizando decantação magnética. Por fim, adicionou-se 200 mL de água deionizada e as nanopartículas ficaram dispersas em água e armazenadas na geladeira (adaptado de LIU *et al.*, 2008).

Observações da síntese: Com a finalidade de manter as partículas dispersas no coloide foi realizado a funcionalização das nanopartículas de óxido metálico e toda a etapa inicial da síntese foi realizada com auxílio do ultrassom, pois análises de microscopia eletrônica de transmissão feitas em testes anteriores da síntese mostraram muita agregação nas nanopartículas Fe₃O₄/Ag, o que impossibilitava observar de forma efetiva as imagens microscópicas. As etapas finais da síntese foram realizadas em agitação vigorosa constante com auxílio de agitador mecânico a 950 rpm.

4.4 Potencial Zeta e Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para análise foram medidos 100 µL de cada amostra de nanopartículas (óxido de ferro, Fe₃O₄/Ag e Ag) e adicionados 900 µL de água deionizada gota a gota na tentativa de evitar a agregação da amostra. Após, a amostra foi levada para o ultrassom por 5 minutos. Aproximadamente 1 mL dessas suspensões diluídas foram transferidas para a célula em forma de U de poliestireno Malvern do potencial zeta, em seguida procedeu-se a estabilização de temperatura a 25 °C e cada uma das

medições foram realizadas utilizando-se o aparelho Malvern ZetaSizer, modelo Nano-ZS90 da Central de Análise Multiusuário (CAM) da UFG.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o equipamento da marca Jeol, modelo JEM-2100, equipado com detector de energia dispersiva de raios (EDS), também foi realizado o SAED das amostras. Para análise, as amostras já dispersas em água foram gotejadas em grade de cobre e recobertas com filme de carbono. As análises de microscopia das amostras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LABMIC) da Universidade Federal de Goiás (UFG) - Campus Samambaia.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) fornece imagens microscópicas que permitem análises em *softwares* de análises de imagens como o *ImageJ*. A análise do *ImageJ* é baseada em *software* que faz medidas dos diâmetros das nanopartículas nas micrografias obtidas na análise MET. Os resultados obtidos em análise de *software ImageJ* são fundamentalmente diferentes dos resultados obtidos na análise de DLS. O DLS é uma técnica baseada nas flutuações de intensidade da luz espalhadas na amostra e fornece informações sobre o movimento da partícula, movimento que é a causa das flutuações da intensidade.

4.6 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) determina as frequências vibracionais de grupos funcionais presentes nas amostras. Os espectros foram adquiridos pela técnica de absorção no infravermelho, em equipamento Perkin-Elmer modelo Spectrum Frontier FT-IR/NIR (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) do Centro de Análises, Inovação e Tecnologia da UEG (CAITEC) do Campus Central de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás (CCET-UEG). As amostras das nanopartículas foram analisadas líquidas utilizando Reflectância Total Atenuada (ATR). Cada amostra foi colocada separadamente no ATR Crystal e efetuada as leituras no intervalo espectral de $700 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 4 cm^{-1} , feixe único e acumulações de 128 varreduras.

4.7 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis).

Os espectros foram adquiridos pela técnica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis), em equipamento Perkin Elmer Lambda 35 UV-Visible Spectrometer do Centro de Análises, Inovação e Tecnologia da UEG (CAITEC) do Campus Central de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás (CCET-UEG). Foram separadas uma alíquota de 2 mL das amostras de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ e prata (Ag) que foram analisadas no espectrofotômetro UV-vis.

4.8 Espectroscopia de absorção atômica

A análise de cada amostra foi feita em triplicata. Para análise foram medidos 100 μL de cada amostra de nanopartículas (óxido de ferro, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ e Ag) e adicionados 900 μL de ácido nítrico. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água deionizada e colocou-se as amostras em aquecimento por 30 min, posteriormente as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL. Aproximadamente 1 mL dessas suspensões diluídas foram utilizadas para leitura do aparelho de absorção atômica, utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica *AAnalyst 400* da *Perkin Elmer* da Central de Análise Multiusuário (CAM) da UFG.

4.9 Bioensaios

4.9.1 Ensaio de letalidade com *Artemia salina*

Foi utilizado o método descrito por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006) com pequenas modificações para determinar a toxicidade dos compostos pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*. A água marinha artificial (AMA) foi preparada com a dissolução de sal marinho (36 g L^{-1}) e extrato de levedura (6 g L^{-1}) em água destilada. A solução foi autoclavada e o pH medido foi 8,5, como esperado. Se porventura o pH estiver abaixo do ideal, deve ser ajustado utilizando solução de 1M de Na_2CO_3 . 0,3 g de cistos de *Artemia salina* foram incubados em 500 mL de AMA por um período de

4.9.2 Ensaio para a formação de biofilme

4.9.2.1 Obtenção e manutenção das bactérias

Um total de 13 cepas de *P. aeruginosa* foram testadas, 11 isolados clínicos gentilmente cedidos pela profa. Lillian Carneiro do Instituto de Patologia e Saúde Tropical da Universidade Federal de Goiás, IPTSP/UFG (Pa3, Pa5, Pa6, Pa10, Pa11, Pa13, Pa20, Pa22, Pa23, Pa28 e Pa29) e duas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pa85) e ATCC 9027 (Pa90) da coleção do Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

A manutenção dos micro-organismos foi realizada conforme metodologia descrita por Silva, Costa e Reche (2008). Para obter colônias isoladas, as cepas foram repicadas em ágar cetrimide pela técnica de esgotamento por estrias e incubadas a 35,5 °C por 24 horas. Em seguida, 3 a 5 colônias isoladas típicas foram transferidas para um tubo com 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20 % de glicerol e homogeneizadas em agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos. Após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35,5 °C. Em seguida, foram transferidas frações de 1 mL para tubos de *Eppendorf* esterilizados e devidamente rotulados. Posteriormente as frações foram armazenadas a 8 °C por sete dias e congeladas em freezer a -20 °C.

4.9.2.2 Ensaio de formação de biofilme por *P. aeruginosa*

Com algumas modificações, o ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Stepanovic *et al.* (2000). Na primeira etapa, preparou-se os inóculos bacterianos com a suspensão de 3 a 5 colônias em tubo com 4,5 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9 %) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foram transferidos 100 µL do inóculo para tubo com 9,9 mL de caldo TSB (*trypticase soy broth*), obtendo-se assim a concentração de células de $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL⁻¹.

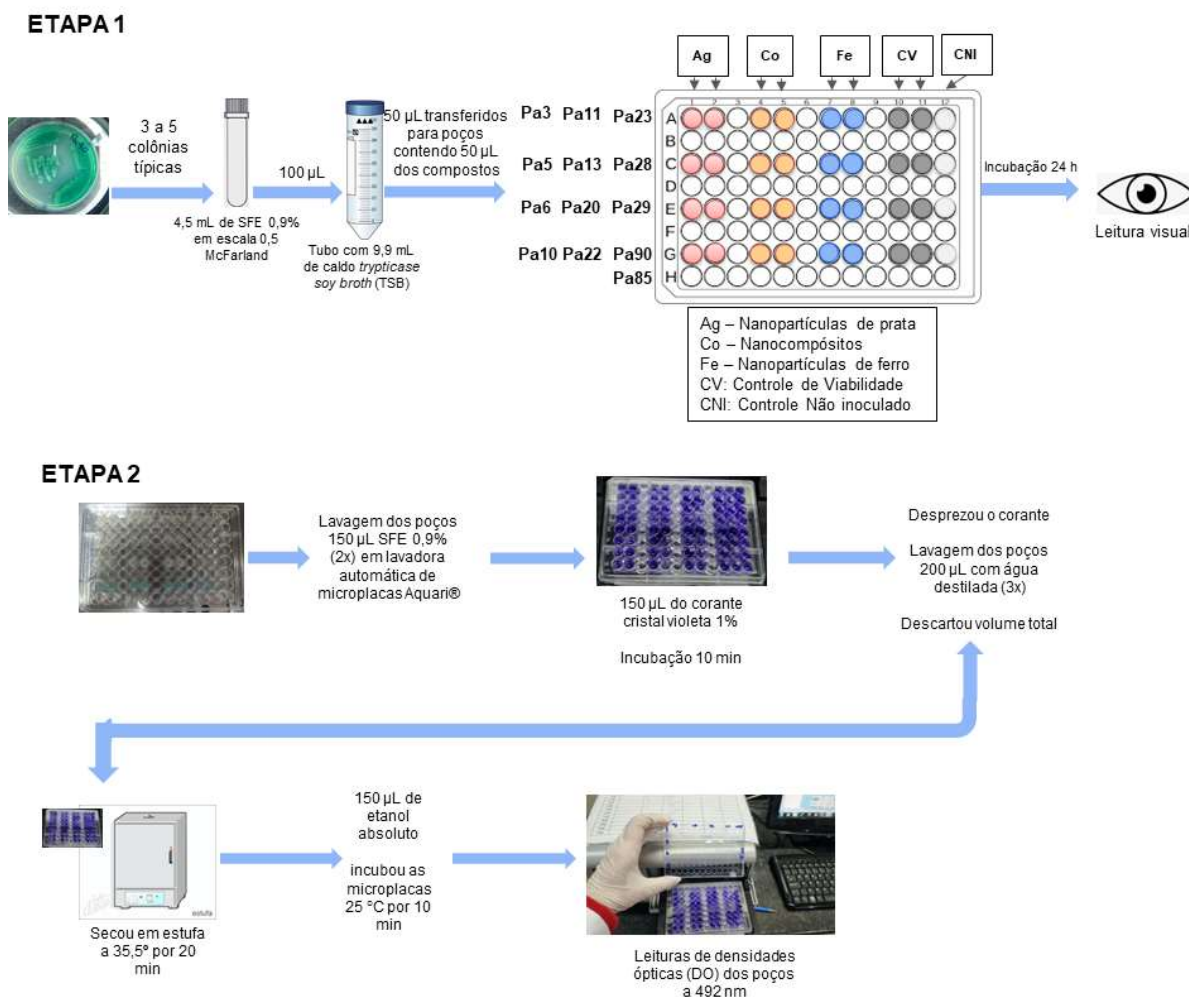
Após, foram transferidos 50 µL desse caldo para os poços da microplaca de poliestireno de 96 poços contendo as nanopartículas de prata e óxido de ferro nas concentrações iniciais de 2,0 e 0,516 µg mL⁻¹, respectivamente. O nanocompósito foi adicionado na concentração 2,0 e 0,516 µg mL⁻¹ referente à concentração de prata e

ferro na amostra, respectivamente (essas concentrações foram reduzidas pela metade ao adicionar o inóculo). Após a incubação das microplacas a 35,5 °C durante 24 horas, foi realizada a leitura visual para confirmar o não crescimento em poço controle.

Na segunda etapa, realizou-se a lavagem do meio TSB 2 vezes com 150 µL de SFE em lavadora automática de microplacas Aquari® (MA 615, Brasil) para a remoção das células não aderidas. Adicionou-se 150 µL do corante cristal violeta 1% por 10 min. Desprezou-se o corante, lavou-se os poços 3 vezes com 200 µL de água destilada e descartou o volume total. Por fim, as microplacas foram secas em estufa a 35,5° por 20 min, adicionou-se 150 µL de etanol absoluto em cada poço para coloração das bactérias aderidas, incubou as microplacas em temperatura ambiente por 10 min e realizou as leituras de densidades ópticas (DO) dos poços a 492 nm no espectrofotômetro de microplacas BioTech Epoch™.

Todos os testes foram realizados em triplicata. O experimento do ensaio de determinação da concentração mínima inibitória está representado no Esquema 3 a seguir.

Esquema 3 - Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI).



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Baseado no trabalho de Stepanovic *et al.* (2000) as leituras de densidades ópticas (DO) obtidas das placas com biofilme foram classificadas em quatro categorias, sendo elas: formador forte (FF), formador moderado (FM), formador débil (FD) e não formadora (NF). As formulações para a determinação da densidade óptica foram feitas utilizando as seguintes fórmulas:

$$NF = DO_{BA} \leq DO_{PCNI}$$

$$FD = DO_{BA} > DO_{PCNI} \leq 2x DO_{PCNI}$$

$$FM = DO_{BA} > 2x DO_{PCNI} \leq 4x DO_{PCNI}$$

$$FF = DO_{BA} > 4x DO_{PCNI}$$

Sendo que DO_{PCNI} = densidade óptica do poço controle não inoculado e DO_{BA} = densidade óptica da bactéria aderida.

O impacto de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), Fe_3O_4/Ag e prata (Ag) na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* foi avaliado com a comparação

dos resultados dos testes de formação do biofilme na presença e na ausência das nanopartículas. Para a análise dos resultados da formação do biofilme na presença das NPs, realizou-se a comparação da média do controle de viabilidade (CV) com os resultados médios das AgNP, NCs e Fe₃O₄ NP. Neste aspecto a significância das diferenças foi avaliada com o teste t de *Student* ($p \leq 0,05$) e foram calculadas as porcentagens de formação de biofilme de *P. aeruginosa* na presença das nanopartículas em relação ao controle de viabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espectroscopia de absorção atômica

As NPs foram caracterizadas por espectroscopia de absorção atômica para identificar a concentração do metal. As NPs apresentaram concentração de prata na amostra 82 mg L^{-1} nas AgNPs e ferro 3.560 mg L^{-1} nas Fe_3O_4 NPs, respectivamente. Os NCs apresentaram concentração para ferro e prata de 72 e 280 mg L^{-1} , respectivamente.

5.2 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

As Fe_3O_4 NPs, AgNPs e os NCs foram caracterizadas por espectroscopia UV-vis. As absorbâncias foram normalizadas utilizando *OriginPro8.5*. Pode-se observar na Figura 9 os espectros UV-vis das amostras, na imagem é possível observar uma forte banda plasmônica centrada em aproximadamente 400 nm para a AgNP, o que condiz com a literatura e sugere a formação das AgNPs e sugere que elas são uniformemente esféricas de formato regular (SHERVANI *et al.*, 2008).

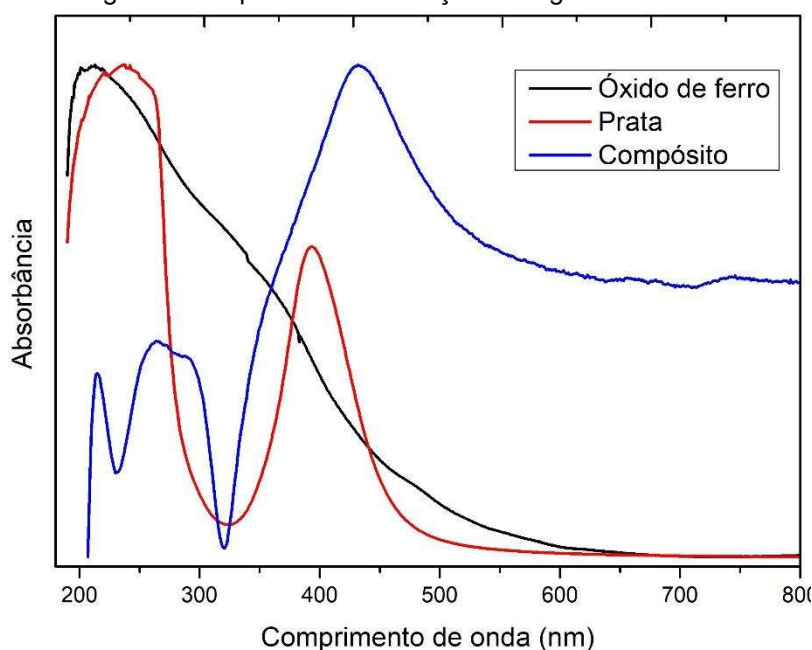
Na Fe_3O_4 NP observa-se banda em aproximadamente 300 nm , que indica uma banda energética e sugere transição de transferência de carga do metal ligante. No espectro UV-vis do NC é possível observar a banda plasmônica centrada em aproximadamente 450 nm . Esta banda corresponde a formação da AgNPs (SHERVANI *et al.*, 2008). Também é observado uma banda pouco energética de 300 nm que corresponde a Fe_3O_4 NP.

NPs consideradas plasmônicas possuem características diferenciadas para diferentes aplicações como o aumento da reatividade das NPs em comparação a partículas macro e o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície. A incidência de uma onda eletromagnética na superfície das NPs plasmônicas provoca a oscilação coletiva dos elétrons da camada de valência do metal, de maneira que todos os elétrons confinados ficam submetidos ao campo eletromagnético em um dado tempo. Sob influência desse campo, o movimento da nuvem eletrônica causa uma separação dipolar de cargas em sua superfície, o que caracteriza um Plasmon de Superfície.

Esta oscilação pode atingir ressonância quando a frequência da luz coincide com a faixa de absorção da NP – a banda plasmônica. Este é o fenômeno denominado ressonância plasmônica de superfície (DUTT; UPADHYAY, 2018).

O NC possui uma banda plasmônica que sugere características diferenciadas para diferentes aplicações, como o aumento da reatividade do NC em comparação a partículas macro. Além disso, no espectro do NC é observado bandas correspondentes às Fe₃O₄ NPs e AgNPs isoladas.

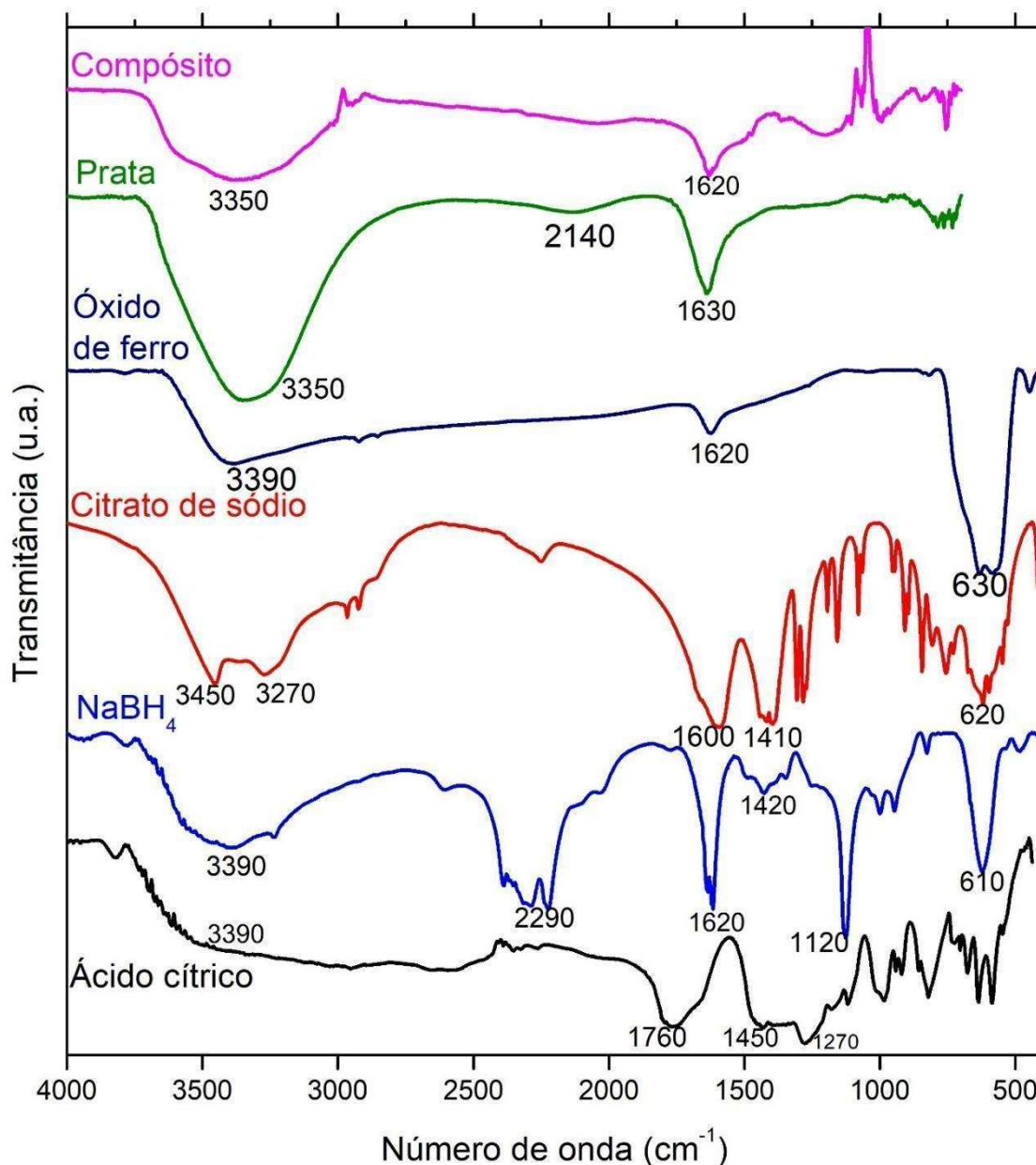
Figura 9 – Espectros de absorção na região do UV-vis.



5.3 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho

A obtenção dos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho para as amostras de AgNPs e NCs foram realizadas pelo método de refletância total atenuada – ATR. Os resultados obtidos na análise foram normalizados no eixo y. As amostras de Fe₃O₄ NPs e os reagentes NaBH₄, citrato de sódio e ácido cítrico foram caracterizados por FTIR. Na Figura 10 estão presentes os espectros de infravermelho das NPs na região de 4000 a 700 cm⁻¹ das amostras caracterizadas por FTIR-ATR e na região 4000 a 400 cm⁻¹ das amostras caracterizadas por FTIR.

Figura 10 – Espectros das amostras pelo método FTIR e FTIR-ATR.



Fonte: elaborado pela autora, 2022.

Nota-se que as amostras de NCs, Fe₃O₄ NPs e AgNPs possuem bandas largas na região de 3390-3350 cm⁻¹. A amostra de citrato de sódio apresenta banda larga na região de 3450 cm⁻¹ e a amostra de NaBH₄ apresenta banda larga na região de 3390 cm⁻¹. Bandas largas na região de 3300 cm⁻¹ são referentes a estiramento de ligação O-H. (PAIVA *et al.*, 2015).

Todas as amostras apresentam bandas na região de 1700 cm⁻¹. Uma absorção na faixa de 1715 ± 100 cm⁻¹ normalmente se deve à presença da ligação C=O (grupo carbonila) na molécula. Sendo que, o ácido cítrico possui uma banda fraca próxima de 1650 cm⁻¹ que normalmente são referentes a ligações C=C. O espectro do ácido

cítrico também apresentou banda na região de 1450 cm^{-1} , normalmente referente ao dobramento CH_2 (PAIVA *et al.*, 2015).

A amostra de NaBH_4 possui uma banda alongada na região de $2200 - 2400\text{ cm}^{-1}$ considerada uma vibração de alongamento (*stretching vibration*) da ligação B–H. E na região de 1120 cm^{-1} identifica-se uma vibração de deformação (*deformation vibration*) da ligação B–H (LANG *et al.*, 2017).

A banda observada em aproximadamente 1429 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento assimétrico da curvatura C–O–H do citrato. As bandas presentes entre $900 - 400\text{ cm}^{-1}$ dos espectros do citrato de sódio e ácido cítrico são características de ligações de deformação de C–H e dobras para fora do plano de C–H e CH_2 (PAIVA *et al.*, 2015).

As bandas de alta intensidade encontradas na região de 630 cm^{-1} no espectro Fe_3O_4 NPs, as bandas são características de estiramento Fe–O em óxido de ferro do tipo espinélio inverso (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Essa região do infravermelho não foi analisada para o NC, porque amostras caracterizadas por FTIR-ATR estão na região 4000 a 700 cm^{-1} , então bandas abaixo de 700 cm^{-1} não são identificadas. No espectro das Fe_3O_4 NPs foram observadas bandas nas regiões 3390 , 1620 e 630 cm^{-1} . As duas primeiras bandas são características do estiramento O–H e C=O presente no Ácido cítrico utilizado na síntese das AgNPs (PAIVA *et al.*, 2015).

Assim, foi possível observar no espectro das AgNPs a presença de bandas nas regiões 3350 , 2140 e 1630 cm^{-1} . Essas bandas são características do estiramento O–H e B–H presente no Citrato de sódio e NaBH_4 utilizado na síntese das AgNPs.

No espectro do NC foram observadas bandas nas regiões 3350 , 1620 e 750 cm^{-1} . As duas primeiras bandas são características do estiramento O–H e C=O presentes no Ácido cítrico e NaBH_4 utilizados na síntese dos NCs. A banda correspondente ao estiramento Fe–O não foi identificada devido a análise em ATR não permitir análises abaixo de 700 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

5.4 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das caracterizações das Fe_3O_4 NPs, AgNPs e NCs por potencial zeta, raio hidrodinâmico e índice de dispersão (ID). Foi possível observar que as Fe_3O_4 NPs e AgNPs apresentaram raio hidrodinâmico

de 106,7 nm e 63,27 nm e ID de 0,159 e 0,491, respectivamente. O ID foi analisado de acordo com a ISO 22412 (2017), na ISO é relatado que o ID é tipicamente inferior a 0,07 para amostras teste monodispersas de partículas esféricas, para amostras ISO-ID<0,4 as partículas são consideradas homogêneas, amostras ISO-ID>0,4 a amostra é pouco homogênea e amostras de ISO-ID>1 são consideradas heterogêneas (ISO 22412:2017). Assim, os dados de ID das amostras indicaram que as Fe₃O₄ NPs apresentam dispersão de tamanhos homogêneas e as AgNPs apresentam dispersão de tamanhos pouco homogêneas, pois o ID está acima de 0,4. Verificou-se também que as Fe₃O₄ NPs e AgNPs apresentaram potencial zeta de -37,7 mV e -43,5 mV, respectivamente. Estes valores de potencial zeta são considerados altamente estáveis (como regra geral, são considerados altamente estáveis potenciais acima de +30 ou abaixo de -30 mV) (MAKOWSKI *et al.*, 2019).

Conforme Tabela 1, os NCs apresentaram raio hidrodinâmico de 443,2 e 573,9 nm e ID de 0,645 (baseando-se no índice de refração do óxido de ferro) e 0,806 (baseando-se no índice de refração da prata) para análise de óxido de ferro e prata, respectivamente. De acordo com a ISO 22412 (2017), os dados de ID das amostras indicaram que os NCs apresentam dispersão de tamanhos pouco homogêneos, pois o ID está acima de 0,4. Verificou-se também que os NCs apresentaram potencial zeta de -21,9 mV e -15,1 mV para análise de óxido de ferro e prata, respectivamente. Os valores de potencial zeta do NC indica que os colóides são considerados pouco estáveis, pois a análise indica que o potencial zeta se encontra fora do padrão de alta estabilidade (MAKOWSKI *et al.*, 2019).

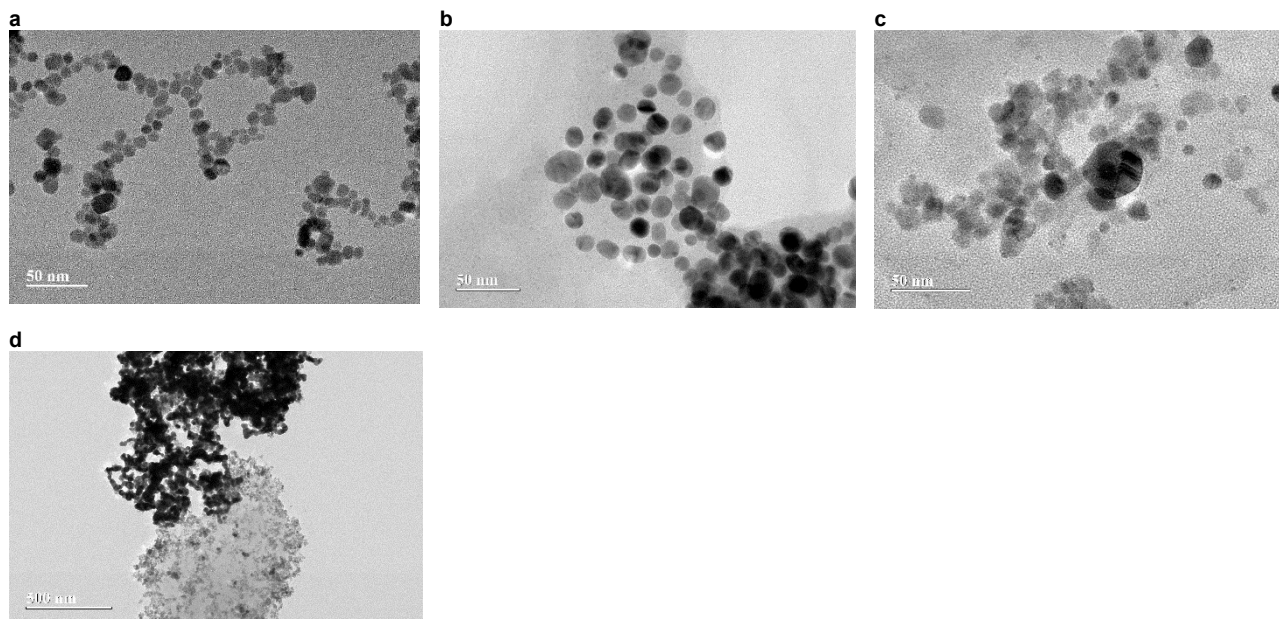
Tabela 1 – Resultados obtidos na caracterização das nanopartículas por potencial zeta e DLS.

Nanopartícula	Potencial zeta (mV)	Raio hidrodinâmico (nm)	Índice de dispersão - ID	Índice de refração (n)
Óxido de ferro	-37,7 ± 12,1	106,7	0,159	2,33
Prata	-43,5 ± 14,6	63,27	0,491	0,54
Compósito Fe ₃ O ₄ / Ag	-21,9 ± 5,70 / -15,1 ± 5,68	443,2 / 573,9	0,645 / 0,806	2,33 / 0,54

5.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 11 apresenta as micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) Fe₃O₄ NPs, AgNPs e NCs. Na Figura 11a é possível observar NPs em formatos esféricos, na Figura 11b é possível observar NPs esféricas e ovais e na Figura 11c é possível observar NPs esféricas, ovais e hexagonais.

Figura 11 – Micrografias das nanopartículas de a) óxido de ferro; b) prata; c) e d) nanocompósito em diferentes escalas.



A Figura 11a sugere que as Fe_3O_4 NPs podem estar ligadas entre si, isso sugere que as ligações podem ter ocorrido por meio da funcionalização das NPs com ácido cítrico, pois os íons citratos funcionalizados se ligaram por ligações cruzadas na superfície das Fe_3O_4 NPs.

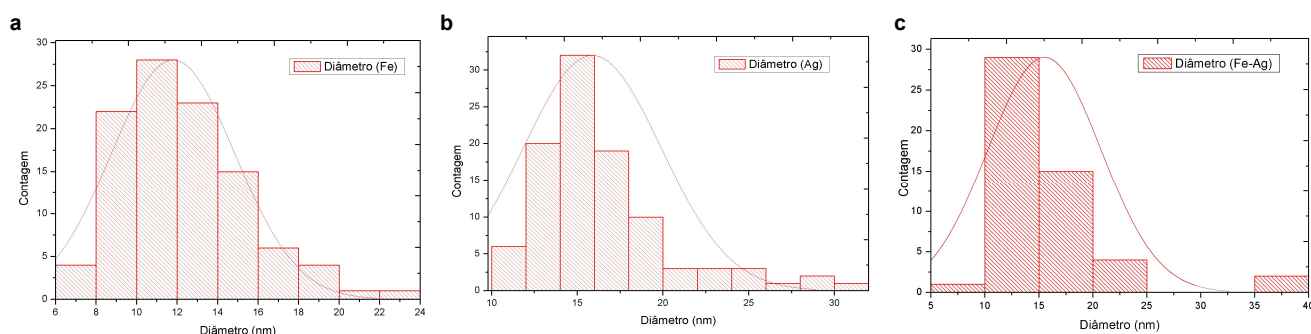
As AgNPs foram sintetizadas através do método de Kereselidze *et al.* (2012) com a adição de NaBH_4 para redução da prata. As AgNPs podem ser observada na Figura 11b, a figura permite visualizar NPs de formatos esféricos e hexagonais com pouco estado de agregação, pois a imagem mostra parte das NPs dispersas e parte agregadas, confirmando os dados observados na análise de DLS e potencial zeta que aponta as AgNPs com pouca homogeneidade.

Na Figura 11c é possível observar que as NPs apresentaram uma camada com diferente orientação o que sugere que houve formação do NC, ainda que o crescimento do NC possa ter aumentado o estado de agregação das partículas como confirmado pelas análises de DLS e potencial zeta. Na Figura 11d a micrografia sugere que os NCs são do tipo heterodímero, pois a Fe_3O_4 NP se encontra ligada à superfície da prata diretamente, mas não a recobre por completo. Observa-se pontos de estado de agregação nas micrografias 11c e 11d obtidas, sinalizando a agregação dos NCs.

Utilizando o programa *ImageJ* foi encontrado a média de $11,80 \pm 3$ nm, $15,87 \pm 4$ nm e $15,51 \pm 5$ nm, para diâmetro das Fe_3O_4 NPs, AgNPs e NCs, respectivamente.

Os valores encontrados estão representados na Figura 12 dos histogramas de distribuição de tamanho.

Figura 12 – histograma de distribuição do diâmetro das nanopartículas de a) óxido de ferro; b) prata; c) nanocompósito.



Essa análise permitiu obter distribuições de tamanho de NPs de imagens MET com informações sobre tamanho médio e desvio padrão. No entanto, tais informações das micrografias MET muitas vezes não corroboram bem com dados obtidos do DLS, pois são técnicas fundamentalmente diferentes. O tamanho obtido por DLS é geralmente maior que o obtido na análise de MET com *software imageJ* (BHATTACHARJEE, 2016; KIM *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

Sonbol, Mohammed e Korany (2022) sintetizaram AgNPs utilizando os agentes biogênicos *Phoma sp.*, *chaetomium globosum* e *chaetomium sp.* A distribuição do tamanho das partículas das imagens MET foi calculada usando o *software ImageJ* e apresentou tamanho médio de 12,7, 10,7 e 16,1 nm para as três sínteses citadas acima, respectivamente. Para análise do DLS o raio hidrodinâmico das partículas foi de 98,41, 83,15 e 51,76 nm, respectivamente. Isso mostra que os dados de tamanho médio utilizando imagem MET são menores em comparação aos observados pelo DLS, conforme dados encontrados acima. Além disso, os valores médios encontrados estão dentro do esperado de acordo com os dados encontrados para prata na literatura.

A distribuição do tamanho das Fe₃O₄ NPs sintetizadas foram avaliados utilizando as micrografias de análise MET. Foi calculado o tamanho médio de 5,3 nm das NPs usando o *software ImageJ*. O valor médio encontrado está dentro do esperado de acordo com os dados encontrados para óxido de ferro na literatura (KURNIAWAN; KHUMAENI, 2018).

5.6 Difração de elétron de área selecionada (SAED)

As análises de SAED é uma técnica que permite analisar a estrutura cristalina dos biomateriais através do padrão de pontos de difração obtidos na análise MET. Os padrões de *d-spacing* de AgNPs e Fe₃O₄ NPs foram considerados para encontrar os valores dos padrões de *d-spacing* do NC. Os picos observados com relação aos valores de *d-spacing* conhecidos representando o plano cristalográfico estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Índices de Miller em relação aos valores de *d-spacing* conhecidos para prata, óxido de ferro e compósito.

Plano	Prata <i>d-spacing</i>	Óxido de ferro <i>d-spacing</i>	Compósito <i>d-spacing</i>
(2 2 0)		2,968239834	2,842524161
(3 1 1)		2,531966072	2,444390125
(1 1 1)	2,251491613		2,232392008
(4 0 0)		2,105484788	
(2 0 0)	1,948368242		1,985111663
(4 2 2)		1,733102253	
(5 1 1)		1,630656339	1,583155228
(4 4 0) (2 1 4)		1,487099413	
(2 2 0)	1,380357513		1,401345291
(3 1 1)	1,191043354		1,189909567
(2 2 2)	1,117505727		

Foram encontrados os planos 111, 200, 220, 311 e 222 (Figura 13a) e 220, 311, 400, 422, 511 e 440/214 (Figura 13b) para prata e óxido de ferro, respectivamente. Conseqüentemente, foi possível observar através dos valores de *d-spacing* os planos que representam a prata e o óxido de ferro nos NCs 220, 311, 111, 200, 511, 220, 311 (Figura 13c) (GALATEANU *et al.*, 2015; MEHTAB; ZAIDI; SIDDIQI, 2018; NJAGI *et al.*, 2011; NOVAL; CARRIAZO, 2019; ZHU *et al.*, 2011).

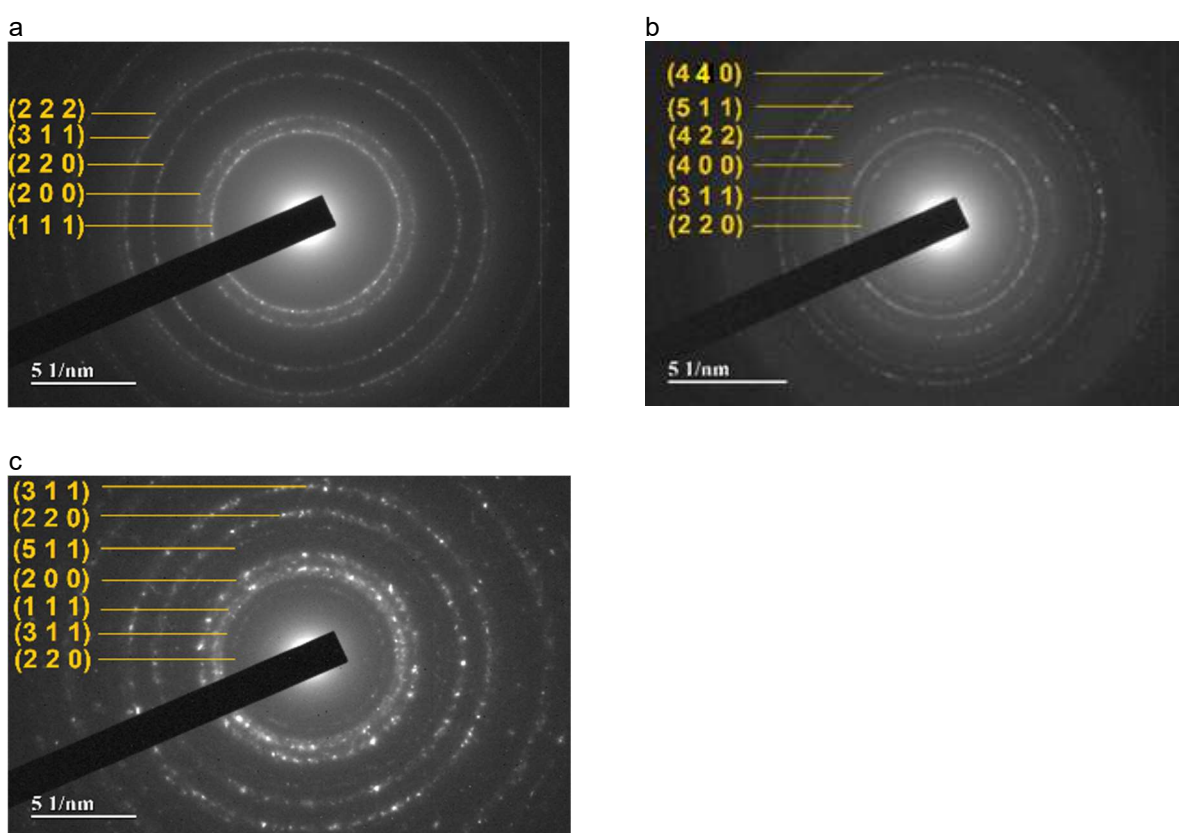
Para discussão dos resultados, as AgNPs sintetizadas foram analisadas considerando a estrutura cúbica de face centrada (MEHTAB; ZAIDI; SIDDIQI, 2018; NJAGI *et al.*, 2011). A prata não apresentou picos extras de difração, sugerindo que ela é essencialmente pura (NJAGI *et al.*, 2011). A alta pureza e a baixa toxicidade dessa NP a torna potencialmente atraente para aplicações biológicas.

As Fe₃O₄ NPs apresentaram o padrão de *d-spacing* 1,48. Esse padrão é considerado por Noval e Carriazo (2019) referente aos planos 440 (Fe₃O₄) e 214 (α -Fe₂O₃), o que sugere a presença de Hematita na dispersão de Fe₃O₄ NPs. O NC

apresentou picos de difração de ambas as NPs, o que sugere a presença das duas NPs na amostra.

As AgNPs são altamente cristalinas com picos de difração correspondentes à fase cúbica de face centrada, de acordo com o valor reportado de ICDD 4-783; $a=4,0862\text{\AA}$. A análise indica uma amostra nanocristalina com indexação para Fe_3O_4 NPs como rede cristalina cúbica com rostos de acordo com o arquivo ICDD número 04-008-8146 (GALATEANU *et al.*, 2015; NJAGI *et al.*, 2011).

Figura 13 – Difração de elétrons de área selecionada (SAED) das nanopartículas a) prata; b) óxido de ferro; c) nanocompósito



5.7 Estudo de toxicidade das nanopartículas pelo teste de letalidade de *Artemia salina*

As NPs não mostraram toxicidade nos testes de letalidade de *Artemia salina*. Não foi observada CL50 nas concentrações testadas o que indica que o composto não apresentou toxicidade, pois sua dose letal é superior à maior concentração avaliada ($20,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). O fator limitante desta concentração foi o fato de que a AgNP

possui concentração máxima de 100 µg mL⁻¹, dificultando o teste com concentrações superiores à concentração máxima testada em testes de microdiluição.

Em uma avaliação dos potenciais efeitos tóxicos de AgNPs em náuplios de *Artemia salina* sob a diretriz ISO TS 20787, os náuplios foram expostos às concentrações 0 (controle), 0,39, 1,56, 6,25, 25 e 100 mg L⁻¹ por 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados indicaram baixa taxa de imobilização dos náuplios no prazo de 24h, somente após o tempo de 72h que houve imobilização dos náuplios de forma dependente da concentração. Assim, os resultados indicaram que no período de 24 h, a concentração máxima testada não foi suficiente para imobilizar os náuplios (AN *et al.*, 2019).

O teste de letalidade de *Artemia salina* possui boa correlação com outros testes mais complexos na determinação de várias atividades, tais como: antifúngicas, antivirais e antimicrobianas, além de ser um teste de baixo custo e de fácil interpretação. Esse teste está sendo amplamente empregado na triagem da atividade biológica de vários compostos com possíveis potenciais de bioatividade (KRISHNARAJU *et al.*, 2005; LUNA *et al.*, 2005; PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

5.8 Formação de biofilme

Todas as 13 *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilmes, 9 (69,23 %) foram classificadas como formador forte, 4 (30,77 %) como formador moderado, conforme pode ser verificado na tabela 3.

Tabela 3 - Índice de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Med	DP	Formação de biofilme
Pa3	0,142	0,069	Moderada
Pa5	0,356	0,109	Forte
Pa6	0,394	0,082	Forte
Pa10	0,256	0,067	Forte
Pa11	0,142	0,018	Moderada
Pa13	0,192	0,063	Moderada
Pa20	1,077	0,442	Forte
Pa22	0,166	0,068	Moderada
Pa23	0,265	0,072	Forte
Pa28	1,676	1,153	Forte
Pa29	0,983	0,731	Forte
Pa ATCC 9027	0,246	0,103	Forte
Pa ATCC 27853	0,170	0,051	Forte
CNI	0,061	0,011	-

As cepas de *P. aeruginosa* Pa5, Pa6, Pa10, Pa20, Pa23, Pa28, Pa29, Pa ATCC 9027, Pa ATCC 27853 foram classificadas como formadoras fortes de biofilme; as cepas Pa3, Pa11, Pa13 e Pa22 como formadoras moderadas. Corroborando nossos resultados, Caixeta *et al.* (2018) identificou que as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentaram melhor desempenho na produção de biofilme quando comparada a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Os resultados da formação de biofilme de *P. aeruginosa* na presença das NPs estão dispostos na Tabela 4. Os resultados foram tabulados e, assim, calculados o desvio padrão e médias.

Tabela 4 - Índice de formação de biofilme de *P. aeruginosa* na presença de nanopartículas.

<i>P. aeruginosa</i>	AgNP		NCs		Fe ₃ O ₄ NP		CV	
	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP
Pa3	0,119	0,035	0,073	0,052	0,092	0,029	0,142	0,069
Pa5	0,220	0,081	0,193	0,085	0,527	0,125	0,356	0,109
Pa6	0,144	0,074	0,177	0,125	0,282	0,084	0,394	0,082
Pa10	0,164	0,030	0,185	0,051	0,136	0,046	0,256	0,067
Pa11	0,117	0,028	0,106	0,021	0,115	0,021	0,142	0,018
Pa13	0,180	0,069	0,167	0,027	0,131	0,090	0,192	0,063
Pa20	0,766	0,101	2,118	0,643	0,239	0,110	1,077	0,442
Pa22	0,143	0,028	0,115	0,071	0,118	0,013	0,166	0,068
Pa23	0,231	0,072	0,082	0,039	0,076	0,003	0,265	0,072
Pa28	0,560	0,230	0,141	0,005	0,368	0,055	1,676	1,153
Pa29	0,350	0,036	0,423	0,164	0,161	0,029	0,983	0,731
Pa ATCC 9027	0,422	0,046	0,377	0,100	0,314	0,018	0,246	0,103
Pa ATCC 27853	0,080	0,012	0,398	0,189	0,165	0,027	0,170	0,051
CNI	0,140	0,026	0,137	0,038	0,121	0,066	0,061	0,011

Legenda: **Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*; **ATCC** = American type culture collection; **CNI** = Controle não inoculado; **Med** = média; **DP** = desvio padrão; **CV** = controle de viabilidade; **AgNP** = Nanopartícula de prata; **NC** = Nanocompósito; **Fe₃O₄ NP** = Nanopartícula de óxido de ferro; **p** = nível de significância.

Os resultados obtidos no teste t de *Student* estão dispostos na Tabela 5. AgNPs 1 µg mL⁻¹ inibiram a formação de biofilme para as cepas Pa6, Pa10, Pa13 e Pa ATCC 27853. Os NCs 0,258 / 1 µg mL⁻¹ inibiram a formação de biofilme nas cepas Pa5, Pa10 e Pa13. Por fim, as Fe₃O₄ NPs 0,258 µg mL⁻¹ inibiram a formação de biofilme das cepas Pa10 e Pa28 (Tabela 5). As cepas Pa5, Pa6, Pa10, Pa28 e Pa ATCC 27853 inibidas são consideradas fortes produtoras de biofilme de acordo com dados visualizados na tabela 3.

As AgNPs inibiram a formação de biofilme em 63,5%, 35,9%, 6,3% e 52,9% para as cepas Pa6, Pa10, Pa13 e Pa ATCC 27853, respectivamente. Os NCs inibiram

a formação de biofilme em 45,8%, 27,7% e 13% nas cepas Pa5, Pa10 e Pa13, respectivamente. Por fim, as Fe₃O₄ NPs inibiram a formação de biofilme em 46,9% e 78% para as cepas Pa10 e Pa28, respectivamente. O nanocompósito se mostrou formador de biofilme para a Pa ATCC 9027, o biofilme aumentou 153,3% em relação ao controle.

Um estudo prévio demonstrou que as AgNPs foram bactericidas contra *P. aeruginosa* multirresistentes de forma dose dependente possui a faixa de CMI variando entre 1,406 e 5,625 µg mL⁻¹, o estudo mostrou que as AgNPs podem desempenhar papéis antimicrobianos na *P. aeruginosa* multirresistente de maneira dependente da concentração (LIAO *et al.*, 2019). Por isso, foi utilizada a concentração de 1 µg mL⁻¹ para o teste de inibição da formação de biofilme deste trabalho.

Tabela 5 – Porcentagem de formação de biofilme de *P. aeruginosa* na presença das nanopartículas em relação ao controle de viabilidade.

<i>P. aeruginosa</i>	AgNP		NCs		Fe ₃ O ₄ NP	
	%	p ≤ 0,05	%	p ≤ 0,05	%	p ≤ 0,05
Pa3	16,2		48,6		35,2	
Pa5	38,2		45,8	0,024	148,0	
Pa6	63,5	0,022	55,1		28,4	
Pa10	35,9	0,001	27,7	0,000	46,9	0,003
Pa11	17,6		25,4		19,0	
Pa13	6,3	0,009	13,0	0,018	31,8	
Pa20	28,9		196,7		77,8	
Pa22	13,9		30,7		28,9	
Pa23	12,8		69,1		71,3	
Pa28	66,6		91,6		78,0	0,029
Pa29	64,4		57,0		83,6	
Pa ATCC 9027	171,5		153,3	0,001	127,6	
Pa ATCC 27853	52,9	0,013	234,1		2,9	

O tamanho das AgNPs é uma característica crucial na atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa* multirresistentes, uma vez que partículas menores apresentam maior área de superfície de contato com o micro-organismo. Estudos mostram que a atividade antibiofilme ocorre por meio da ruptura da estrutura do biofilme e estresse oxidativo. É observado que o uso das AgNPs demonstram ser uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos sistemas antimicrobianos contra cepas de *P. aeruginosa* (CORIOLANO *et al.*, 2021).

O diâmetro das Fe₃O₄ NPs é importante para se obter efeito significativo na inibição da formação do biofilme bacteriano. A análise da micrografias TEM deste

trabalho identificou diâmetro de $11,80 \pm 3$ nm, contudo Sathyanarayanan *et al.* (2013) mostraram efeito significativo no crescimento do biofilme bacteriano na presença de Fe_3O_4 NPs de diâmetro menor que 10 nm e relataram que a concentração da dispersão também possui relação com a inibição no crescimento de biofilmes.

Em concentrações baixas, as Fe_3O_4 NPs apresentaram aumento de crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* em comparação ao controle. No entanto, concentrações mais altas ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$) mostram redução significativa no crescimento de biofilmes na presença de Fe_3O_4 NPs em comparação a baixa concentração ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SATHYANARAYANAN *et al.*, 2013).

Um estudo prévio demonstrou que as NPs de óxido de zinco (~ 20 nm) foram bactericidas contra *P. aeruginosa* multirresistentes de forma dose dependente na concentração de $350 \mu\text{g mL}^{-1}$, o teste avaliou 15 isolados clínicos e uma referência ATCC 9027 de *P. aeruginosa*. Os organismos tratados com NPs $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultaram em mais de 94% de inibição na redução da DO_{620} (SANGANI; MOGHADDAM; FORGHANIFARD, 2015).

O NC teve o objetivo de melhorar a estabilidade e a atividade antimicrobiana das AgNPs (conhecida e muito estudada em testes antimicrobianos). Os resultados sugeriram que o NC melhorou a inibição da formação de biofilme para as Pa5, Pa10 e Pa13 em relação às AgNPs isoladas.

Nanocompósitos de quitosana (CS) / óxido de zinco (ZnO) com e sem gentamicina (utilizada como agente antibiofilme) foi sintetizado com objetivo de inibir a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). Os NCs foram testados em concentrações de $\frac{1}{4}$ concentração mínima inibitória (CMI) contra os biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1. Foi observado redução significativa em todos os componentes químicos ($p < 0,05$). A concentração CMI de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ do NC CS-ZnO teve um grande declínio de biofilme de 63% para *P. aeruginosa* PAO1, já o NC CS-ZnO com gentamicina de CMI de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu drasticamente a formação de biofilme de 84% (HEMMATI *et al.*, 2020).

Nanocompósito de quitosana (CS) / polipirrol (PPy) foram testados na avaliação da formação de biofilme de *P. aeruginosa*. NCs CS-PPy são altamente estáveis e atuam como um potente antibiofilme para o tratamento da infecção por *P. aeruginosa*. Para verificar a CMI de CS-PPy NCs para a *P. aeruginosa*, a cultura de células crescidas foi tratada com diferentes concentrações desse composto variando de 16 a

4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após 22 h de incubação, foi determinada DO a 600 nm e os resultados mostraram que a CMI de CS-PPy foi de 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (KHAN *et al.*, 2019).

De modo geral, as concentrações utilizadas nos trabalhos da literatura foram superiores às testadas neste trabalho. Contudo, este trabalho usou a faixa de CMI da AgNP dos autores Liao *et al.*, 2019 para avaliar a inibição na formação do biofilme para as NPs. As concentrações das amostras foram ajustadas de forma a tornar os resultados comparáveis.

Os resultados apresentaram boas perspectivas na avaliação da inibição da formação de biofilme e o NC indica melhor porcentagem de inibição na formação do biofilme em 8 cepas de *P. aeruginosa* (Pa3, Pa5, Pa11, Pa13, Pa22, Pa23, Pa28 e Pa ATCC 9027) em comparação com as AgNPs isoladas, mas apenas em três casos (Pa5, Pa13 e Pa ATCC 9027) os resultados apresentaram nível de significância. Além disso, a não toxicidade das NPs permite viabilizar uma futura pesquisa utilizando o NC como nanocarreador.

6 CONCLUSÕES

- O NC foi sintetizado de acordo com as micrografias do MET e os resultados sugeriram um aumento no estado de agregação das partículas. As caracterizações mostraram potencial zeta de -15,1 mV, raio hidrodinâmico de 573,9 nm, ID de 0,806, diâmetro médio $15,51 \pm 5$ nm e morfologia esférica. Os resultados confirmaram a avaliação visual de alto estado de agregação.
- A Fe₃O₄ NP foi sintetizada e funcionalizada de acordo com as micrografias de MET e os resultados sugeriram que as NPs se ligaram através dos íons citrato durante a funcionalização com ácido cítrico. As caracterizações mostraram potencial zeta de -37,7 mV, raio hidrodinâmico de 106,7 nm, ID de 0,159, diâmetro médio $11,80 \pm 3$ nm e morfologia esférica. Estes resultados sugerem alta estabilidade das NPs.
- A AgNP foi sintetizada de acordo com as micrografias do MET. Os resultados apresentaram potencial zeta de -43,5 mV, raio hidrodinâmico de 63,27 nm, ID de 0,491, diâmetro médio $15,87 \pm 4$ nm e morfologia esférica e hexagonal. Estes resultados sugerem alta estabilidade das NPs.
- As NPs não apresentaram toxicidade com CL₅₀ na concentração máxima testada de 20,5 µg mL⁻¹ com *Artemia salina*. Nesse sentido, as NPs testadas podem ser seguras do ponto de vista da toxicidade, permitindo o emprego medicinal das NPs.
- Entre as cepas de *P. aeruginosa* inibidas, Pa5, Pa6, Pa10, Pa13, Pa28 e Pa ATCC 27853, 5 delas são classificadas como fortes formadoras de biofilme e 1 classificada como formadora moderada de biofilme.
- As AgNPs inibiram a formação de biofilme para as cepas Pa6, Pa10, Pa13 e Pa ATCC 27853. Os NCs Fe₃O₄/Ag inibiram a formação de biofilme nas cepas Pa5, Pa10 e Pa13. Por fim, as Fe₃O₄ NPs inibiram a formação de biofilme das cepas Pa10 e Pa28.

REFERÊNCIAS

ABBARAJU, P. L.; YANG, Y.; YU, M.; FU, J.; XU, C.; YU, C. Core–Shell-structured Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Photodynamic Therapy and Antibody Delivery. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 12, n. 13, p. 1465–1469, 2017.

AN, H. J.; SARKHEIL, M.; PARK, H. S.; YU, I. J.; JOHARI, S. A. Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 218, p. 62–69, 1 abr. 2019.

ARAÚJO, R. M. S.; VAZ, A. F. M.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; MELO, A. M. M.; SILVA, T. G.; CORREIA, M. T. S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97–100, 1 out. 2011.

ARMIJO, L. M.; WAWRZYNIEC, S. J.; KOPCIUCH, M.; BRANDT, Y. I.; RIVERA, A. C.; WITHERS, N. J.; COOK, N. C.; HUBER, D. L.; MONSON, T. C.; SMYTH, H. D. C.; OSIŃSKI, M. Antibacterial activity of iron oxide, iron nitride, and tobramycin conjugated nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1–27, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-020-0588-6>>.

BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; HASSANZADAZAR, H.; TAHERIKALANI, M. Pseudomoniasis phytotherapy: a review on most important Iranian medicinal plants effective on *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 347–350, out. 2016. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir>>. Acesso em: 29 set. 2022.

BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–20, jan. 2013.

BARRIENTOS, K. C.; IPARRAGUIRRE, D. A.; CAVERO, H. A. Synthesis and characterization of nanocompounds Fe₃O₄/Ag: Its effect against Enterobacter

aerogenes and *Enterococcus faecalis*. **Revista Colombiana de Química**, v. 48, n. 2, p. 33–39, 1 maio 2019.

BAYGIN, O.; TUZUNER, T.; YILMAZ, N.; AKSOY, S. Short-term antibacterial efficacy of a new silver nanoparticle-containing toothbrush. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 65, n. 5, p. 818–819, 2017.

BERNAL-ROSAS, Y.; OSORIO-MUÑOZ, K.; TORRES-GARCÍA, O. *Pseudomonas aeruginosa*: an emerging nosocomial trouble in veterinary *Pseudomonas aeruginosa*: un problema nosocomial emergente en veterinaria. **Revista MVZ Córdoba**, v. 20, p. 4937–4946, 2015.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BENJAMIN, D. K.; BRADLEY, J.; GUIDOS, R. J.; JONES, R. N.; MURRAY, B. E.; BONOMO, R. A.; GILBERT, D. 10 × '20 progress - Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1685–1694, 15 jun. 2013.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17–MR71, dez. 2007.

CAIXETA, M. A. B.; BRAGA, A. da S.; ALMEIDA, D. G. S. de; NAVES, P. L. F. Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. In: **Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, 5., 2018, Pirenópolis. Anais eletrônicos**, [s.d.]

CHEN, B.; WANG, F. NaYbF₄@CaF₂ core-satellite upconversion nanoparticles: One-pot synthesis and sensitive detection of glutathione. **Nanoscale**, v. 10, n. 42, p. 19898–19905, 14 nov. 2018.

CHEN, Y.; GAO, N.; JIANG, J. Surface Matters: Enhanced Bactericidal Property of Core-Shell Ag-Fe₂O₃ Nanostructures to Their Heteromer Counterparts from One-Pot Synthesis. **Small**, v. 9, n. 19, p. 3242–3246, 15 abr. 2013.

CORIOLOANO, D. de L.; BARBOSA DE SOUZA, J.; BUENO, E. V.; MEDEIROS, S. M. de F. R. dos S.; CAVALCANTI, I. D. L.; CAVALCANTI, I. M. F. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 267–278, 2021.

DA COSTA, G. M.; DE GRAVE, E.; DE BAKKER, P. M. A.; VANDENBERGHE, R. E. Influence of nonstoichiometry and the presence of maghemite on the Mössbauer spectrum of magnetite. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, n. 6, p. 656–668, 1995.

DA COSTA, R. C.; DE SOUZA, F. G. Preparo de nanocompósitos de maghemita e polianilina assistido por ultrassom. **Polimeros**, v. 24, n. 2, p. 243–249, 2014.

DADFAR, S. M.; ROEMHILD, K.; DRUDE, N. I.; VON STILLFRIED, S.; KNÜCHEL, R.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 302–325, 1 jan. 2019.

DAUD, M.; KHAN, Z.; ASHGAR, A.; DANISH, M. I.; QAZI, I. A. Comparing and Optimizing Nitrate Adsorption from Aqueous Solution Using Fe/Pt Bimetallic Nanoparticles and Anion Exchange Resins. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, 2015.

DAVIES, J. C.; WILSON, W. **EPA AND NANOTECHNOLOGY: OVERSIGHT for THE 21st CENTURY**. Project on Emerging Nanotechnologies is supported by THE PEW CHARITABLE TRUSTSPEN, p. 133–56, 2007.

DONG, X.; JI, X.; WU, H.; ZHAO, L.; LI, J.; YANG, W. Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 16, p. 6573–6576, 23 abr. 2009.

DOS SANTOS, D. P.; GRASSESCHI, D. Plasmonic nanomaterials: Part II. Surface coordination chemistry and its application to sensors and catalysts. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1482–1499, 1 dez. 2020.

DULIŃSKA-LITEWKA, J.; ŁAZARCZYK, A.; HAŁUBIEC, P.; SZAFRAŃSKI, O.; KARNAS, K.; KAREWICZ, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 1–26, 19 fev. 2019.

DUNCAN, T. v. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, 1 nov. 2011.

DUTT, A.; UPADHYAY, L. S. B. Synthesis of Cysteine-Functionalized Silver Nanoparticles Using Green Tea Extract with Application for Lipase Immobilization. **Analytical Letters**, v. 51, n. 7, p. 1071–1086, 3 maio 2018.

FARIA, R. N.; LIMA, L. F. C. P. **Introdução ao Magnetismo dos Materiais**. Livraria da Física, 2005. v. 1ª edição 198 p.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. D. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1042–1050, 2011.

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C. S. R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Aeromonas spp.* isolated from aquatic organisms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 244–249, 1 fev. 2018.

GALATEANU, B.; BUNEA, M. C.; STANESCU, P.; VASILE, E.; CASARICA, A.; IOVU, H.; HERMENEAN, A.; ZAHARIA, C.; COSTACHE, M. In Vitro Studies of Bacterial Cellulose and Magnetic Nanoparticles Smart Nanocomposites for Efficient Chronic Wounds Healing. **Stem Cells International**, v. 2015, 2015.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates: Occurrence Rates, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Molecular Typing in the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. S146–S155, 2001.

GARCIA, D. G.; SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L. Síntese de nanopartículas de prata pela técnica de eletrodeposição para desenvolvimento de biossensores. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 31130–31145, 2021.

GIESE, E. C. **Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro**. v. 1, p. 17–23, 2018.

GILJOHANN, D. A.; SEFEROS, D. S.; PRIGODICH, A. E.; PATEL, P. C.; MIRKIN, C. A. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 6, p. 2072–2073, 18 fev. 2009.

GONÇALVES, R. C. **Toxicidade e atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos na formação de biofilmes por bactérias gram-negativas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis., 2015. Disponível em: <<https://www.bdttd.ueg.br//handle/tede/280>>. Acesso em: 29 set. 2022.

GONG, P.; LI, H.; HE, X.; WANG, K.; HU, J.; TAN, W.; ZHANG, S.; YANG, X. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, n. 28, 18 jul. 2007.

GUEVARA, A.; SAHAI, J. M.; TEDESCO-MAIULLARI, R. Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo-β-lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela. **Revista de la sociedad venezolana de microbiología**, v. 35, p. 77–82, 2015.

GUTIÉRREZ, J. C. H.; CAMPOS RUBIO, J. C.; DE FARIA, P. E.; DAVIM, J. P. Machining behavior of polymer composites materials for automotive applications. **Polimeros**, v. 24, n. 6, p. 711–719, 1 nov. 2014.

GUTIÉRREZ-ARAUJO, M. I.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; JUÁREZ-MORENO, K. O. Respuestas celulares de macrófagos a nanopartículas de óxidos metálicos. **Mundo Nano**, v. 14, n. 27, p. 1e–16e, 25 fev. 2021.

HA, D.-G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2 abr. 2015.

HANNICKEL, A. **Estudo de nanopartículas de magnetita obtidas pelos métodos de coprecipitação, biossíntese e moagem**. 2011. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2011.

HEMMATI, F.; SALEHI, R.; GHOTASLOU, R.; KAFIL, H. S.; HASANI, A.; GHOLIZADEH, P.; REZAEI, M. A. The assessment of antibiofilm activity of chitosan-zinc oxide-gentamicin nanocomposite on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 2248–2258, 15 nov. 2020.

HORCAJADA, J. P.; MONTERO, M.; OLIVER, A.; SORLÍ, L.; LUQUE, S.; GÓMEZ-ZORRILLA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

HUSAIN, F. M.; ANSARI, A. A.; KHAN, A.; AHMAD, N.; ALBADRI, A.; ALBALAWI, T. H. Mitigation of acyl-homoserine lactone (AHL) based bacterial quorum sensing, virulence functions, and biofilm formation by yttrium oxide core/shell nanospheres: Novel approach to combat drug resistance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

ISO 22412:2017. Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS). 2017. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/65410.html>>. Acesso em: 29 set. 2022.

JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 71–76, fev. 2008.

JORGE DE SOUZA, T. A.; ROSA SOUZA, L. R.; FRANCHI, L. P. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 691–700, 30 abr. 2019.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. S44–S51, 2017.

KERESELIDZE, Z.; ROMERO, V. H.; PERALTA, X. G.; SANTAMARIA, F. Gold nanostar synthesis with a silver seed mediated growth method. **Journal of Visualized Experiments**, n. 59, p. 1–5, 2012.

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

KHAN, F.; MANIVASAGAN, P.; PHAM, D. T. N.; OH, J.; KIM, S. K.; KIM, Y. M. Antibiofilm and antivirulence properties of chitosan-polypyrrole nanocomposites to *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 363–373, 1 mar. 2019.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.-H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C.-Y.; KIM, Y.-K.; LEE, Y.-S.; JEONG, D. H.; CHO, M.-H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, mar. 2007.

KIM, K. H.; XING, H.; ZUO, J. M.; ZHANG, P.; WANG, H. TEM based high resolution and low-dose scanning electron nanodiffraction technique for nanostructure imaging and analysis. **Micron**, v. 71, p. 39–45, 1 abr. 2015.

KIM, S. K.; LEE, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 71–85, 1 fev. 2016.

KONING, J. W. **Interactions Between Streptococcus mutans and Veillonella dispar**. 2010. Graduate School of UCL - Doctor of Philosophy, London, 2010.

KRISHNARAJU, A. v; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H.-S.; SUBBARAJU, G. v. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 3, n. 2, p. 125–134, 2005.

KURNIAWAN, G.; KHUMAENI, A. Synthesis of iron oxide nanoparticle using pulsed laser ablation method at low laser energy. Em: AIP Conference Proceedings, 2018,

International Conference on Science and Applied Science (ICSAS). [...]. International Conference on Science and Applied Science (ICSAS): American Institute of Physics, 2018. v. 2014, p. 1–4.

LANG, C.; JIA, Y.; LIU, J.; WANG, H.; OUYANG, L.; ZHU, M.; YAO, X. NaBH₄ regeneration from NaBO₂ by high-energy ball milling and its plausible mechanism. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 18, p. 13127–13135, 4 maio 2017.

LEE, J. H.; JUN, Y. W.; YEON, S. I.; SHIN, J. S.; CHEON, J. Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 48, p. 8160–8162, 11 dez. 2006.

LEE, P. C.; MEISEL', D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols'. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, p. 3391–3395, 1982.

LEE, Y.; OH, S. G. Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 768–771, 25 jan. 2015.

LEWISOSCAR, F.; NITHYA, C.; VISMAYA, S.; ARUNKUMAR, M.; PUGAZHENDHI, A.; NGUYEN-TRI, P.; ALHARBI, S. A.; ALHARBI, N. S.; THAJUDDIN, N. In vitro analysis of green fabricated silver nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm formation, their application on urinary catheter. **Progress in Organic Coatings**, v. 151, 1 fev. 2021.

LHULLIER, C.; ANTUNES HORTA, P.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

LIAO, S.; ZHANG, Y.; PAN, X.; ZHU, F.; JIANG, C.; LIU, Q.; CHENG, Z.; DAI, G.; WU, G.; WANG, L.; CHEN, L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 1469–1487, 2019.

LIU, C. H.; ZHOU, Z. D.; YU, X.; LV, B. Q.; MAO, J. F.; XIAO, D. Preparation and characterization of Fe₃O₄/Ag composite magnetic nanoparticles. **Inorganic Materials**, v. 44, n. 3, p. 291–295, mar. 2008.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, jan. 2016.

LU, Y.; MEI, Y.; DRECHSLER, M.; BALLAUFF, M. Thermosensitive core-shell particles as carriers for Ag nanoparticles: Modulating the catalytic activity by a phase transition in networks. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 5, p. 813–816, 23 jan. 2006.

LUNA, J. S.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 28 fev. 2005.

MAHLAMBI, M. M.; NGILA, C. J.; MAMBA, B. B. Recent Developments in Environmental Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants: The Case of Titanium Dioxide Nanoparticles-A Review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, n. 5, p. 29, 2015.

MAKOWSKI, M.; SILVA, Í. C.; DO AMARAL, C. P.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N. C. Advances in lipid and metal nanoparticles for antimicrobial peptide delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 1–33, 1 nov. 2019.

MCCAMMON, C. A.; LIU, L.-G. The Effects of Pressure and Temperature on Nonstoichiometric Wüstite, Fe_xO: The Iron-rich Phase Boundary. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 10, p. 106–113, 1984.

MEHTAB, S.; ZAIDI, M. G. H.; SIDDIQI, T. I. Designing Fructose Stabilized Silver Nanoparticles for Mercury(II) Detection and Potential Antibacterial Agents. **Material Science Research India**, v. 15, n. 3, p. 241–249, 28 dez. 2018.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633–638, 2006.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. 2458–2461, nov. 2007.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M.; FROTA, C. C. **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: Imprensa universitária, 2015.

MOTEVASSELIAN, F.; ZIBAFAR, E.; YASSINI, E.; MIRZAEI, M.; POURMIRHOSENI, N.; MOTEVASSELIAN, F. Adherence of Streptococcus Mutans to Microhybrid and Nanohybrid Resin Composites and Dental Amalgam: An In Vitro Study. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 14, n. 6, p. 337, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35815592/>. Acesso em: 7 abr. 2022.

NJAGI, E. C.; HUANG, H.; STAFFORD, L.; GENUINO, H.; GALINDO, H. M.; COLLINS, J. B.; HOAG, G. E.; SUIB, S. L. Biosynthesis of iron and silver nanoparticles at room temperature using aqueous sorghum bran extracts. **Langmuir**, v. 27, n. 1, p. 264–271, 4 jan. 2011.

NOVAL, V. E.; CARRIAZO, J. G. Fe₃O₄-TiO₂ and Fe₃O₄-SiO₂ Core-shell Powders Synthesized from Industrially Processed Magnetite (Fe₃O₄) Microparticles. **Materials Research**, v. 22, n. 3, 2019.

NOVAL, V. E.; PUENTES, C. O.; CARRIAZO, J. G. Magnetita (Fe₃O₄): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. **Revista Colombiana de Química**, v. 46, n. 1, p. 42–59, 2017.

NTUNGWE N, E.; DOMÍNGUEZ-MARTÍN, E. M.; ROBERTO, A.; TAVARES, J.; ISCA, V. M. S.; PEREIRA, P.; CEBOLA, M.-J.; RIJO, P. Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 6 abr. 2020.

NUGROHO, B. S.; ISKANDAR, A. A.; MALYSHEV, V. A.; KNOESTER, J. Bistable optical response of a nanoparticle heterodimer: Mechanism, phase diagram, and switching time. **Journal of Chemical Physics**, v. 139, n. 1, 7 jul. 2013.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 50–75 p.

PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; KOLÁŘ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; PIZÚROVÁ, N.; SHARMA, V. K.; NEVĚČNÁ, T.; ZBOŘIL, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 24 ago. 2006.

PATIÑO VIDAL, C.; VELÁSQUEZ, E.; J. GALOTTO, M.; LÓPEZ DE DICASTILLO, C. Obtention of Antimicrobial Fibers Type Core/Shell Pla/Pvoh-Lae By Coaxial Electrospinning. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.**, 26 ago. 2021.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. **Naresuan University Journal**, v. 12, n. 2, p. 13–18, 2004.

PRAGASAM, A.; VEERARAGHAVAN, B.; NALINI, E.; ANANDAN, S.; KAYE, K. An update on antimicrobial resistance and the role of newer antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 303–316, 1 jul. 2018.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. L. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7 Edição, 2017.

QIN, Y.; JI, X.; JING, J.; LIU, H.; WU, H.; YANG, W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 172–176, 3 dez. 2010.

RAJ, K.; MOSKOWITZ, R. Commercial applications of ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 85, p. 233–245, 1990.

RIBEIRO, K. L.; FRÍAS, I. A. M.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; SOUSA-JUNIOR, A. A.; SILVA, O. N.; BAKUZIS, A. F.; OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S. Clavanin A-bioconjugated Fe₃O₄ / Silane core-shell nanoparticles for thermal ablation of bacterial biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 72–81, 1 set. 2018.

RIVAS, K. A. C.; TORREALBA, M. V. B.; ALVARADO, R. A. S.; MONTIEL, M. Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 35, p. 83–88, 2015.

ROGOV, A.; MUGNIER, Y.; BONACINA, L. Harmonic nanoparticles: noncentrosymmetric metal oxides for nonlinear optics. **Journal of Optics**, v. 17, n. 3, p. 033001, 25 fev. 2015. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2040-8978/17/3/033001>>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ROSHANI-ASL, P.; RASHIDI, N.; SHOKOOHIZADEH, L.; ZAREI, J. Relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and lasB gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Clinical Laboratory**, v. 64, n. 9, p. 1477–1484, 2018. . Acesso em: 29 set. 2022.

SANGANI, M. H.; MOGHADDAM, N. N.; FORGHANIFARD, M. M. Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Nanomedicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 298–301, 2015.

SANT'ANNA, L. da S.; ALENCAR, M. S. de M.; FERREIRA, A. P. Patenteamento em nanotecnologia no Brasil: Desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e a saúde humana. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 348–353, 2013.

SATHYANARAYANAN, M. B.; BALACHANDRANATH, R.; GENJI SRINIVASULU, Y.; KANNAIYAN, S. K.; SUBBIAHDOSS, G. The Effect of Gold and Iron-Oxide Nanoparticles on Biofilm-Forming Pathogens. **ISRN Microbiology**, v. 2013, p. 1–5, 25 set. 2013.

SERGEEVICH GOLUBEV, S.; DMITRIYEVICH SEKERIN, V.; EVGENIEVNA GOROKHOVA, A.; VICTOROVNA GAYDUK, N. Nanotechnology market research: Development and prospects Investigación de mercado en nanotecnología: Desarrollo y perspectivas. **Espacios**, v. 39, n. 36, 2018.

SHAH, S.; KUNTE, S.; JAGTAP, C.; JAJOO, S.; PATEL, A.; SHAH, P. Efficacy of two different mouth rinses in inhibition of the growth of *streptococcus mutans* on toothbrush bristles. **Journal of Dental Research and Review**, v. 8, n. 4, p. 261, 2021.

SHAHEEN, T. I.; EL-NAGGAR, M. E.; HUSSEIN, J. S.; EL-BANA, M.; EMARA, E.; EL-KHAYAT, Z.; FOUUDA, M. M. G.; EBAID, H.; HEBEISH, A. Antidiabetic assessment; in vivo study of gold and core-shell silver-gold nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 865–875, out. 2016.

SHAMS, S. F.; GHAZANFARI, M. R.; SCHMITZ-ANTONIAK, C. Magnetic-plasmonic heterodimer nanoparticles: Designing contemporarily features for emerging biomedical diagnosis and treatments. **Nanomaterials**, v. 9, n. 97, 1 jan. 2019.

SHARMA, G.; JEEVANANDAM, P. A Facile Synthesis of Multifunctional Iron Oxide@Ag Core-Shell Nanoparticles and Their Catalytic Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 6126–6136, 9 dez. 2013.

SHERVANI, Z.; IKUSHIMA, Y.; SATO, M.; KAWANAMI, H.; HAKUTA, Y.; YOKOYAMA, T.; NAGASE, T.; KUNEIDA, H.; ARAMAKI, K. Morphology and size-controlled synthesis of silver nanoparticles in aqueous surfactant polymer solutions. **Colloid and Polymer Science**, v. 286, n. 4, p. 403–410, abr. 2008.

SHOCKMAN, G. D.; BARREN, J. F. Structure, Function, and Assembly of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 501–527, out. 1983.

SILVA, L. C. A. da; PESSOA, D. A. do N.; MAIA, L. Â.; MATOS, R. A. T.; MACÊDO, M. M. da S. Systemic Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 5–5, 1 jan. 2016.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73–74, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. p. 512, 8 ed, 2014.

SISNANO DO MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, tecnologia e inovação. Relatório de acompanhamento - Sistema nacional de laboratórios em nanotecnologias SisNANO. 2016.

SONBOL, H.; MOHAMMED, A. E.; KORANY, S. M. Soil Fungi as Biomediator in Silver Nanoparticles Formation and Antimicrobial Efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, p. 2843–2863, 2022.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Methods Microbiological Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, B.; DEMEO, P.; SHIRTLIFF, M.; GAWALT, E.; KATHJU, S. Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. **Em: Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices**. Elsevier Science, 2013. p. 77–101.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 25–32, 1 jan. 2016.

SUN, S.; ZENG, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 28, p. 8204–8205, 17 jul. 2002.

TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 121–130, 1 dez. 2014.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Analytical Chemistry**, v. 21, p. 55–75, 1951.

WAGNER, S.; SOMMER, R.; HINSBERGER, S.; LU, C.; HARTMANN, R. W.; EMPTING, M.; TITZ, A. Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 5929–5969, 14 jul. 2016.

WANG, F.; HE, Q.; YIN, J.; XU, S.; HU, W.; GU, L. BrIR from *Pseudomonas aeruginosa* is a receptor for both cyclic di-GMP and pyocyanin. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

WANG, L.; CLAVERO, C.; HUBA, Z.; CARROLL, K. J.; CARPENTER, E. E.; GU, D.; LUKASZEW, R. A. Plasmonics and enhanced magneto-optics in core-shell Co-Ag nanoparticles. **Nano Letters**, v. 11, n. 3, p. 1237–1240, 9 mar. 2011.

WENG, Z.; WANG, H.; VONGSVIVUT, J.; LI, R.; GLUSHENKOV, A. M.; HE, J.; CHEN, Y.; BARROW, C. J.; YANG, W. Self-assembly of core-satellite gold nanoparticles for colorimetric detection of copper ions. **Analytica Chimica Acta**, v. 803, p. 128–134, 25 nov. 2013.

WU, G. feng; ZHU, J.; WENG, G. jun; LI, J. jun; ZHAO, J. wu. Heterodimers of metal nanoparticles: synthesis, properties, and biological applications. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 10, 1 out. 2021. Acesso em: 5 abr. 2022.

XIE, Y.; CHEN, S.; ZHANG, X.; SHI, Z.; WEI, Z.; BAO, J.; ZHAO, W.; ZHAO, C. Engineering of Tannic Acid Inspired Antifouling and Antibacterial Membranes through Co-deposition of Zwitterionic Polymers and Ag Nanoparticles. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 27, p. 11689–11697, 10 jul. 2019.

XU, L. H.; PATIL, D. S.; YANG, J.; XIAO, J. Metal Oxide Nanostructures: Synthesis, Properties, and Applications. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, p. 1–2, 2015.

YOON, J. H.; LIM, J.; YOON, S. Controlled assembly and plasmonic properties of asymmetric core-satellite nanoassemblies. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 7199–7208, 28 ago. 2012.

ZAMPERINI, C.; MACCARI, G.; DEODATO, D.; PASERO, C.; D'AGOSTINO, I.; OROFINO, F.; DE LUCA, F.; DREASSI, E.; DOCQUIER, J. D.; BOTTA, M. Identification, synthesis and biological activity of alkyl-guanidine oligomers as potent antibacterial agents. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Desenvolvimento Da Nanotecnologia: Cenário Mundial E Nacional De Investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 95–101, 2008.

ZHANG, L.; XU, Y.; YAO, H.; XIE, L.; YAO, J.; LU, H.; YANG, P. Boronic acid functionalized core-satellite composite nanoparticles for advanced enrichment of glycopeptides and glycoproteins. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 39, p. 10158–10166, 5 out. 2009.

ZHANG, Y.; PAN, X.; LIAO, S.; JIANG, C.; WANG, L.; TANG, Y.; WU, G.; DAI, G.; CHEN, L. Quantitative Proteomics Reveals the Mechanism of Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 8, p. 3109–3122, 7 ago. 2020.

ZHAO, N.; LI, L.; HUANG, T.; QI, L. Controlled synthesis of PbS-Au nanostar-nanoparticle heterodimers and cap-like Au nanoparticles. **Nanoscale**, v. 2, n. 11, p. 2418–2423, nov. 2010.

ZHAO, X.; ZHU, S.; SONG, Y.; ZHANG, J.; YANG, B. Thermal responsive fluorescent nanocomposites based on carbon dots. **RSC Advances**, v. 5, n. 20, p. 15187–15193, 2015.

ZHU, Y.; JIANG, F. Y.; CHEN, K.; KANG, F.; TANG, Z. K. Size-controlled synthesis of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, n. 34, p. 8549–8553, 25 ago. 2011.