



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

SUNAMITA DA SILVA BARBOSA SANTOS

**Atividade antibacteriana de magnetita (Fe_3O_4) isolada e associada
a campos eletromagnéticos sobre *Escherichia coli* DH5 α pVAX-1
(resistente à canamicina)**

NATAL

2021

SUNAMITA DA SILVA BARBOSA SANTOS

**Atividade antibacteriana de magnetita (Fe_3O_4) isolada e associada
a campos eletromagnéticos sobre *Escherichia coli* DH5 α pVAX-1
(resistente à canamicina)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Marcelo de Sousa Silva
Co-orientador: Artur da Silva Carriço.

NATAL

2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Santos, Sunamita da Silva Barbosa.

Atividade antibacteriana de magnetita (Fe₃O₄) isolada e associada a campos eletromagnéticos sobre *Escherichia coli* DH5a pVAX-1 (resistente à canamicina) / Sunamita da Silva Barbosa Santos. - Natal, 2021.

85 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioítmica e Biologia Molecular, Natal, RN, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Sousa Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Artur da Silva Carriço.

1. Resistência bacteriana - Dissertação. 2. Magnetita - Dissertação. 3. Campo magnético - Dissertação. I. Silva, Marcelo de Sousa. II. Carriço, Artur da Silva. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616-008.87

SUNAMITA DA SILVA BARBOSA SANTOS

Atividade antibacteriana de magnetita (Fe_3O_4) isolada e associada a campos eletromagnéticos sobre *Escherichia coli* DH5 α pVAX-1 (resistente à canamicina)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 30/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Júlio César Pereira Barbosa
Examinador Externo à Instituição – UFERSA

Prof.^a. Dr.^a. Maria Celeste Nunes de Melo
Examinadora Interna ao Programa – UFRN

Prof. Dr. Marcelo de Sousa Silva
Orientador/Presidente – UFRN



Emitido em 30/06/2021

FICHA DE AVALIAÇÃO Nº 5/2021 - BIOQ (17.32)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 19/07/2021 19:47)

MARCELO DE SOUSA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DACT/CCS (15.09)
Matrícula: 2275890

(Assinado digitalmente em 19/07/2021 11:37)

MARIA CELESTE NUNES DE MELO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMP/CB (17.13)
Matrícula: 1452833

(Assinado digitalmente em 19/07/2021 12:02)

JÚLIO CÉSAR PEREIRA BARBOSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 034.374.334-58

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: **5**, ano: **2021**, tipo: **FICHA DE AVALIAÇÃO**, data de emissão: **19/07/2021** e o código de verificação: **0d49f07f74**

*A ciência é muito mais do que um corpo de
conhecimento. É uma maneira de pensar.*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela saúde física e mental, que me permitiram vencer as adversidades encontradas ao longo do caminho.

Aos meus pais, por todo amor e ensinamentos.

Ao meu querido esposo, Robert Wagner, por todo apoio emocional e por todo amor, que foram tão importantes nessa jornada.

Agradeço aos orientadores desse trabalho, professores Marcelo Sousa e Artur Carriço, pelos conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, que acreditamos ter contribuição importante para o conhecimento científico.

Aos colaboradores desse trabalho, professora Maria Celeste Melo por todo apoio oferecido à essa pesquisa, além da disponibilização em tempo integral de seu laboratório; e professor Hugo Alexandre, pelas contribuições ao longo da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, por todos os conhecimentos transmitidos durante o curso.

Às pós-doutorandas, Michelle Aires, pela amizade, carinho e paciência, além de todo conhecimento transmitido e de todo apoio de perto ao longo dessa pesquisa; e Elizabeth Santos, por todas as orientações e auxílio, além de toda a paciência ao longo dessa jornada.

Às colegas de laboratório, pela amizade e carinho, além de apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES e UFRN, pelo apoio financeiro.

**Atividade antibacteriana de magnetita (Fe₃O₄) isolada e associada
a campos eletromagnéticos sobre *Escherichia coli* DH5α pVAX-1
(resistente à canamicina)**

RESUMO

Devido ao aumento da resistência bacteriana nos últimos anos, tem tornado necessário a pesquisa e desenvolvimento de terapias antibacterianas alternativas e, nesse sentido, o uso de campo magnéticos tem sido explorados por tratar-se de uma terapia não farmacológica e, por isso, provavelmente isenta dos efeitos moleculares do fenômeno de resistência. Paralelamente, nanopartículas com propriedades magnéticas, em especial a magnetita (Fe₃O₄), são ainda pouco exploradas quanto ao potencial antibacteriano. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou as propriedades antibacterianas intrínsecas de nanopartículas de magnetita, sintetizadas por moagem de alta energia, e da sua associação com um campo magnético externo variável de 70 mT a 10 Hz sobre *Escherichia coli* DH5α pVAX-1. Após a síntese, as nanopartículas foram caracterizadas quanto sua composição e tamanho primário, por difração de raio-X (DRX); quanto ao seu tamanho hidrodinâmico, por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e quanto à sua carga superficial, por potencial zeta. Posteriormente, os ensaios *in vitro* foram realizados, nos quais foram investigadas alterações na curva de inibição bacteriana; na morfologia bacteriana, por meio de microscopia (MEV), e na carga de superfície bacteriana, utilizando potencial zeta. A associação entre o antibiótico canamicina e magnetita também foi avaliado quanto ao efeito potencializado entre as substâncias. A exposição à magnetita isolada, ou combinada ao campo magnético gerou efeitos bacteriostáticos significativos, além de alterações morfológicas na superfície bacteriana e aumento no potencial zeta da suspensão. O uso de nanopartículas de magnetita também potencializou o efeito inibitório do antibiótico canamicina, apontando para o uma segunda opção de uso, como coadjuvante na terapia antibiótica. Os resultados apresentados revelam potencial antimicrobiano importante e ensaios *in vivo* adicionais são necessários para comprovar a importância dos efeitos observados num sistema biológico.

Palavras-chave: resistência bacteriana, magnetita, campo magnético.

Antibacterial activity of magnetite (Fe₃O₄) isolated and associated with electromagnetic fields on *Escherichia coli* DH5α pVAX-1 (resistant to kanamycin)

ABSTRACT

Due to the increase in bacterial resistance in recent years, research and development of alternative antibacterial therapies has become necessary and, in this sense, the use of magnetic fields has been explored as it is a non-pharmacological therapy and, therefore, probably exempt of the molecular effects of the resistance phenomenon. At the same time, nanoparticles with magnetic properties, especially magnetite (Fe₃O₄), are still little explored in terms of their antibacterial potential. In this context, the present work evaluated the intrinsic antibacterial properties of magnetite nanoparticles, synthesized by high-energy milling, and their association with a variable external magnetic field of 70 mT at 10 Hz on *Escherichia coli* DH5α pVAX-1. After synthesis, the nanoparticles were characterized as to their composition and primary size, by X-ray diffraction (XRD); as to its hydrodynamic size, by dynamic light scattering (DLS) and as to its surface charge, by zeta potential. Subsequently, *in vitro* assays were performed, in which alterations in the bacterial inhibition curve were investigated; in bacterial morphology, using microscopy (SEM), and in bacterial surface load, using zeta potential. The association between the antibiotic kanamycin and magnetite was also evaluated regarding the potentiated effect between the substances. Exposure to isolated magnetite, or combined to a magnetic field, generated significant bacteriostatic effects, in addition to morphological changes in the bacterial surface and an increase in the zeta potential of the suspension. The use of magnetite nanoparticles also potentiated the inhibitory effect of the antibiotic kanamycin, pointing to a second option for use as an adjunct to antibiotic therapy. The results presented reveal important antimicrobial potential and additional *in vivo* tests are needed to prove the importance of the effects observed in a biological system.

Keywords: bacterial resistance, magnetite, magnetic field.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Classificação de bactérias resistentes a antibióticos.....	16
FIGURA 2	Representação esquemática do sistema de moagem de pós.....	29
FIGURA 3	Representação do campo eletromagnético utilizado nos ensaios.....	31
FIGURA 4	Representação esquemática da estrutura do plasmídeo pVAX-1.....	32
FIGURA 5	Composição dos cristais de óxido ferro obtidos por moagem e analisados por DRX.....	38
FIGURA 6	Gráfico do campo eletromagnético (70 mT, 10 Hz) de caráter não-homogêneo.....	40
FIGURA 7	Concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo.....	40
FIGURA 8	CURVA de crescimento normal de <i>E. coli</i> DH5 α pVAX-1 para verificação da fase logarítmica.....	41
FIGURA 9	Curvas de inibição de <i>E. coli</i> DH5 α pVAX-1 expostas a nanopartículas de Fe ₃ O ₄ isoladas ou associadas ao CEM – FEB.....	42
FIGURA 10	Placas com ágar contendo colônias bacterianas crescidas após 24 de incubação.....	43
FIGURA 11	Ensaio de sinergismo Canamicina + Nanopartículas Fe ₃ O ₄ (24h).....	44
FIGURA 12	Ensaio de viabilidade bacteriana em placa (24 horas) dos ensaio de curva de inibição.....	46
FIGURA 13	Viabilidade celular do ensaio de combinação de Fe ₃ O ₄ com canamicina.....	47
FIGURA 14	Microscopia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> DH5 α pVAX-1 tratada com Fe ₃ O ₄ isolada e com campo eletromagnético isolado.....	48
FIGURA SUPLEMENTAR 1	Campo magnético estático (B = 400 mT) utilizado nos ensaios de triagem.....	75
FIGURA SUPLEMENTAR 2	Ensaio de triagem: Curva de inibição.....	75
FIGURA SUPLEMENTAR 3	Ensaio de triagem: Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Classificação de campos eletromagnéticos de acordo com a frequência...	19
TABELA 2 Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ em caldo LB puro e em caldo LB contendo 10% de soro fetal bovino.....	39
TABELA 3 Concentração inibitória mínima (CIM) da nanopartícula Fe ₃ O ₄ sobre <i>Escherichia coli</i> DH5α pVAX-1 e teste de viabilidade em 24 horas.....	45
TABELA 4 Ensaio de viabilidade bacteriana em placa (24 horas) dos ensaio de curva de inibição.....	45
TABELA 5 Ensaio de viabilidade bacteriana em placa após combinação de Fe ₃ O ₄ com canamicina.....	46
TABELA 6 Potencial zeta de suspensões de <i>E. coli</i> DH5α pVAX-1 tratadas com Fe ₃ O ₄ a 96 mg/mL e 192 mg/mL, isolados ou combinado ao campo eletromagnético de (B = 70 mT; f = 10 Hz)	49

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS / SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	Intensidade do campo magnético
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CA	Corrente Alternada
CC	Corrente Contínua
CEM	Campo Eletromagnético
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês: <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
dp	Diâmetros Médios
DRX	Difração de Raio-X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
ESBL	β -lactamases de Espectro Estendido
<i>f</i>	Frequência
Fe₃O₄	Óxido de ferro (Magnetita)
FEB	Frequência Extremamente Baixa
γ-Fe₂O₃	Óxido de ferro (Maghemita)
Hz	Hertz (unidade de frequência)
ITU	Infecção do Trato Urinário
<i>lag</i>	Adaptação (fase)
LB	Luria Bertani (caldo)
<i>log</i>	Logarítmica (fase)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ms	Milissegundo

mT	MiliTesla
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês: <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pVAX-1	Plasmídeo para resistência à canamicina
RAM	Resistência aos Antimicrobianos
REM	Recompensa por Entrada no Mercado
RIC	Ressonância de Íon Cíclotron
RPM	Rotações Por Minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sistema Internacional de Medidas
T	Tesla (unidade de campo magnético)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta
V/m	Volt / metro (unidade de campo elétrico)
v/v	Volume/volume (proporção)
ζ	Potencial Zeta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Resistência antimicrobiana	13
1.2. Efeitos antimicrobianos de campos magnéticos	17
1.3. Efeitos biológicos de nanopartículas de magnetita.....	22
2. Justificativa.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Geral.....	28
3.2. Específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Síntese das nanopartículas de magnetita.....	29
4.2. Caracterização das nanopartículas de magnetita.....	30
4.2.1. Determinação da composição e tamanho primário das nanopartículas de magnetita	30
4.2.2. Determinação do tamanho dos hidrodinâmico das nanopartículas de magnetita (aglomerados).....	30
4.3. Determinação da carga superficial das nanopartículas de magnetitas	31
4.4. Aparato para geração de um campo eletromagnético	31
4.4.1. Caracterização física do Campo Eletromagnético de Frequência Extremamente Baixa (CEM-FEB) utilizado nos ensaios microbiológicos.....	32
4.5. Determinação da atividade antibacteriana das nanopartículas de magnetita ...	33
4.5.1. Modelo experimental para avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de magnetita em <i>E. coli</i> DH5 α	33
4.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de magnetita sobre <i>E. coli</i> DH5 α	34
4.5.3. Determinação das cinéticas de crescimento, inibição e morte de <i>E. coli</i> DH5 α expostas a nanopartículas de magnetita	34
i. Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> DH5 α	34
ii. Cinética de inibição de <i>E. coli</i> DH5 α	35
iii. Cinética de morte de <i>E. coli</i> DH5 α	35
4.5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana da combinação entre nanopartículas de magnetitas e canamicina na inibição de crescimento bacteriano	35
4.5.5. Avaliação da viabilidade de suspensões bacterianas submetidas à magnetita e CEM-FEB.....	36
4.6. Avaliação da morfológica de <i>E. coli</i> DH5 α submetida à magnetita e ao CEM-FEB bacteriana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37

4.7. Avaliação de alteração do potencial zeta de suspensões de <i>E. coli</i> DH5 α expostas à magnetita e ao CEM-FEB	37
5. Análises estatísticas dos dados	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Caracterização das nanopartículas de magnetita.....	39
6.2. Caracterização física do CEM-FEB nos ensaios microbiológicos	40
6.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de <i>E. coli</i> DH5 α expostas nanopartículas de magnetita	41
6.4. Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> DH5 α expostas nanopartículas de magnetita	41
6.5. Cinética de inibição de <i>E. coli</i> DH5 α expostas nanopartículas de magnetita.....	42
6.6. Curva de morte de nanopartículas de magnetita sobre <i>E. coli</i> DH5 α	44
6.7. Combinação de magnetita com antibiótico canamicina	44
6.8. Viabilidade celular	46
6.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
6.10. Potencial zeta de suspensões de <i>E. coli</i> DH5 α expostas a nanopartículas de magnetita e CEM-FEB.....	50
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
10. APÊNDICE	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência antimicrobiana

O uso inadequado dos antibióticos ao longo dos anos, resultou no surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana e no maior número de espécies resistentes, causando infecções de grande impacto na saúde pública (ANDERSSON, 2003) pois a resistência crescente limita as possibilidades de tratamento (RATHER et al, 2017).

Organismos resistentes aos antibióticos surgem devido a mutações e por transferência gênica horizontal (DJIDJOU-DEMASSE et al, 2021). A resistência bacteriana advinda de mutações se divide em estáveis ou induzidas. As mutações estáveis referem-se à mutações em locais específicos do DNA, que escaparam dos mecanismos de reparos e estão permanentemente presentes numa determinada espécie bacteriana. Apesar disso, a taxa de ocorrência dessas mutações pode ser aumentada quando há exposição a fatores estressantes, como terapia antimicrobiana, de modo a selecionar alterações benéficas às bactérias (VISSER, 2002).

As mutações induzidas, ocorrem pelo estímulo da taxa de mutações benéficas sem a geração de mutação deletérias. Diferente das mutações estáveis, estas somente ocorrem sob situações de estresse, como quando há exposição a antibióticos ou à falta de um nutriente crucial (McKENZIE E ROSENBERG, 2001). Essas mutações também podem ser geradas por amplificação da mutagênese, em que clones mutantes surgem quando há pressão seletiva, e ocorre um crescimento acelerado à medida em que a amplificação seletiva do gene aumenta o número de cópias do mutante benéfico à cepa (KOFOID et al, 2003). Uma última forma gerar mutações induzidas, é quando há exposição bacteriana a agentes mutagênicos e esses causariam alterações em regiões do DNA, que poderiam ser selecionadas para as próximas gerações (BJORKMAN et al, 2000; YSERN et al, 1990; REN et al, 1999).

A resistência gerada por transferência gênica horizontal pode ocorrer por três mecanismos: transformação natural, em que ocorre absorção de DNA livre em bactérias competentes; transdução, em que há transferência de DNA bacteriano entre uma bactéria infectada por bacteriófago e uma bactéria suscetível ao bacteriófago; e, por fim, conjugação, em que há transferência de elementos genéticos móveis (plasmídeos) por

estruturas pili montadas entre duas bactérias localizadas adjacientemente (THOMAS E NIELSEN, 2005). A conjugação constitui a forma mais comum de transferência gênica horizontal e permite que muitas espécies bacterianas possam transmitir plasmídeos codificantes de genes de resistência a antibióticos (CARATTOLI et al, 2012; DJIDJOU-DEMASSE et al, 2021).

Independentemente do mecanismo de resistência, o fato é que o uso abusivo dos antibacterianos tem contribuição importante para o surgimento de resistência bacteriana e essa tornou-se um fenômeno comum que contribui para o reaparecimento de doenças infecciosas que estavam sob controle há vários anos. Adicionalmente, têm surgido bactérias multirresistentes aos fármacos, o que dificulta ainda mais seu tratamento (HAJIPOUR et al, 2012; BLAIR et al, 2015).

O aumento da resistência bacteriana não tem sido acompanhado pela pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, com o lançamento no mercado de novos antibióticos. A prova disso, é que os lipopeptídeos e oxazolidinonas foram as últimas duas novas classes de antibióticos desenvolvidas e aprovadas nos últimos 20 anos e, ainda assim, ambas as classes possuem espectro de ação limitado às bactérias Gram-positivas, deixando uma lacuna quanto à terapia contra as Gram-negativas. As quinolonas foi a última classe de antibiótico lançada para combater os organismos Gram-negativos, tendo sido lançadas em 1962. Quanto ao recente desenvolvimento de novos antibióticos para uso clínico intravenoso, apenas 15 fármacos mostraram atividade contra bactérias Gram-negativas e desses, somente 5 progrediram para os testes de fase três (TACCONELLI et al, 2018), ou seja, é um desenvolvimento bastante lento considerando-se a urgência terapêutica.

Diante dessa situação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou o Plano de Ação Global sobre resistência antimicrobiana que possui como objetivos estimular a “(...) *pesquisa básica e estudos translacionais para apoiar o desenvolvimento de novos tratamentos*” além da “*pesquisa e desenvolvimento de medicamentos inovadores*”. Nesse documento, a organização frisa a urgência em aumentar o investimento no desenvolvimento de novos medicamentos e outras intervenções, além de enfatizar que a falta desse investimento reflete, em parte, o receio de que a resistência se desenvolva rapidamente e que o retorno do investimento por parte da indústria farmacêutica seja limitado. Assim, a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos tem sido visto

como um investimento comercial menos atraente do que aquele de medicamentos para doenças crônicas (OMS, 2015).

Vinte espécies bacterianas resistentes e de interesse clínico, constantes no relatório da OMS (OMS, 2015), foram classificadas numa lista de prioridade em pesquisa e desenvolvimento de acordo com sua mortalidade, possibilidade de tratamento, intensidade de cuidados em saúde e tendência à resistência em 10 anos (Figura 1). Essa lista de priorização mostra diversas espécies de bactérias Gram-negativas no topo da classificação, com pesos finais (%) dos quatro critérios supracitados em cerca de 91%. Essa avaliação sugere que as estratégias de pesquisa e desenvolvimento devem se concentrar em novos antibióticos com espectro de ação específicos contra bactérias Gram-negativas, tanto para as cepas de caráter multirresistentes e quanto para aquelas extensivamente resistentes a fármacos. O caráter emergencial ocorre devido à falta de lançamento de novos antibióticos com ação contra esse grupo de bactérias, e pelo menor número de medicamentos atualmente disponíveis na clínica para tratar bactérias Gram-negativas, quando comparado aos disponíveis contra Gram-positivas (TACCONELLI et al, 2018).

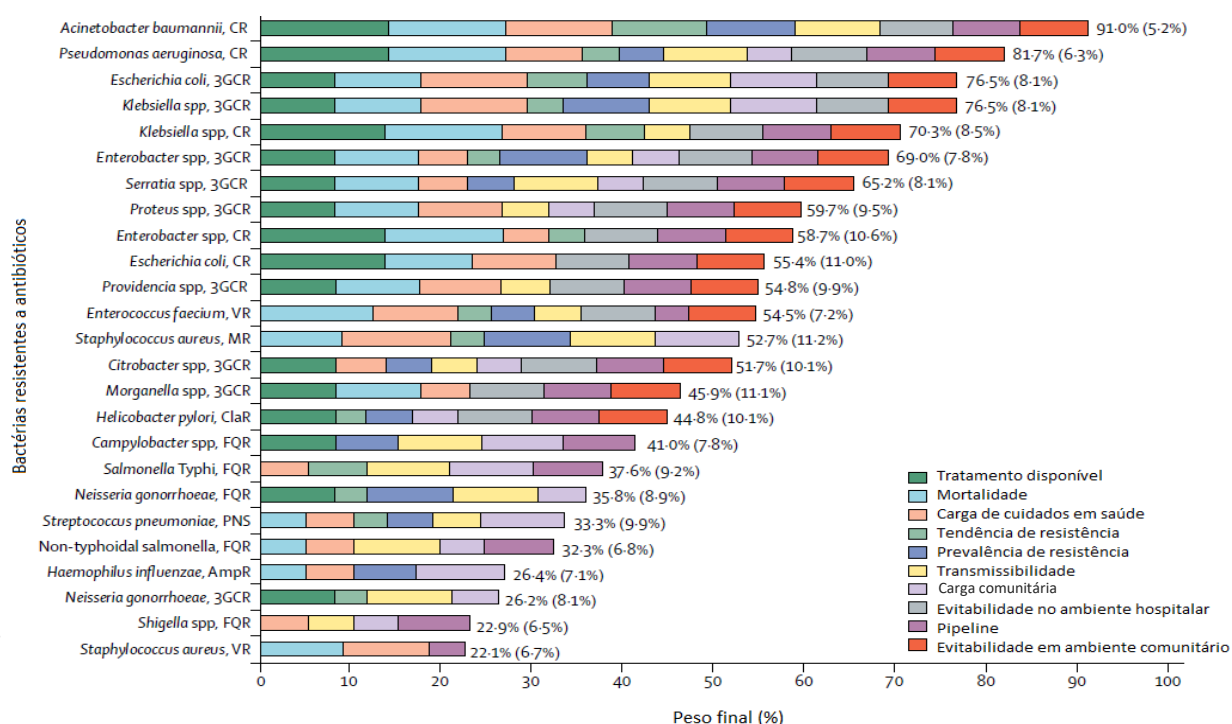


Figura 1: Classificação de bactérias resistentes a antibióticos. Os segmentos de linha representam a contribuição de cada critério para o peso final (%) de cada patógeno. CR = resistente a carbapenemos. 3GCR = resistente à cefalosporina de terceira geração. VR = resistente à vancomicina. MR = resistente à meticilina. ClaR = resistente à claritromicina. FQR = resistente a fluoroquinolona. PNS = não suscetível à penicilina. AmpR = resistente à ampicilina. Adaptado de Taconelli et al 2018.

Quanto aos antibióticos atualmente existentes, carbapenêmicos e fluoroquinolonas constituem uma das últimas linha contra infecções por bacilos Gram-negativos. Apesar disso, a multirresistência a esses grupos têm surgido no mundo todo, devido à proliferação e disseminação de isolados clínicos produtores de enzimas metalo- β -lactamases, utilizando como mecanismo de resistência a mutação em genes específicos (genes *gyrA* e *parC*). Considerando a resistência crescente às classes anteriormente citadas, os aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e canamicina) são um dos últimos grupos de fármacos que mantém ação contra bacilos resistentes, pois possuem grande atividade contra organismos Gram-negativos aeróbios (ANVISA, 2007; ANVISA, 2008).

Apesar de se manterem atuantes contra Gram-negativos, já há relatos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, conforme reportado por Yamane e colaboradores (2005), que identificaram a disseminação nosocomial de *Escherichia coli* resistente aos aminoglicosídeos por produção de metilases (RmtB). A produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (aminoglicosídeos acetiltransferases, aminoglicosídeos fosforilases e aminoglicosídeos adeniltransferases) é o mecanismo de resistência mais comum contra essa classe e são mediados principalmente por transferência plasmidial. Porém, foi descoberto mecanismo adicional, mediado por metilases especiais (metilases RmtA e RmtB) que protegem o rRNA 16S, que constitui o alvo molecular dos aminoglicosídeos e foram verificadas nas cepas de *E. coli* (YAMANE et al, 2005).

A espécie bacteriana *E. coli* está em terceiro lugar na lista de priorização (Figura 1) (TACCONELLI et al, 2018), atrás apenas de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* e é um importante agente de infecções resistentes aos antibióticos na prática clínica (ANAGO et al, 2015).

No âmbito hospitalar, a *E. coli* é a bactéria Gram-negativa que mais comumente causa infecção. Trata-se de um patógeno nosocomial envolvido na sepse Gram-negativa e choque induzido por endotoxina. É isolado em 25% dos casos de infecção urinária, além de estar presente em infecções de feridas, pneumonia em pacientes imunocomprometidos, meningite em neonatos e doenças diarreicas ou gastroenterite (BEREKET et al, 2012). Adicionalmente, tem sido reportado aumento da resistência desses agentes aos antibióticos disponíveis, de modo que o aparecimento de *E. coli* portadora de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) tornou-se bastante comum no

ambiente hospitalar em todo mundo, a partir da década de 1980. Isso representa uma questão clínica importante, pois tais bactérias portadoras de ESBL são resistentes à maioria dos β -lactâmicos de amplo espectro, com exceção dos carbapenêmicos. Uma problemática adicional é que essas cepas são comumente multirresistentes, em que se observa resistência conjunta a outras classes de antibióticos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas (PATERSON e BONOMO, 2005)

As infecções comunitárias, por sua vez, apresentam um perfil de agentes etiológicos bastante diferente dos hospitalares. Apesar disso, assim como nos hospitais, *E. coli* também é um importante causador de infecções urinárias na comunidade (VAN DER STARRE et al, 2011). Tem sido reportado disseminação de *E. coli* comunitária produtora de ESBL, o que representa uma preocupação de saúde pública pois as infecções comunitárias são normalmente tratadas de forma empírica, sem que haja ensaios de susceptibilidade aos antimicrobianos. As classes mais comumente prescritas para esses casos são as cefalosporinas orais e as fluoroquinolonas (DOI et al, 2013), sendo as últimas preferidas para o tratamento oral empírico da infecção febril do trato urinário (ITU). As fluoroquinolonas são recomendadas como agentes de primeira escolha, por possuírem baixo índice de resistência antimicrobiana (TALAN et al, 2008). Mas, apesar desse baixo índice, já tem sido notificado um aumento de *E. coli* comunitária resistente às fluoroquinolonas, o que representa um problema de saúde comunitária pois, limita ainda mais as opções de terapia oral para essas infecções (JOHNSON et al, 2008). O surgimento desses padrões de resistência está intimamente relacionado com o aumento comunitário do consumo de antibióticos, o que foi comprovado por correlações estatísticas que associaram o uso de penicilinas e quinolonas de amplo espectro com o aparecimento da resistência às quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico) (KAHLMETER et al, 2003).

1.2. Efeitos antimicrobianos de campos magnéticos

Sob a justificativa da urgência no desenvolvimento de novos tratamentos frente à resistência bacteriana, muitas pesquisas têm proposto o uso de terapias não-farmacológicas como campos magnéticos visto que não são passíveis de sofrer com os mecanismos moleculares de resistência, pois seu mecanismo de ação não depende de

ligações químicas a estruturas moleculares e não possui alvos moleculares exclusivos, como o que ocorre com os antibióticos convencionais. Nesse sentido, os estudos com campos magnéticos se mostram como uma terapia antimicrobiana promissora (YADOLLAHPOUR et al, 2014; SEGATORE et al, 2012; ALDOSKY et al, 2012; SINGH et al, 1994).

Por definição, campo magnético é a região em volta de um ímã em que ocorrem interações magnéticas (HELERBROCK, 2020; MARCILIO et al, 2009) e ele pode ser estático ou dinâmico. Um campo magnético estático possui densidade de fluxo magnético (B) maior que zero e frequência (f) nula. Em contrapartida, um campo magnético dinâmico é aquele cuja frequência é maior que zero e por isso diz-se que esse tipo de campo varia com o tempo, ou seja, ele não permanece com um valor fixo.

A variação periódica é medida em termos de frequência. No Sistema Internacional de Medidas (SI) o fluxo magnético (B) é medido em tesla (T) e a frequência (f) do campo é medida em hertz (Hz).

Um campo magnético dinâmico pode variar na forma de pulsos, quando um campo magnético é gerado e rapidamente desligado e religado, podendo durar menos de um segundo. Pela lei de Faraday, isso gera um campo elétrico induzido, medido em volt por metro (V/m), e correntes elétricas surgem num material condutor próximo ao campo magnético dinâmico. Esse fenômeno chama-se indução eletromagnética visto que um campo magnético variável (dinâmico) gera um campo elétrico do mesmo modo em que um campo elétrico variável gera um campo magnético. Desse modo surge um campo eletromagnético (CEM) (GREEF, 2005; HEWITT, 2015).

Há diversos tipos de aparatos que geram campos magnéticos, um deles é um ímã permanente que pode ser de materiais e suas ligas como por exemplo ferro, neodímio, ligas metálicas, dentre outros. Esse aparato pode gerar campo magnético estático ou dinâmico. Outro aparato utilizado é um solenoide ou bobina feita de material condutor por onde passa corrente elétrica, que pode ser uma corrente contínua (CC) ou uma corrente alternada (CA) e que também irá induzir um CEM, chamado de eletroímã (HUNT et al, 2009).

Um CEM pode ter diferentes intensidades de fluxo magnético e de fluxo elétrico podendo ser classificados como campos de alta intensidade ou de baixa intensidade, porém a classificação mais comumente utilizada é aquela que leva em consideração a

frequência do campo e não sua intensidade, como mostrado na tabela 1 (SEYBOLD, 2005).

Tabela 1: Classificação de campos eletromagnéticos de acordo com a frequência (Hz). Adaptação de Seybold, 2005.

Frequência	Sigla	Intervalo de frequência
Extremamente Baixa	ELF	< 3 kHz
Muito Baixa	VLF	3 - 30 kHz
Baixa	LF	30 - 300 kHz
Média	MF	300 kHz - 3 MHz
Alta	HF	3 - 30 MHz
Muito Alta	VHF	30 - 300 MHz
Ultra-Alta	UHF	300 MHz - 3 GHz
Super Alta	SHF	3 - 30 GHz
Extremamente Alta	EHF	30 - 300 GHz

De acordo com a frequência, os campos eletromagnéticos se dividem em ionizante e não ionizante. Os campos ionizantes possuem efeitos reconhecidamente deletérios sobre as células e são exemplificados pelos raios cósmicos e raios X, cujas frequências estão na faixa de 10^{18} a 10^{22} Hz. Os campos não-ionizantes também podem gerar danos celulares, e esses são exemplificados pela radiação ultravioleta (UV) com frequência de 10^{16} Hz, e as micro-ondas com frequência na faixa de 10^9 a 10^{11} Hz (CHANG 2003; BERG 2003).

Adicionalmente, há exemplos de radiação não-ionizante com efeitos biológicos desconhecidos como é o caso dos CEM utilizados no rádio e na TV, com frequências na faixa de 10^4 a 10^8 Hz. E, finalmente, os CEM gerados pela rede elétrica e que possui frequências extremamente baixas (FEB) na faixa de 50 a 60 Hz com efeitos que vem sendo muito estudados e que é alvo de muita discussão e debate na comunidade científica (CHANG 2003).

Devido à exposição diária e contínua dos seres humanos a esse tipo de campo, os campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa (CEM-FEB) constituem o

tipo mais explorado na literatura para realizar ensaios biológicos e para verificar aplicações diversas na área de saúde (OMS, 2015; GÓMEZ-RIOS, 2020).

Além da interação de atração comumente conhecida com materiais magnéticos e magnetizáveis como ferro, níquel, e outros (ANUSAVICE, 2013; OLIVEIRA, 2005), os campos magnéticos também são capazes de interagir com moléculas orgânicas e biosistemas gerando respostas celulares mensuráveis. Isso ocorre devido à propriedade diamagnética dessas estruturas que as permitem responder ao campo externo (HU, 2009; ROSEN, 2003).

As respostas biológicas oriundas da interação de campos magnéticos com bactérias são relatadas na literatura. E no quesito terapias antimicrobianas não-farmacológicas, o uso de CEM-FEB vem sendo explorado em diversos trabalhos ao longo dos anos. Diminuição da viabilidade de *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* e *Staphylococcus aureus*; alteração do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus* spp.; modificação da conformação DNA-proteína em *E. coli*; e indução magnética com alteração da expressão gênica num conjunto gênico específico são alguns dos efeitos estudados em bactérias (JUSTO et al, 2006; PAZUR et al, 2007).

O mecanismo exato pelo qual os campos magnéticos exercem efeitos biológicos, incluso os efeitos inibitórios sobre o crescimento bacteriano ainda não está completamente esclarecido. No entanto, há consenso entre os autores quanto aos fatores que afetam o processo de inibição bacteriana: A forma pelo qual um campo magnético exerce ou não um modo inibitório ou estimulador depende de um “efeito janela” que diz respeito à interação complexa entre a frequência do campo (f) versus a intensidade do fluxo magnético (B). Esta interação depende dos parâmetros de campo escolhidos para a exposição das amostras (HUNT et al, 2009) o sistema de geração de fluxo magnético (ímã, bobina, e outros), intensidade do fluxo (B), tipo de fluxo (dinâmico ou estático); orientação dos polos magnéticos (N ou S) e duração da exposição. Adicionalmente, sabe-se que quando se trata de CEM-FEB a conversão de energia em calor, como mecanismo, que poderia gerar morte celular por aquecimento, pode ser descartada por causa da baixa indução na matéria viva (PAZUR et al, 2007; HUNT et al, 2009). Logo, os efeitos inibitórios de campos magnéticos em bactérias e outros biosistemas seriam de caráter não-térmicos.

Os mecanismos físicos para os efeitos magnetotáticos não estão totalmente elucidados devido ao fato de não haver consenso entre os autores nem reprodutibilidade de diversas observações, apesar disso, há fenômenos magnéticos bem descritos. Por exemplo, o processo pelo qual a matéria biológica interage com o campo magnético é chamado de magneto-recepção e ocorre pela propriedade diamagnética que diversas moléculas orgânicas possuem (cadeias acila da bicamada fosfolipídica, DNA purificado, proteínas alfa-hélices transmembrana, proteínas tubulina no citoesqueleto, dentre outras) (ELAHEE et al, 2006). O diamagnetismo refere-se à capacidade das moléculas orgânicas em perceber um campo magnético próximo e serem repelidas por ele, ou seja, na presença de um campo externo elas se afastam (ASKELAND, 2003; WILLIAMS, 2014; FAIZAN, 2017).

As moléculas com suscetibilidade diamagnética sofrem reorientação na presença de um campo magnético, o que causa realinhamento de fosfolipídios na membrana celular, distúrbios nas interações proteína-lipídio membranares, alterações conformacionais em proteínas, deformações nas proteínas canais de transporte iônico e alteração do potencial de membrana. O alinhamento ordenado de tais moléculas com um campo magnético externo, gera uma energia de interação magnética em todo o agregado molecular, o que contribui para a orientação de toda a célula porque a susceptibilidade magnética é conhecida por ter aditividade. Dessa forma o diamagnetismo é um dos responsáveis pelos efeitos biológicos mensuráveis experimentalmente (PAZUR et al, 2007; ELAHEE et al, 2006; ROSEN E ROSEN, 1990) e corresponde ao tipo mais fraco de resposta magnética de um sistema (RIBEIRO, 2000). Essa propriedade não pode ser observada quando o material possui outras duas propriedades: ferromagnetismo ou paramagnetismo (HALLIDAY et al, 2007).

Os efeitos biológicos sobre bactérias podem ocorrer na parede e membrana celular pois um campo estático moderadamente intenso pode produzir moléculas anisotrópicas dentro da membrana celular. A anisotropia refere-se à propriedade geral de moléculas que se reorientam-se na presença de um campo externo e esse efeito na membrana poderia interferir na função dos canais iônicos, que, por sua vez, diminuiriam o potencial da membrana bacteriana (ZABLOTSKII, 2016).

Do ponto de vista físico, há alguns modelos teóricos que explicam a magneto-recepção biológica e os efeitos observados experimentalmente:

i. Mecanismo de par radical: um campo magnético induz a geração de pares tripletos, e isto significa que efetivamente aumenta vida útil longa dos radicais (PAZUR et al, 2007).

ii. Ressonância de íon cíclotron – RIC (e ressonância paramétrica): refere-se ao fenômeno em que campos magnéticos alteram as rotações de íons importantes nas chamadas zonas de transição (tipicamente membranas lipídicas, estruturas proteicas terciárias, organelas celulares) que permitem o movimento iônico em órbitas *lorentizianas* e que são passíveis de serem afetadas pelo campo magnético. As alterações nas órbitas desses íons (por exemplo Ca^{+2} , que está bem descrito na literatura, e Zn^{+2}) gerariam alguns dos efeitos biológicos observados na matéria orgânica exposta a um campo magnético (PAZUR et al, 2007).

iii. Coerência quântica: no mecanismo de coerência quântica, as alterações nas moléculas de água são responsáveis pelos efeitos biológicos do campo magnético. Os dipolos de água espontaneamente se auto organizam em aglomerados ordenados. A eletrodinâmica quântica prevê agregados de dois estados para a água que consiste (i) uma fase a granel, que é determinada pelo equilíbrio térmico (água em movimento *browniano*) e (ii) grupos ou aglomerados ordenados. Em presença de um campo magnético, o movimento iônico entre os aglomerados ordenados sofrem alteração. A importância disso é que a água é o mediador universal dos processos biológicos e por isso teria importância nas repostas biológicas geradas pelos campos magnéticos (PAZUR et al, 2007).

1.3. Efeitos biológicos de nanopartículas de magnetita

Nanopartículas magnéticas são uma subclasse dos nanomateriais, cuja dimensão varia de 10 a 100 nm. A magnetita, cuja fórmula é Fe_3O_4 , possui as propriedades biocompatibilidade e biodegradabilidade e é única nanopartícula – magnética aprovada para uso clínico (como agente de contraste em ressonância magnética) (GONÇALVES, 2017; WATANABE, 2013; PARVEEN, 2012). Atualmente, a pesquisa científica aponta três principais aplicações em saúde da magnetita:

i. Ressonância magnética, em que a magnetita atua como um agente de contraste melhorando a resolução da imagem do exame quando exposta a um campo magnético

externo de alta intensidade (ARSALANI et al, 2019; BAI et al, 2020; ZHELTOVA et al, 2020);

ii. Hipertermia, em que a magnetita é captada por células tumorais e, associada a um campo eletromagnético externo causa aquecimento local inviabilizando tais células e reduzindo a progressão tumoral (ITO, 2006; ITO et al 2003; LI et al, 2010; SUTO, 2009);

iii. Vetorização magnética de fármaco, em que a magnetita é incorporada a um fármaco (ex. antibiótico) ou um substância candidata a fármaco e, com o auxílio de um campo magnético externo, tais nanopartículas são “guiadas” ao local em que o medicamento deve ser depositado, fazendo uma entrega sítio-específica. De todas as aplicações, a entrega de fármaco é a mais explorada na literatura e que exhibe o grande potencial de uso em saúde para as nanopartículas de magnetita (MODY, 2014; POLYAK, 2009; SUN, 2008; DOBSON, 2006).

A entrega sítio-específica diminui a dose necessária de fármaco para a obtenção de um efeito terapêutico, visto que não será necessário que o medicamento seja biodistribuído por todo corpo para que alcance uma concentração local efetiva. O medicamento injetado irá se concentrar num único local, exercendo seu efeito terapêutico, embora a concentração plasmática total permaneça baixa (PATRA et al, 2018).

Após o alcance do efeito terapêutico desejado, o campo magnético externo pode ser retirado causando a redispersão das nanopartículas magnéticas pelo sangue, e seguindo o fluxo sanguíneo de distribuição, a magnetita e o medicamento que ela carrega serão metabolizados e excretados pelo corpo ou se houver necessidade, o elemento ferro (Fe) contido em Fe_3O_4 poderá ser reaproveitado pelas células. Desse modo, o tratamento eficaz em baixas doses diminui o efeito tóxico de uma gama de medicamentos, tornando o tratamento mais seguro (PRAKASH et al, 2019). Sendo assim, a exploração de tal propriedade com antibióticos e substâncias candidatas a terem ação antimicrobiana, a especificidade ao sítio de ação torna possível utilizar doses que geram alta concentração local matando maior proporção de bactérias e sendo um importante aliado na resistência bacteriana.

Numa terapia tradicional, o maior efeito do fármaco só seria possível elevando a dose do antibiótico, o que causaria sérios danos ao paciente, com baixo custo-benefício

(LEWIS E MUELLER, 2014). Portanto, diminuir a dose necessária de um antibiótico, através do uso de carreador, pode ser útil para retomar o uso de medicamentos que se tornaram “obsoletos” devido à baixa eficácia quando utilizados na terapia normal (MUKHERJEE et al, 2016). É importante frisar que essa aplicação só cabe quando se trata de infecções locais (infecção nefrótica, pulmonar, cardíaca, por exemplo) em que a bactéria ainda não chegou à corrente sanguínea causando uma bacteremia e, por conseguinte, sepse.

É importante caracterizar as propriedades magnéticas da matéria que permitem a aplicação da magnetita em saúde. A primeira delas é o ferromagnetismo, que consiste na forte atração das moléculas de ferro por um campo magnético externo. Esse material é capaz de reter parte do campo magnético e isso se mantém mesmo quando ele é retirado, ou seja, se magnetiza permanentemente. Já no paramagnetismo, o material também sofre atração por um campo externo e gera um campo magnético próprio ao seu redor, mas não retém a magnetização quando o campo externo é afastado. Ambos os tipos correspondem a uma resposta magnética forte (HALLIDAY et al, 2007; FAIZAN, 2017).

A aplicação de entrega sítio-específica só é possível porque nanopartículas de magnetita com diâmetro até 25 nm, possuem a propriedade superparamagnética que a permite ser atraída e magnetizada transitoriamente por um campo magnético externo (LIU et al, 2006). Isso significa que além de atraída, a magnetita passa a gerar um campo magnético próprio e que é capaz de agir localmente (WANG et al, 2004). Essa ação ocorre apenas ao redor da nanopartícula, com raio de alcance do tamanho do raio da partícula, ou seja, se ela possuir 10 nm de diâmetro o campo magnético por ela gerado irá atuar num raio de 5 nm ao redor dessa partícula. Essa magnetização se mantém apenas com a presença do campo externo, de modo que quando este é removido, as nanopartículas se dispersam e deixam de gerar seu próprio campo magnético (WEAVER et al, 2008; BIEDER et al, 2009).

Caso a nanopartícula ultrapasse os 25 nm de diâmetro, ela passa a possuir a propriedade de ferromagnetismo e, nesse caso, ela retém a magnetização mesmo quando o campo externo é retirado (LIU et al, 2006; LEE et al, 1996). Isso não é adequado, visto que as partículas começarão a atrair-se mutuamente gerando partículas maiores e fora da escala nanométrica, podendo obstruir a microcirculação. Nessa condição, a nanopartícula é inútil para a entrega de fármacos ou para qualquer aplicação em saúde

que precise ser injetada, devido aos riscos superarem seus benefícios. Por isso, o fator tamanho é de extrema importância quando se pensa nas nanopartículas de magnetita (LEE et al, 2013).

O campo magnético externo, utilizado com a função de guiar Fe_3O_4 , gera resposta em diversos biosistemas (ALDOSKY et al, 2012; ALI et al, 2014) mas, apesar disso, não seria capaz de agir sozinho sobre um tecido infectado num ensaio *in vivo* devido à sua distância com o local. Assim é possível que sua ação seja mais significativa sobre a magnetita por ser um material paramagnético conferindo uma força forte, diferente das células e moléculas orgânicas que são diamagnéticas e conferem força fraca. Porém, um campo magnético gerado por magnetita no local infectado está próximo à parede bacteriana, podendo ter ação biológica *in vivo* permitindo sua exploração como antimicrobianos locais agindo apenas no sítio de infecção, já que possuem curto raio de ação (KIM et al, 2013).

A literatura tem descrito a atividade antimicrobiana de nanopartículas magnéticas, principalmente quando funcionalizadas, ou seja, modificadas superficialmente com outras moléculas, ocasionando destruição local das bactérias, e com isso, diminuindo as chances de haver toxicidade ao tecido circundante (HAJIPOUR et al, 2012), mas não explora a magnetita em si, sem funcionalização ou carregando um fármaco antibiótico. Portanto, explorar o efeito biológico isolado das nanopartículas de magnetita (magnetizadas por um campo externo) para verificar sua possível aplicação na terapia antimicrobiana trará contribuições importantes para a área microbiologia médica.

2. Justificativa

O lançamento no mercado de novos antimicrobianos com novos sítios-alvos não solucionou a problemática da resistência aos antimicrobianos devido ao uso irracional destes medicamentos. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a resistência antimicrobiana como uma “ameaça crescente à saúde global” e enfatiza a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novas ferramentas contra os microorganismos multirresistentes (OMS, 2015).

Nesse contexto, o desenvolvimento de terapias antimicrobianas não-farmacológicas e estudar seus efeitos inibitórios quanto às alterações metabólicas, gênicas e morfológicas faz-se necessário. Estudos dessa natureza são relevantes, pelo fato dessas terapias atuarem por mecanismos diferentes dos fármacos. A ação antibacteriana dos campos eletromagnéticos (tanto próprios quanto gerados por nanopartículas magnéticas) ocorre por interações físicas e não se deve a mecanismos de ligação molécula-molécula e que, por isso, não sofre os efeitos dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias (BARROS et al, 2013; OMS, 2015; ROSEN, 2003; ROSEN, 1993).

Nesse estudo, enfatiza-se o desenvolvimento de uma terapia antibacteriana não-farmacológica útil sobre bactérias Gram-negativas, através de um modelo experimental para ação de nanopartículas magnéticas e campo eletromagnético sobre cepas sensíveis e resistentes. Para tanto, os ensaios foram realizados com *Escherichia coli* DH5 α sensíveis e resistentes a antibióticos, através da transformação bacteriana com o plasmídeo pVAX-1 que confere resistência a canamicina. Apesar da canamicina ter se tornado obsoleta na prática clínica devido à sua alta toxicidade (ototoxicidade e nefrotoxicidade), comparada aos demais fármacos de seu grupo (GOODMAN E GILMAN, 2012), ela é bastante utilizada na pesquisa científica para ensaios de resistência. Adicionalmente, clinicamente a classe de aminoglicosídeos como um todo permanece sendo de extrema importância no combate às infecções provocadas por Gram-negativos (ANVISA, 2007). Portanto, neste estudo *E. coli* foram expostas à terapia não-farmacológica e a resposta inibitória foi avaliada, junto às alterações morfológicas e elétricas.

Adicionalmente, é importante frisar que esse trabalho se refere exclusivamente aos campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa (CEM-FEB) com possibilidade de aplicação como terapia antimicrobiana. O fato desses campos magnéticos não terem energia suficiente, não são capazes de causar quebra de ligações químicas, o que é um dado relevante quando se pensa em aplicações biológicas. A capacidade de quebrar ligações químicas, ocasionadas somente pelas radiações ionizantes e de alta frequência, podem gerar efeitos celulares deletérios e inclusive câncer, sendo por isso inadequados para ensaios de objetivo biomédico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos antibacterianos de nanopartículas magnéticas isoladas ou associadas a um campo eletromagnético sobre *Escherichia coli* DH5 α contendo um plasmídeo de resistência a canamicina – pVAX1.

3.2. Específicos

i. Otimizar o modelo experimental, quanto aos diversos tipos de campos magnéticos, para avaliação da inibição de crescimento em *Escherichia coli* DH5 α resistente (portadora do plasmídeo pVAX-1) *versus* sensível ao antibiótico Canamicina;

ii. Avaliar possíveis alterações na membrana bacteriana das células expostas ao campo eletromagnético isolado e combinado a nanopartículas de magnetita por meio da análise de potencial zeta;

iii. Verificar alterações no metabolismo celular bacteriano das células expostas ao campo eletromagnético isolado e combinado a nanopartículas de magnetita, por meio da metabolização da resazurina;

iv. Avaliar possíveis alterações morfológicas a nível da parede celular bacteriana decorridas da exposição ao campo eletromagnético isolado e combinado a magnetita por meio da microscopia eletrônica de varredura.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese das nanopartículas de magnetita

Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foram produzidas por adaptação do método de moagem de alta energia (CARVALHO, 2013) no Departamento de Física Teórica e Experimental (DFTE) da UFRN. A moagem foi realizada por meio da fricção de esferas metálicas sobre os reagentes em pó. Resumidamente, ferro inorgânico (Fe) foi pesado em balança analítica na proporção massa-esfera 1:10, e posteriormente adicionado água destilada, obedecendo a estequiometria da reação: $3 Fe + 4 H_2O \rightarrow Fe_3O_4 + 4 H_2$. A mistura de ferro e água foi transferida ao cadinho de aço inoxidável de 45 cm^3 de capacidade, contendo dez esferas de mesmo material. A moagem foi realizada em Moinho de Bolas Planetário (Fritsch Pulverisette 6) a 400 rpm durante 96 ciclos de 60 minutos, com pausa de 10 minutos cada (Figura 2).

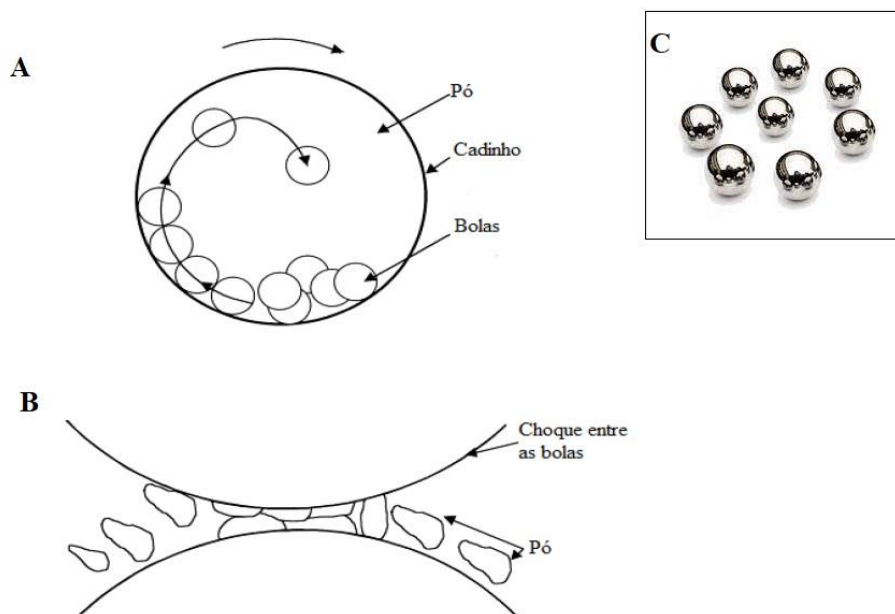


Figura 2: Representação esquemática do sistema de moagem de pós. A – Esferas metálicas são adicionadas ao cadinho, juntamente ao pó de ferro (Fe^0) e H_2O . O moinho é ligado à rotação de 400 rpm e as esferas friccionam os reagentes afim de gerar óxidos de ferro ao final do processo. B – Demonstração da fricção entre as esferas e o pó na moagem. C – Esferas metálicas utilizadas nesse experimento (2 g cada).

4.2. Caracterização das nanopartículas de magnetita

As nanopartículas obtidas de magnetita foram caracterizadas quanto à composição e tamanho primário, por difração de raio-X (DRX), quanto ao tamanho dos aglomerados, por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e quanto à sua carga de superfície, por potencial zeta. Os dados foram apresentados em difratograma (DRX) e em tabelas contendo os valores obtidos (DLS e potencial zeta).

4.2.1. Determinação da composição e tamanho primário das nanopartículas de magnetita

O perfil de difração de raios-X (DRX) das amostras de nanopartículas preparadas caracterizadas quanto à estrutura de cristal e sua composição quanto à porcentagem de magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e ferro, conforme descrito por Carvalho (2013). Para isso, a análise foi procedida em um difratômetro Rigaku Uniflex II (Rigaku, Japão), operado com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0,1540 \text{ \AA}$) e passo de $0,05^\circ$ à velocidade de 5 min^{-1} , no intervalo de $10^\circ < 2\Theta < 90^\circ$ à temperatura ambiente. Adicionalmente, verificou-se o tamanho dos cristais obtidos, ou seja, o tamanho do pó resultante da moagem. Os diâmetros médios (d_p) dos cristais foram estimados utilizando a equação de Scherrer, empregando um fator de forma de 0,89 para partículas de magnetita esféricas. O *software* X'Pert HighScore foi utilizado para analisar o difratograma obtido.

4.2.2. Determinação do tamanho dos hidrodinâmico das nanopartículas de magnetita (aglomerados)

A avaliação do tamanho hidrodinâmico, que se refere ao diâmetro da partícula em suspensão junto à espessura da camada dupla de solvente circundante, foi realizada utilizando o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) por adaptação do protocolo de Vikesland e colaboradores (2016). Resumidamente, suspensões de nanopartículas de 1 a 192 mg/mL foram suspensas em caldo Luria Bertani (LB) puro e em caldo LB contendo 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), e transferidas para uma cubeta de vidro. As medições foram conduzidas a 25° C e a $\text{pH} = 7,4 \pm 0,5$ utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido).

4.3. Determinação da carga superficial das nanopartículas de magnetitas

A carga superficial das nanopartículas de magnetitas foi obtida pela determinação do potencial Zeta (ζ) (ABD EL-MAGEE et al, 2020; FAVELA-CAMACHO et al, 2019) a partir das suspensões em caldo LB puro e em caldo LB contendo 10% de SFB, na concentração de 5 mg/mL, às quais foram transferidas para cubetas de plástico com o eletrodo. O ensaio foi realizada com o analisador de potencial zeta ZetaPlus® (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) e procedida com o *software* de dimensionamento de partículas Zeta Analyzer (Malvern zetasizer ZEN1600).

4.4. Aparato para geração de um campo eletromagnético

Campos eletromagnéticos foram gerados por um equipamento denominado Carrossel Magnético, o qual foi desenvolvido pelo Grupo de Magnetismo e Materiais Magnéticos (GMMM) do Departamento de Física (DFIS) da UFRN, especialmente para os ensaios.

O Carrossel consiste em um sistema de polias (representado esquematicamente na Figura 3), no qual 16 ímãs de neodímio-boro (diâmetro = 22 mm; espessura = 10 mm) foram fixados em disposição norte-sul (N-S). O sistema de polias é conectado por eixo central à rede elétrica, e gira em baixas frequências (0-100 Hz), gerando um campo eletromagnético entre os pares de ímãs. Na parte superior, um porta-amostras de alumínio com 12 cavidades foi fixado para acoplamento de tubos cônicos, com 200 μ L de capacidade, entre os pares de ímãs. O suporte da amostra não está conectado ao eixo central do carrossel e está sujeito à ação do campo gerado quando os ímãs são girados.

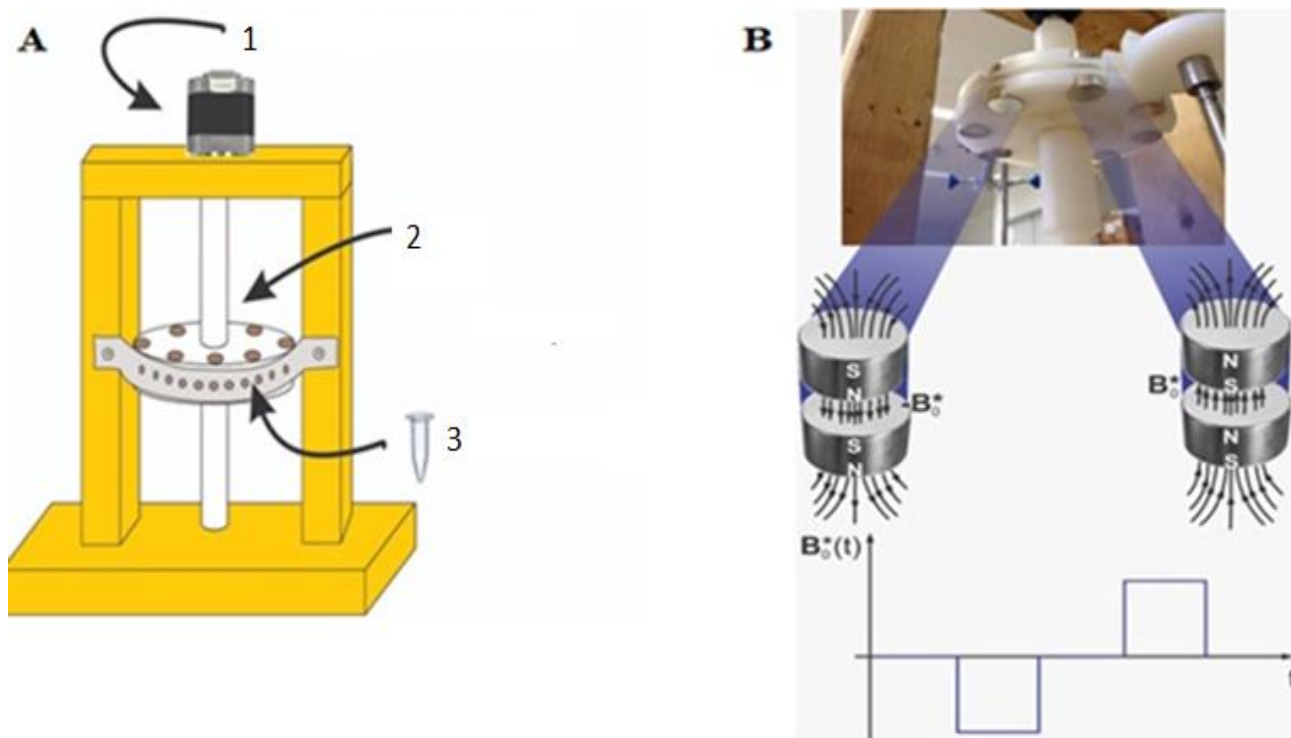


Figura 3: Representação do campo eletromagnético utilizado nos ensaios. A – Representação esquemática do equipamento (Carrossel magnético): 1) Motor de passo Nema 23; 2) Carrapeta; 3) Porta-microtubo. B – Um campo eletromagnético (B) é gerado através de ímãs permanentes de neodímio de 400 mT, dispostos alternadamente aos pares (N-S), e que giram em frequências de 0 a 100 mT. Devido à disposição dos ímãs, B se alterna em positivo (+) e negativo (-), conforme passa o tempo e é mostrado no gráfico $B_0^*(t) \times t$.

4.1.1. Caracterização física do Campo Eletromagnético de Frequência Extremamente Baixa (CEM-FEB) utilizado nos ensaios microbiológicos

A frequência de 10 Hz foi escolhida para a realização dos ensaios de inibição bacteriana, baseado em resultados anteriores obtidos pelo grupo (SANTOS, 2020). Sendo assim, o método de caracterização do campo magnético gerado consistiu em ligar o equipamento à rede elétrica (220 V), e ajustar a frequência do ensaio. Na região do porta-amostra (sulco entre o par de ímãs) é gerado o campo eletromagnético, e esse foi medido com o auxílio de um teslâmetro digital (Koshava 3, München, Germany) colocando seu sensor dentro de um tubo cônico no porta-amostra.

4.5. Determinação da atividade antibacteriana das nanopartículas de magnetita

A avaliação da atividade antibacteriana das nanopartículas de magnetitas foi realizada submetendo *E. coli* DH5 α pVAX-1 a nanopartículas de magnetitas, nas concentrações de 1,5 a 192 mg/mL, isoladas e associadas a campos eletromagnéticos (70 mT, 10 Hz) por um período de 0 a 24 horas, no qual foi observado o crescimento bacteriano, relativo ao controle negativo. Desse modo, a concentração de nanopartícula mais efetiva foi escolhida para as análises seguintes (Fig. Supl. 3).

4.5.1. Modelo experimental para avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de magnetita em *E. coli* DH5 α

Cepas de *Escherichia coli* DH5 α foram obtidas da coleção de micro-organismos do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Ciências da Saúde (UFRN) e transformadas com o plasmídeo pVAX-1 (TIWARI et al, 2015), que confere resistência ao aminoglicosídeo canamicina na concentração de 30 μ g/mL (Figura 4). Para manter a resistência atribuída pelo plasmídeo pVAX-1, e evitar a contaminação por outros micro-organismos, a inoculação da bactéria foi realizada em caldo LB contendo o antibiótico. As cepas foram acondicionadas a -80°C e um estoque de bactérias transformadas foi mantido a -20°C para ser utilizado nos experimentos.

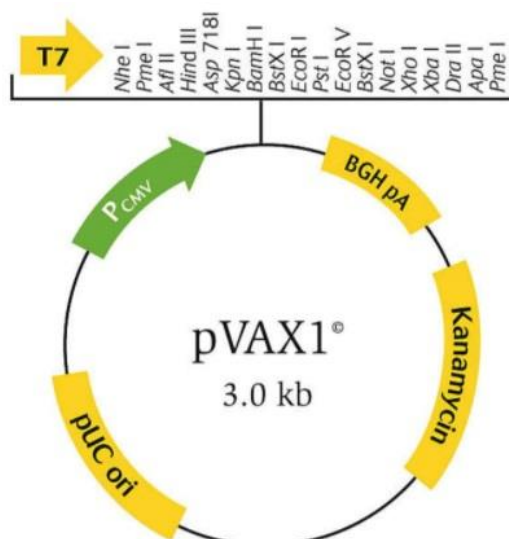


Figura 4: Representação esquemática da estrutura do plasmídeo pVAX-1 (Invitrogen). A sequência gênica que confere resistência à canamicina para seleção de *E. coli* na concentração de 30 μ g/mL é mostrada.

E. coli DH5 α pVAX-1 criopreservadas foram mantidas em meio LB a 37°C durante 18 a 24 horas (*overnight*), com posterior semeadura em ágar LB, incubadas por 24 horas a fim de ser obtidos colônias isoladas. Antes de cada ensaio, 3 a 4 colônias bacterianas foram suspensas em caldo LB e incubadas por 18 a 24 horas, seguido do ajuste do inóculo bacteriano de acordo com a densidade óptica (DO) de 0,08 – 0,1 (600 nm) equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após essa etapa, o inóculo foi submetido aos tratamentos com magnetita e campo magnético para avaliação antibacteriana.

4.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de magnetita sobre *E. coli* DH5 α

Suspensões bacterianas contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* DH5 α foram expostas a concentrações crescentes de nanopartículas de magnetita (1,5 – 192 mg/mL), isoladamente, e à combinação nanopartículas e campo eletromagnético. As suspensões foram incubadas durante 24 horas e, as nanopartículas foram retiradas do tubo cônico com o auxílio de um ímã externo, com posterior adição da resazurina na proporção de 1:10 (v/v). Após 20 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro de microplaca (BioTek® Epoch) a 570 e 600 nm. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração que mostrou-se visualmente semelhante ao controle negativo, quanto à coloração arroxeadada da resazurina.

4.5.3. Determinação das cinéticas de crescimento, inibição e morte de *E. coli* DH5 α expostas a nanopartículas de magnetita

i. Cinética de crescimento de *E. coli* DH5 α

O padrão de crescimento da *E. coli* foi avaliado por meio de uma curva de crescimento durante 24 horas e, para isso, suspensões bacterianas contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foram incubadas durante 24 horas e nos intervalos de tempo de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 24 h, alíquotas de 200 μ L foram transferidas para placa 96 poços e a densidade ótica foi lida a 600 nm em espectrofotômetro de microplaca (BioTek® Epoch). Os valores médios obtidos em cada horário de mensuração foram plotados no gráfico (a densidade ótica ficaram no eixo y e o tempo de exposição, no eixo x).

ii. Cinética de inibição de *E. coli* DH5 α

Suspensões bacterianas com densidade ótica ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foram utilizadas para os testes, e alíquotas em triplicata de 200 μ L foram expostas às nanopartículas de magnetita nas concentrações de 24 a 192 mg/mL durante 2h, 4h, 6h, 8h e 24h, para avaliação da curva. A concentração de 96 mg/mL foi ensaiada isoladamente e combinada ao campo magnético dinâmico de 70 mT e 10 Hz, e as demais concentrações foram testadas apenas em combinação com o campo magnético. Ao término do tempo de exposição foi adicionado resazurina às suspensões bacterianas na proporção 1:10 (v/v) e, após 10 a 20 minutos, a DO foi lida em 570 e 600 nm em espectrofotômetro de microplaca (BioTek® Epoch).

iii. Cinética de morte de *E. coli* DH5 α

Para o ensaio de curva de morte, suspensões bacterianas contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de bactérias foram expostas às nanopartículas de magnetita nas concentrações de 24 a 192 mg/mL (isoladamente e combinada ao campo magnético dinâmico de 70 mT e 10 Hz) durante 2h, 4h, 6h, 8h e 24h. As suspensões, posteriormente, foram diluídas para 1:1000, 1:10000 e 1:100000 (v/v) e alíquotas de 100 μ L foram inoculadas em placa contendo ágar de contagem com auxílio da alça de *Drigalski*, seguido de incubação a 37°C por 24 h. As colônias foram contadas e o resultado obtido foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL), com elaboração da curva de morte bacteriana. As contagens foram comparadas com o controle negativo.

4.5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana da combinação entre nanopartículas de magnetitas e canamicina na inibição de crescimento bacteriano

Suspensão bacteriana de *E. coli* DH5 α pVAX-1 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi adicionada em placa com 96 poços e submetidas à ação isolada do antibiótico canamicina e à combinação entre nanopartículas de magnetita com canamicina. As nanopartículas foram utilizadas em duas concentrações (96 e 192 mg/mL) e a canamicina nas concentrações de 4 a 512 μ g/mL (CLSI, 2017), incubadas a 37°C por 24

horas. O controle negativo se refere às bactérias expostas exclusivamente à canamicina, e o teste, às bactérias expostas às duas concentrações de magnetita com canamicina.

Após a incubação, foi adicionado resazurina (1:10, v/v) nos poços e realizado a leitura em espectrofotômetro de microplaca (BioTek® Epoch), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Foi considerado efeito potencializado quando a adição de magnetita à suspensão com antibiótico foi capaz de causar inibição de crescimento adicional, ou seja, superior àquela obtido com o antibiótico isolado. Foi considerado efeito indiferente, se não houvesse inibição de crescimento adicional.

4.5.5. Avaliação da viabilidade de suspensões bacterianas submetidas à magnetita e CEM-FEB

Após os ensaios de CIM, curvas de inibição e sinergismo com antibiótico, as bactérias foram semeadas em ágar nutriente com a finalidade de verificar se as mesmas permaneciam viáveis após os diversos tratamentos testados.

As exposições aos campos estáticos, dinâmicos e às nanopartículas variou de 2 a 24 horas. As concentrações de magnetita de 1,5 a 192 mg/mL foram utilizadas para o ensaio de CIM; e de 24 a 192 mg/mL, para os ensaios de curva de inibição. Após a adição de resazurina, antes de ser lido a densidade ótica, os poços com as amostras eram inspecionados visualmente quanto à coloração rosa ou arroxeadado e comparado ao controle negativo. Somente após a inspeção visual, o inóculo era semeado em ágar nutriente.

Após incubação por 24 horas foi realizada a inspeção visual das placas. A leitura e interpretação do teste consistiu na determinação da ação bactericida e bacteriostática. A ação bactericida é aquela em que ocorreu a inibição do crescimento bacteriano na presença da substância-teste e /ou campo magnético e a ausência de seu crescimento no meio de cultura isento da substância-teste e do campo magnético; enquanto a bacteriostática é aquela em que o micro-organismo foi inibido no meio submetido ao tratamento e cresceu no meio isento as condições de tratamento.

Em resumo, considerou-se bacteriostático quando após inspeção visual com resazurina, apresentou coloração arroxeadada, semelhante ao controle negativo, mas com o posterior semeio do inóculo em placa apresentou crescimento, indicando que o tratamento não mata as células mas inibem ou diminuem a sua divisão. Considerou-se

bactericida, quando o posterior semeio em placa não apresentou crescimento, indicando que o tratamento mata as células.

4.6. Avaliação da morfológica de *E. coli* DH5 α submetida à magnetita e ao CEM-FEB bacteriana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Suspensões bacterianas (com densidades óticas ajustadas a 600 nm para 0,08 – 0,1) foram incubadas durante 24 horas em 3 grupos: contendo 192 mg/mL de nanopartículas de magnetita (Grupo 1); sob a ação isolada de um campo eletromagnético de 70 mT e 10 Hz (Grupo 2); e controle negativo sem tratamento (Grupo 3).

Após 24 horas, as suspensões foram homogeneizadas por agitador de tubos do tipo vórtex (BioMixer QL-901), e transferidas para superfícies circulares de titânio polido, constantes em uma placa de 24 poços. A placa foi submetida a centrifugação (2000 rpm, 1 min), com posterior lavagem de cada poço utilizando-se o tampão fosfato-salino (PBS), com aspiração do sobrenadante e descarte (esse procedimento foi repetido 5 vezes). A fixação foi realizada com reagente de Karnosky (formaldeído 4% com glutaraldeído 3%, em tampão cacodilato 0,1 M) durante 4 horas. Em seguida, os poços foram novamente lavados com PBS (2 vezes), durante 5 minutos cada. Foi realizada a desidratação durante 10 minutos com etanol em concentrações crescentes (30 % - 100%). E por fim, a placa foi deixada em estufa bacteriológica para o etanol evaporar (VOLOVA et al, 2018; SOUSA et al, 2017). As bactérias fixadas nos discos de titânio inseridos na placa de 24 poços, foram levadas ao Laboratório Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais (DMAT), as quais foram secas em estufa a 80 °C e compactadas na forma de pastilhas. A obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV - Hitachi Tabletop Microscope TM-3000) utilizou como parâmetros tensões de aceleração de 5 kV; fonte de tungstênio; ampliação de 5 a 10.000 \times e resolução de 11,46 a 22,42 nm.

4.7. Avaliação de alteração do potencial zeta de suspensões de *E. coli* DH5 α expostas à magnetita e ao CEM-FEB

Suspensões contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* DH5 α pVAX-1 em caldo LB foram preparadas em tubos tipo falcon. Alíquotas de 200 μ L foram separadas em tubos

cônicos e expostas durante 2 horas a dois tipos de tratamentos: Nanopartículas de magnetita (192 mg/mL) isoladamente (Grupo 1); nanopartículas de magnetita (192 mg/mL) combinadas a campo dinâmico (70 mT, 10 Hz), (Grupo 2). As amostras foram transferidas a cubetas de plástico e foi procedida a análise. O potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética (KURINČIČ et al, 2016) utilizando o analisador de potencial zeta ZetaPlus® (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, EUA), sendo os dados foram obtidos pelo *software* Zeta Analyzer.

5. Análises estatísticas dos dados

A análise estatística foi realizada pelo método de Análise de variância (ANOVA) *One-way* para obter as diferenças entre os resultados, e os dados foram representados em termos de média dos valores. A significância estatística foi definida pelo teste de Benferroni, e $p < 0,05$ foi considerado significativo. O programa OriginPro 9.0 64 bit (Origin Pro Lab Corp. Northampton, MA, EUA) foi utilizado para fazer todas as análises estatísticas.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização das nanopartículas de magnetita

Os pós de nanopartículas obtidos por moagem foram analisados por DRX inicialmente, a fim de verificar a composição da amostra. A figura 5A mostra os picos correspondentes à presença da magnetita nos cristais, conforme a carta do difratograma padrão (Figura 5B). Adicionalmente, foi observado que a composição de magnetita e maguemita correspondeu a 66% da amostra, sendo a magnetita de 30% (Figura 5C). O tamanho das nanopartículas, calculado a partir do difratograma, apresentou uma faixa de 9 a 14 nm.

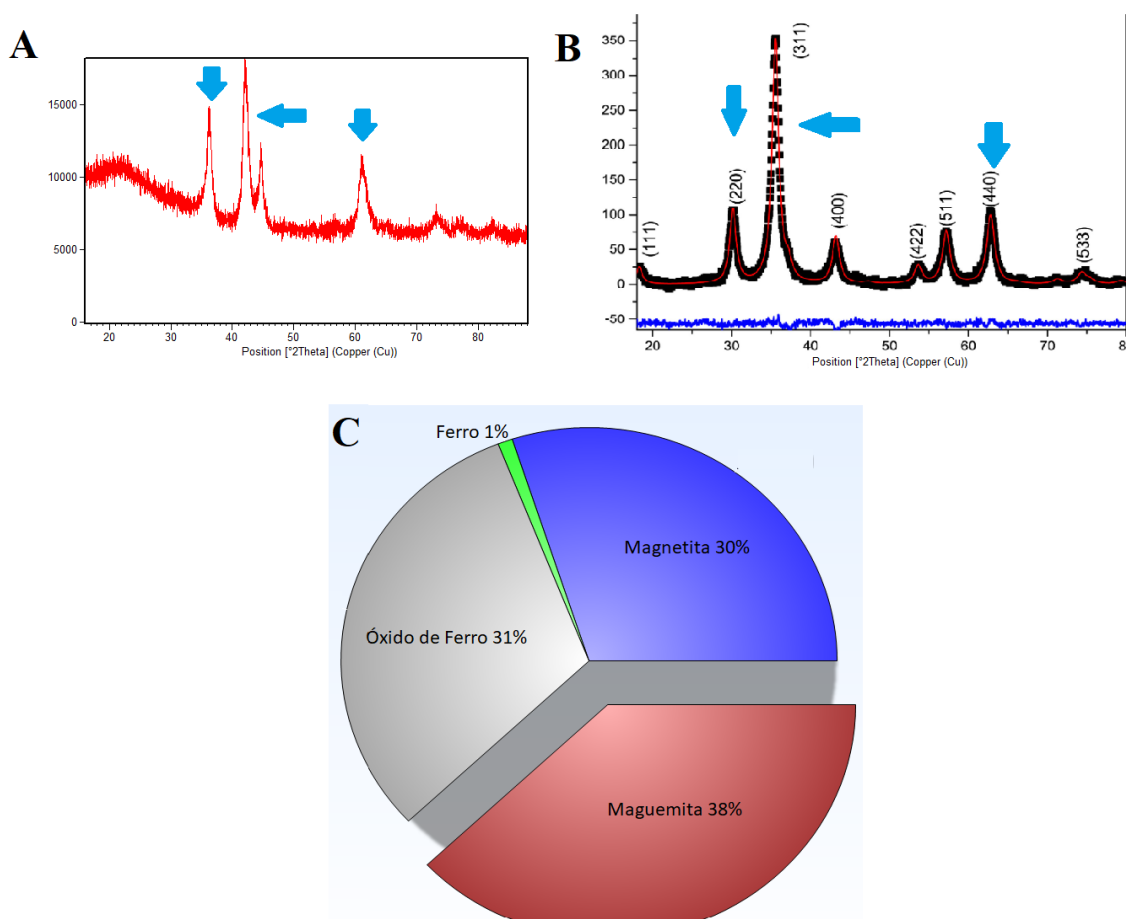


Figura 5: Composição dos cristais de óxido ferro obtidos por moagem e analisados por DRX. As imagens foram obtidas a partir do tratamento dos dados pelo programa X'Pert Higl Score Plus. A – Difratograma das nanopartículas produzidas. As setas azuis indicam os picos característicos de Fe₃O₄. B – Difratograma padrão de Fe₃O₄. Adaptado de ATOCHE-MEDRANO (2018) para comparação com amostra padrão de Fe₃O₄. C – Proporção (%) de magnetita (Fe₃O₄), maguemita (γ -Fe₂O₃) e ferro inorgânico nas nanopartículas produzidas.

O tamanho hidrodinâmico, em caldo LB, foi obtido por DLS e mostrou que as nanopartículas de magnetita aglomeram quando suspensas, obtendo tamanho de até 1140 nm (Tabela 2). É possível notar que o aumento da concentração não resultou em aumento do tamanho da nanopartícula.

Tabela 2: Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de Fe₃O₄ em caldo LB puro e em caldo LB contendo 10% de soro fetal bovino.

<i>Fe₃O₄ (mg/mL)</i>	<i>Tamanho hidrodinâmico (nm)</i>		<i>Potencial Zeta (mV)</i>	
	LB	LB + SFB	LB	LB + SFB
1	568,0	732,6		
5	971,1	658,7	15,49	-12,63
6	680	722		
12	771	899		
24	731	736		
48	523	866		
96	819	457*		
192	1140	424*		

[Observações: LB – Caldo nutritivo Luria-Bertani. SFB – Soro Fetal Bovino inativo. *Foi obtido diferença significativa entre o tamanho das partículas suspensas em caldo LB puro, comparado ao LB + SFB.

A adição de soro fetal bovino (SFB) na concentração de 10% no caldo LB não foi capaz de conter a aglomeração das nanopartículas, de modo que se observou tamanhos muito próximos àquele obtido em suspensão com caldo LB puro. Somente nas maiores concentrações (96 e 192 mg/mL), é que houve diferença significativa no tamanho das partículas, de modo que a adição de SFB ocasionou uma redução de 50 %. A análise do potencial zeta mostrou que a carga das partículas são negativas, em ambos os meios ensaiados.

6.2. Caracterização física do CEM-FEB nos ensaios microbiológicos

Os ímãs permanentes, constantes no Carrossel Magnético, geram um campo magnético estático (B) de 400 mT na face do ímã. A análise do CEM-FEB gerado mostrou que ele possui caráter não-homogêneo, ou seja, com intensidade de campo (B) que não se mantém constante ao longo do tempo. E, conforme mostrado na figura 6, o fluxo magnético (B) na região do porta-amostra (em que as suspensões bacterianas

foram expostas) variou de 58 a 70 mT dentro de um único ciclo (1 ms), na frequência de 10 Hz.

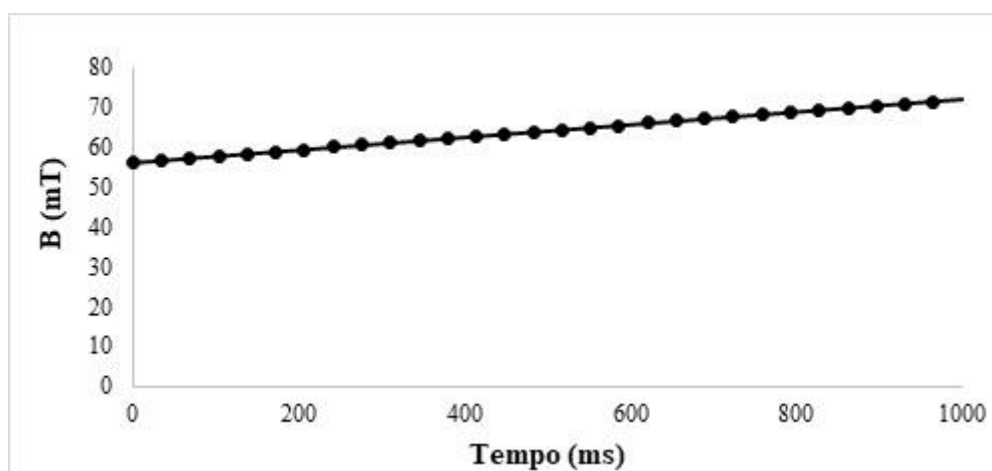


Figura 6: Gráfico do campo magnético (70 mT, 10 Hz) de caráter não-homogêneo. É demonstrado a variação do campo magnético vs tempo indicando que o campo não permanece homogêneo pois varia de 56,2 a 71,5 mT, dentro de 1 segundo ou 1000 ms (1 ciclo).

6.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de *E. coli* DH5 α expostas a nanopartículas de magnetita

O crescimento de *E. coli* DH5 α pVAX-1, após 24 horas de incubação, foi 100% inibido na concentração de 96 mg/mL sendo, portanto, essa a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanopartícula de magnetita isolada. Esse resultado pode ser visualizado macroscopicamente pela coloração arroxeada da suspensão no poço (Figura 7).

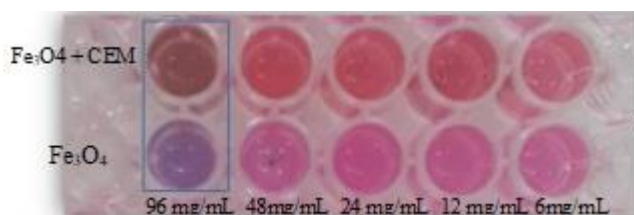


Figura 7: Concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo. Visualização do poço contendo suspensões bacterianas expostas a 96 mg/mL de Fe_3O_4 (em destaque).

6.4. Cinética de crescimento de *E. coli* DH5 α expostas nanopartículas de magnetita

A bactéria inicia sua fase logarítmica após 2 horas de inoculação em caldo nutritivo, e se mantém crescendo até cerca de 30 horas (Figura 8). Sendo assim, as

exposições aos diversos tratamentos puderam ocorrer entre 4 e 24 horas, durante a fase de crescimento bacteriano.

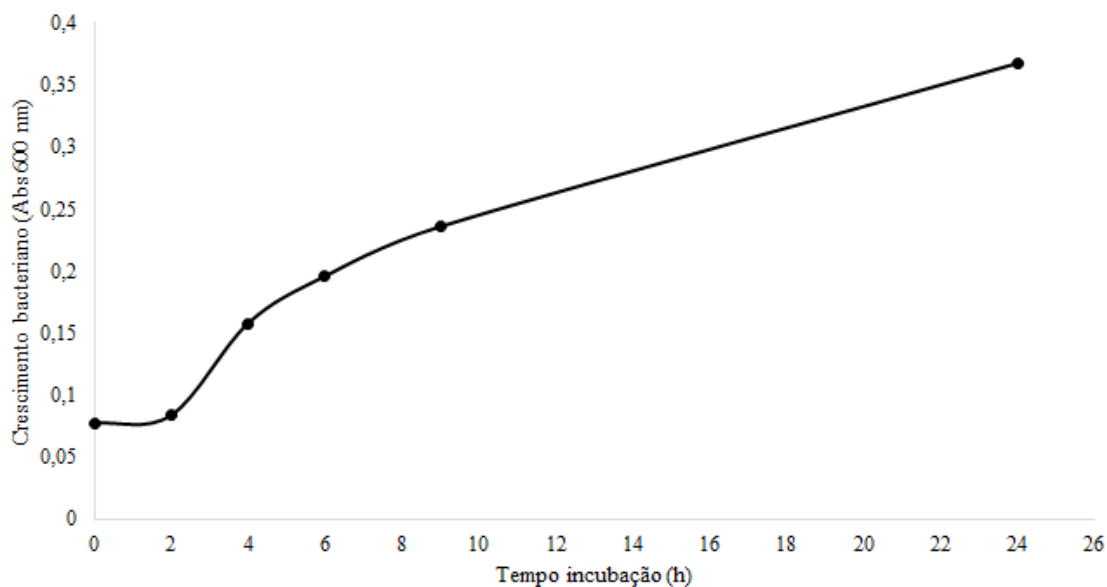


Figura 8: Curva de crescimento normal de *E. coli* DH5 α pVAX-1 para verificação da fase logarítmica. O ensaio foi realizado pela medida da densidade ótica (Abs = 600 nm) das suspensões bacterianas durante 30 horas.

6.5. Cinética de inibição de *E. coli* DH5 α expostas nanopartículas de magnetita

Os ensaios da curva de inibição de *E. coli* DH5 α pVAX-1 (Figura 9) foram realizados nas concentrações de 24 a 192 mg/mL. Foi possível observar um inibição significativa do crescimento no intervalo de 2 a 24 horas, sendo que a exposição por 24 horas exibiu maior grau de inibição em todas as concentrações ensaiadas.

Foi possível verificar que a CIM de magnetita (96 mg/mL) exibiu o melhor resultado quanto à inibição do crescimento, comparado às demais concentrações, de modo que há uma queda de 35 a 60% no crescimento bacteriano entre 2 e 24 horas (Figura 9A). A associação entre magnetita e o campo magnético potencializou o efeito inibitório, que variou de 47 a 76%.

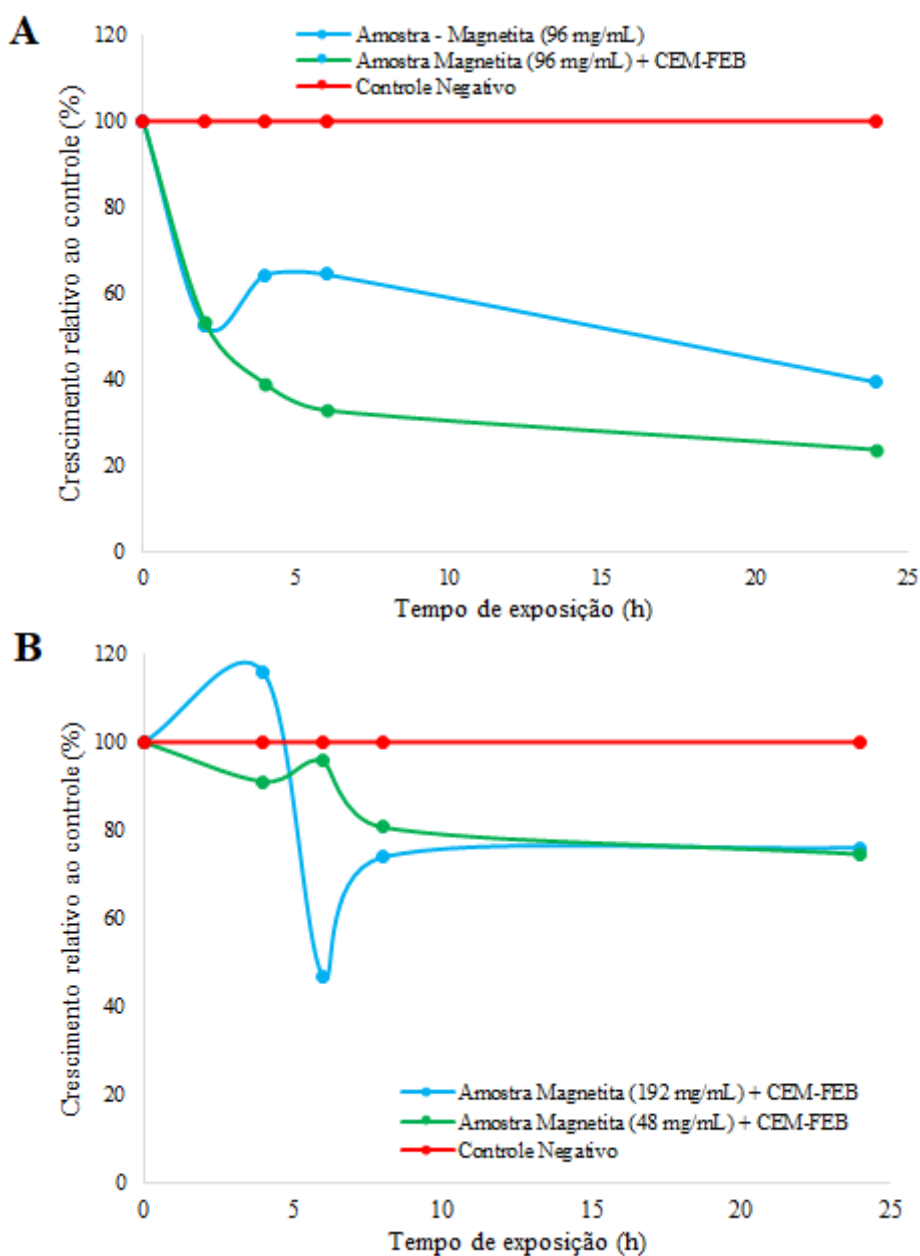


Figura 9: Curvas de inibição de *E. coli* DH5 α pVAX-1 expostas a nanopartículas de Fe₃O₄ isoladas ou associadas ao CEM - FEB. A – Tratamento com nanopartículas de Fe₃O₄ na concentração de 96 mg/mL (CIM), isoladas e combinadas a um campo magnético dinâmico (70 mT, 10 Hz); B – Tratamento com nanopartículas de Fe₃O₄, nas concentrações de 48 e 192 mg/mL, combinadas a um campo magnético dinâmico (70 mT, 10 Hz). Os valores de cada ponto são dados em termos de média das amostras. O crescimento é medido em termos de porcentagem (%) relativo ao controle negativo, portanto, crescimento com valores menores que zero ($y < 0$) indicam diminuição do crescimento e, maiores que zero ($y > 0$) indicam estímulo do crescimento bacteriano.

Avaliações de inibição utilizando concentrações de magnetita diferentes da CIM foram realizadas, exclusivamente com a combinação da nanopartícula com um campo magnético externo. Como resultado, houve efeitos inibitórios importantes de modo que a concentração de 48 mg/mL (0,5 x CIM) gerou inibição de 8 a 25% (Figura 9B) e a

concentração de 192 mg/mL (2 x CIM) diminuiu o crescimento de 25% a 53%, no período de 4 a 24 horas de exposição (Figura 9B). Observa-se que a elevação da concentração não proporciona o aumento do efeito inibitório.

6.6. Curva de morte de nanopartículas de magnetita sobre *E. coli* DH5 α

Quanto ao experimento da curva de morte, no período de exposição de zero a 24 horas, a contagem de colônias não demonstrou diferença significativa entre as amostras testadas e os controles negativos (Figura 10).

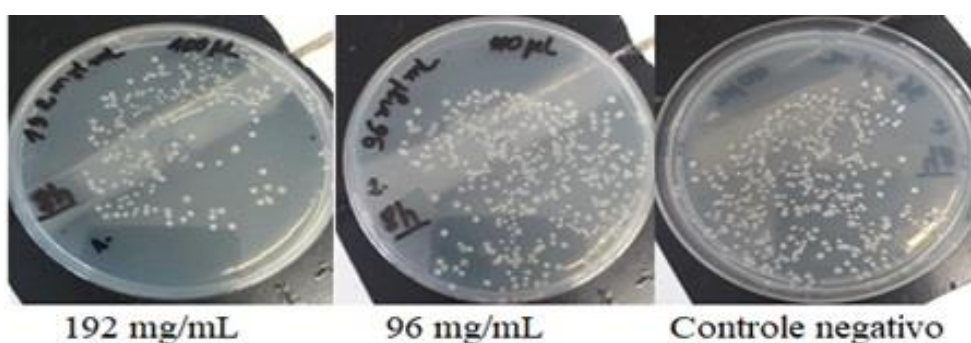


Figura 10: Placas com ágar contendo colônias bacterianas crescidas após 24 de incubação. Após exposição de suspensão bacteriana à Fe₃O₄ (96 mg/mL) isolada e associada ao CEM-FEB e de Fe₃O₄ (48 e 192 mg/mL) associada ao CEM-FEB, durante 2 a 24 horas, as suspensões foram semeadas em placas e incubadas por 24 horas para contagem de colônias. Houve crescimento bacteriano em todas as placas e em todos os ensaios, e não houve diferença no crescimento (Apenas algumas placas dos ensaios são mostradas).

6.7. Combinação de magnetita com antibiótico canamicina

A associação entre magnetita e canamicina (Figura 11), demonstrou significativa redução do crescimento bacteriano, quando comparado ao controle. A canamicina isolada foi o controle utilizado no ensaio, e não inibiu o crescimento de *E. coli* DH5 α pVAX-1 nas concentrações de 16 a 32 μ g/mL. Para haver inibição, foi necessário concentrações superiores, de 64 a 126 μ g/mL, para então ser obtido redução significativa do crescimento que atinge a inibição total na concentração de 256 μ g/mL.

Por outro lado, quando se associou magnetita a canamicina, houve redução de crescimento significativamente menor que aquele obtido com a canamicina isolada, com o efeito mantido até a concentração de 512 μ g/mL do controle. Como comparação, a

associação de magnetita a 96 mg/mL com canamicina a 64 mg/mL revela o mesmo efeito inibitório que só foi obtido com a canamicina isolada a 256 µg/mL, ou seja, uma dose de antibiótico 4 vezes maior. A inibição de crescimento foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado o resultado do controle negativo com o da associação entre canamicina (16 a 512 µg/mL) e magnetita (192 mg/mL), em todas as concentrações do antibiótico testada. Já a associação com magnetita (96 mg/mL), obteve diferença significativa com o controle, quando a canamicina foi associada nas concentrações de 16 a 512 µg/mL.

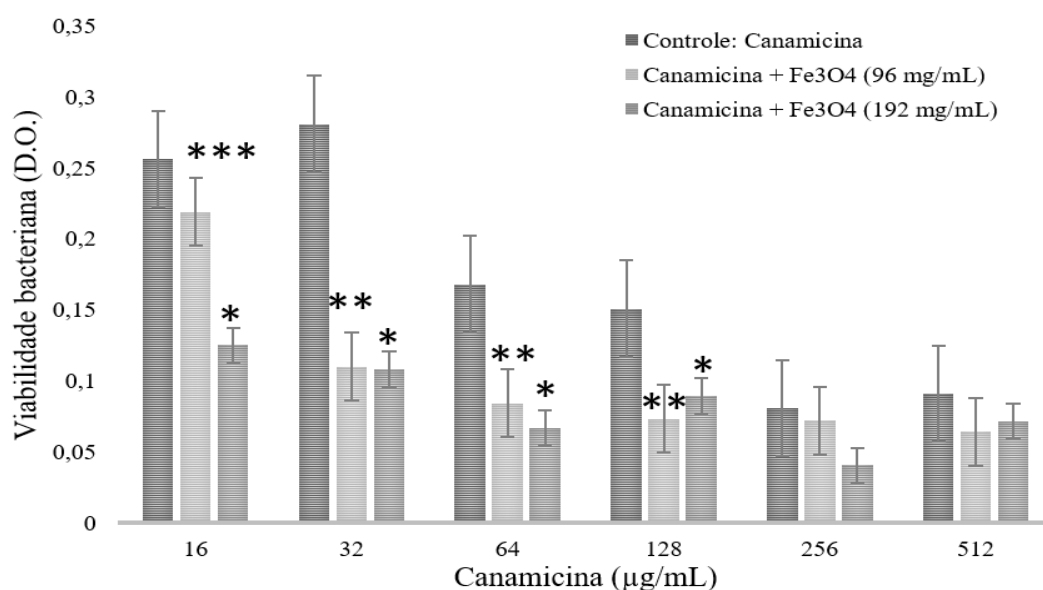


Figura 11: Ensaio de sinergismo Canamicina + Nanopartículas Fe₃O₄ (24h). Resultados estisticamente significantes foram obtidos entre amostra e controle negativo (Teste de Buferroni, $p < 0,05$): (*) Diferença significativa entre a amostra (Canamicina + 192 mg/mL Fe₃O₄) e o controle negativo; (**) Diferença significativa entre a amostra (Canamicina + 96 mg/mL Fe₃O₄) e o controle negativo; (***) Diferença significativa entre as amostras.

Observa-se que a associação da canamicina com magnetita apresenta ação potencializada quando comparada ao controle negativo, em todas as concentrações da canamicina, de 16 a 512 µg/mL.

Quanto à comparação entre a utilização de magnetita na concentração de 96 mg/mL *versus* 192 mg/mL, os ensaios mostram que não houve diferença significativa entre os resultados.

6.8. Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular em 24 horas mostrou crescimento bacteriano em todos os ensaios, demonstrando que as células permaneceram viáveis após os tratamentos utilizados. Isso ocorreu com o semeio das suspensões bacterianas, após incubação por 24 horas, para ensaios de avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de magnetita (1,5 a 192 mg/mL), isolada e combinada ao campo magnético (70 mT, 10 Hz), conforme sumarizado na tabela 3. Adicionalmente, viabilidade bacteriana também foi observada nos ensaios de curva de inibição com magnetita na concentração de 96 mg/mL, isolada e associada ao campo magnético; e nas concentrações de 24, 48 e 192 mg/mL de magnetita combinadas ao campo magnético (Tabela 4 e Figura 12).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) da nanopartícula Fe₃O₄ sobre *Escherichia coli* DH5α pVAX-1 e teste de viabilidade em 24 horas.

<i>Concentrações de Fe₃O₄ (mg/mL)</i>	<i>Crescimento bacteriano em caldo (24 h)</i>	<i>Crescimento bacteriano em placa (Viabilidade)</i>	<i>Ação</i>
1,5	+	+	-
3,0	+	+	-
6,0	+	+	-
12,0	+	+	-
24,0	+	+	-
48,0	+	+	-
96,0	-	+	Bacteriostática
192,0	-	+	Bacteriostática

[Observações: O crescimento bacteriano em caldo diz respeito à incubação bacteriana, por 24 horas, junto às nanopartículas com inspeção visual da coloração do poço após adição de resazurina. O sinal (-) indica ausência total de crescimento bacteriano (coloração roxa no poço) na concentração de 96 mg/mL, indicando que esta é a CIM das nanopartículas; o sinal (+) indica crescimento bacteriano. A viabilidade bacteriana diz respeito ao crescimento (+) ou não (-) de colônias bacterianas em placas com ágar, após semeio da suspensão exposta a Fe₃O₄

Tabela 4: Ensaio de viabilidade bacteriana em placa (24 horas) dos ensaio de curva de inibição.

<i>Concentrações de Fe₃O₄ (mg/mL)</i>	<i>CEM-FEB (Sim ou Não)</i>	<i>Crescimento bacteriano em placa (Viabilidade)</i>	<i>Ação</i>
48,0	Sim	+	Bacteriostática
192,0	Sim	+	Bacteriostática
96,0	Sim	+	Bacteriostática
96,0	Não	+	Bacteriostática

Observações: As bactérias foram expostas à CIM de Fe₃O₄ (96 mg/mL) isolada e associada ao campo magnético; à concentração abaixo da CIM (48 mg/mL) e a concentração acima da CIM (192 mg/mL) combinadas ao campo magnético. Houve crescimento em todos os ensaios. O crescimento em placas de ágar são indicados pelo sinal positivo (+).

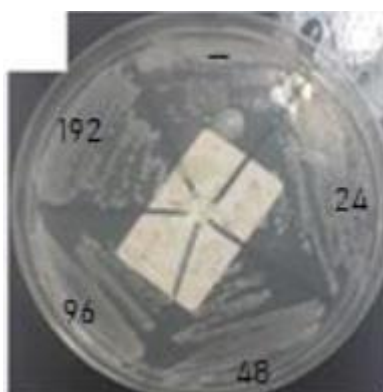


Figura 12: Ensaio de viabilidade bacteriana em placa (24 horas) dos ensaio de curva de inibição. As bactérias foram expostas à CIM de Fe₃O₄ (96 mg/mL) isolada e associada ao campo magnético; às concentrações abaixo da CIM (24 e 48 mg/mL) e a concentração acima da CIM (192 mg/mL) combinadas ao campo magnético. Houve crescimento em todos os ensaios. Obs.: Apenas alguns dos semeios estão demonstrados

Os ensaios de viabilidade realizados após o ensaio de combinação entre magnetita e canamicina, mostrou crescimento de colônias bacterianas após a incubação por 24 horas (Tabela 5). Isso ocorreu em todas as concentrações de antibiótico testados (16 a 512 µg/mL) e às suas combinações com a magnetita (Figura 13), apesar da canamicina e de sua combinação com nanopartículas terem apresentado inibição de crescimento em todas as concentrações ensaiadas.

Tabela 5: Ensaio de viabilidade bacteriana em placa após combinação de Fe_3O_4 com canamicina.

Concentrações de canamicina ($\mu\text{g/mL}$)	Controle Negativo		Fe_3O_4 (96 mg/mL)		Fe_3O_4 (192 mg/mL)	
	Crescimento bacteriano (Viabilidade)	Ação	Crescimento bacteriano (Viabilidade)	Ação	Crescimento bacteriano (Viabilidade)	Ação
16,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática
32,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática
64,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática
128,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática
256,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática
512,0	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática	+	Bacteriostática

[Observações: O controle negativo se refere à exposição das bactérias à canamicina isoladamente. O crescimento bacteriano após incubação em placas contendo ágar são indicados pelo sinal positivo (+). Houve crescimento em todos os ensaios, indicando que as células permanecem viáveis, mesmo nas concentrações em que há inibição do crescimento.

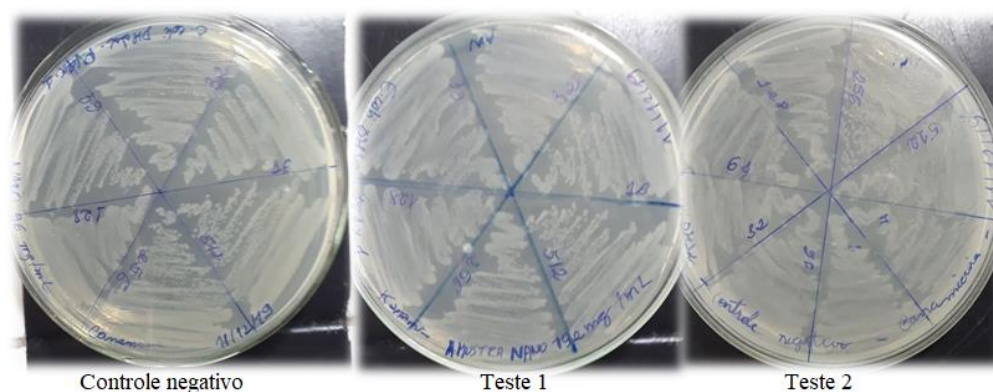


Figura 13: Viabilidade celular do ensaio de combinação de Fe_3O_4 com canamicina. O controle negativo se refere à exposição das bactérias à canamicina isoladamente (16 a 512 $\mu\text{g/mL}$), o teste 1 se refere à associação do antibiótico com Fe_3O_4 na concentração de 96 mg/mL e o teste 2, da associação do antibiótico com Fe_3O_4 na concentração de 192 mg/mL. Houve crescimento em todos os ensaios. Obs.: Apenas alguns semeios estão demonstrados.

6.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após as análises do crescimento e metabolismo bacteriano, foi verificado se haveria alterações na parede celular bacteriana. As micrografias de MEV revelaram que as bactérias expostas a um campo eletromagnético isolado (70 mT, 10 Hz) ou a

nanopartículas de magnetita isoladas (192 mg/mL) apresentavam alterações morfológicas diversas (Figura 14).

Na figura 14A observa-se o controle negativo, em que as bactérias apresentam morfologia conservada, com formato de bastonete típico e paredes lisas. As figuras 14B e 14C mostram a bactéria tratada com magnetita na concentração de 192 mg/mL, sem exposição ao campo magnético, evidenciando fissuras proeminentes com algumas células apresentando enrugamento na parede celular.

Quando expostas ao campo magnético de 70 mT e 10 Hz, as células apresentaram retrações na parede bacteriana das amostras expostas, de modo que todas as células do campo de visão mostraram-se enrugadas e com perda do formato cilíndrico liso típico (Figura 14D).

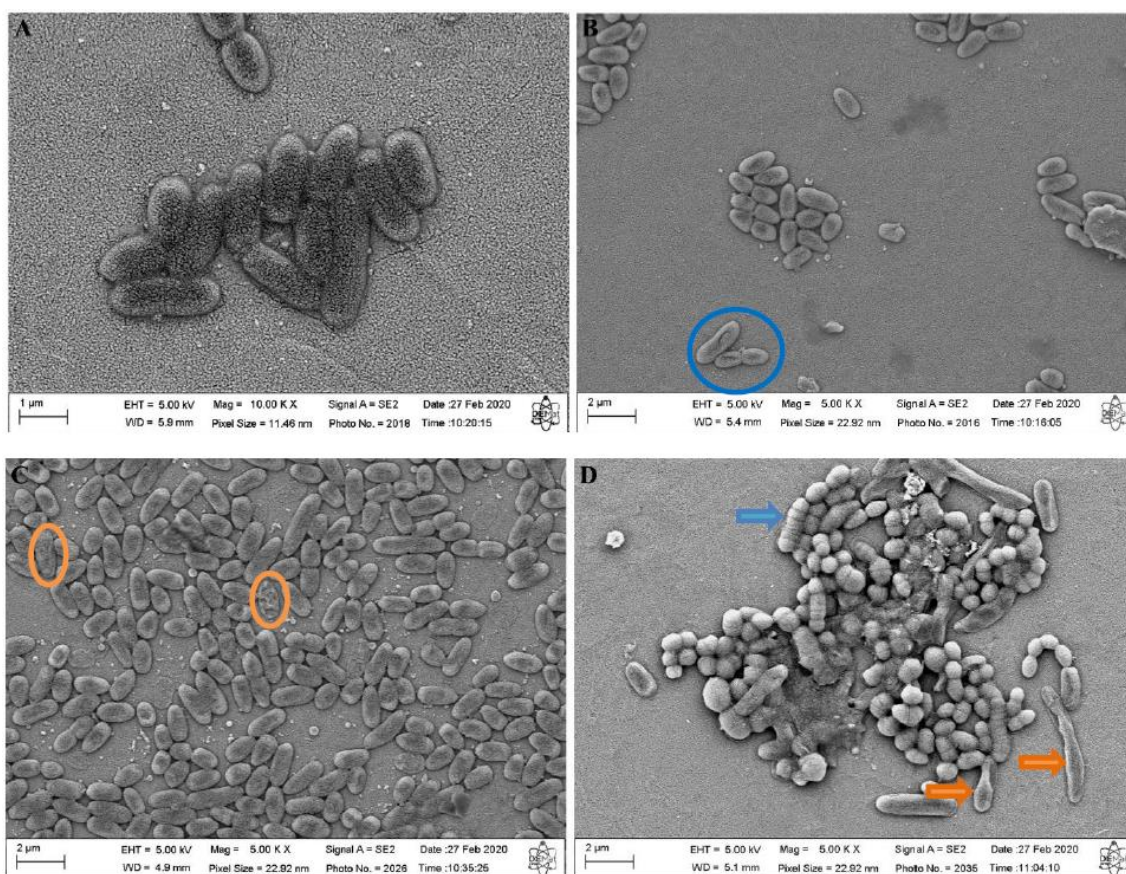


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura de *E. coli* DH5 α pVAX-1 tratada com Fe₃O₄ isolada e com campo eletromagnético isolado. A – Controle negativo. Bactérias incubadas sem nenhum tipo de exposição. Verifica-se morfologia bacteriana conservada e o formato bastonete típico e paredes lisas; B e C – Tratamento com nanopartícula de Fe₃O₄ a 192 mg/mL por 24 horas. Fissuras na parede celular estão circuladas em azul e enrugamento da parede celular, com aspecto de murchas, estão circuladas em laranja; D – Exposição bacteriana ao campo eletromagnético (70 mT e 10 Hz) durante 24 horas. Bactérias apresentando retração da parede celular bacteriana e perda do formato bastonete típico e de paredes lisas, apontadas com setas laranja; além de bastonetes com formato alterado semelhantes a cocos, apontados com seta azul.

6.10. Potencial zeta de suspensões de *E. coli* DH5 α expostas a nanopartículas de magnetita e CEM-FEB

A avaliação das alterações elétricas após a exposição a magnetita isolada e combinada ao CEM-FEB, foi realizada pela mensuração do potencial zeta e os resultados são demonstrados na Tabela 6.

Não houve diferença entre o controle negativo e as amostras expostas durante 2 horas, no entanto, os ensaios com exposição por 24 horas obtiveram alterações significativas ($p > 0,05$) de modo que as suspensões de *E. coli* DH5 α (pVAX-1) exibiram aumento considerável do potencial zeta.

Enquanto o controle negativo expressou potencial zeta de - 7,35 mV, as amostras expostas a magnetita (96 mg/mL) isoladamente aumentou o potencial zeta para - 2,02 mV; o mesmo ocorreu com a amostra exposta a magnetita (192 mg/mL) isoladamente que obteve potencial zeta de - 4,18 mV, e combinado CEM-FEB de 10 Hz que obteve 16,8 mV.

Tabela 6: Potencial zeta de suspensões de *E. coli* DH5 α pVAX-1 tratadas com Fe₃O₄ a 96 mg/mL e 192 mg/mL, isolados ou combinado ao campo eletromagnético de (B = 70 mT, f = 10 Hz).

Tempo (h)	Fe ₃ O ₄ (mg/mL)	CEM-FEB (70 mT, 10 Hz)	Potencial Zeta (mV)
2	Controle negativo		-12,48
2	96	-	-12,74
2	192	-	-14,74
24	Controle negativo		-7,35
24	96	+	-7,88
24	192	+	16,8*
24	96	-	-2,02*
24	192	-	-4,18*

[Observações: Após 2 horas de tratamento com Fe₃O₄ a 96 mg/mL e 192 mg/mL; Após 24 horas de tratamento com Fe₃O₄ a 96 mg/mL e 192 mg/mL, isoladas e expostas ao campo magnético de 70 mT e 10 Hz. O controle negativo refere-se às suspensões bacterianas isentas de qualquer exposição (Fe₃O₄ ou campo magnético). O sinal (+) se refere à exposição ao CEM-FEB (ligado); o sinal (-) se refere a não exposição ao CEM-FEB (desligado). * Diferença significativa ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Para a realização desse estudo, a caracterização das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por DRX demonstrou que a moagem de alta energia foi capaz de obter nanopartículas em tamanhos que variaram de 9 a 15 nm, o que é apropriado para apresentar a característica de superparamagnetismo (<25 nm), conforme discutido por trabalho anterior (LIU et al, 2006), que é relevante devido ao fato da nanopartícula gerar um campo magnético forte ao seu redor, somente quando associada a um campo magnético externo que a estimula. O campo magnético induzido tem potencial de atividade biológica e a necessidade de um campo externo para induzi-lo, torna possível controlar essa ação.

Além do tamanho das nanopartículas sugerirem propriedade superparamagnéticas, que é buscada para exercer os efeitos antibacterianos desejados nesse trabalho, esse parâmetro também é relevante para ser obtido a quantidade adequada de Fe_3O_4 nos cristais. Conforme discutido por Park e colaboradores (2005), a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é a fase dominante nos pequenos nanocristais de óxido de ferro com tamanho de 4 nm, enquanto a fração do componente magnetita (Fe_3O_4) eleva gradualmente com o aumento do tamanho das partículas, de modo que partículas com cerca de 13 nm possuem maior quantidade de Fe_3O_4 do que $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (PARK et al, 2005). Isso confirma o resultado apresentado, no qual foi obtido 30% de magnetita nas partículas produzidas, considerado alto teor, de acordo com Parveen e colaboradores (2012). É importante a obtenção de alta quantidade de magnetita na amostra, para garantir que os resultados dos ensaios possam ser atribuídos ao óxido e não advindos de outras fases que estejam no cristal (ex.: Fe, FeO, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e outros). Portanto, o tamanho e a proporção de magnetita obtidos pela análise DRX sugerem a evidência do seu efeito superparamagnético sobre *E. coli* DH5 α pVAX-1.

Sendo assim, foi necessário considerar que a caracterização inicial das nanopartículas magnéticas por DRX indicou o diâmetro médio das partículas produzidas, refletindo o tamanho primário. Quando suspensas, as nanopartículas de magnetita tenderam a agregar-se. Watanabe (2013) menciona que a superfície das nanopartículas são de natureza extremamente hidrofóbicas e com isso interações de Van Der Waals formam-se entre elas originando partículas de tamanho maiores, ou seja, tamanhos hidrodinâmicos secundários (WATANABE, 2013).

Desse modo, a avaliação do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, realizadas por DLS, revelou que em caldo LB apresentavam tamanhos que variaram de 500 a 900 nm. Nesse caso, o primeiro parâmetro analisado foi o tamanho primário da nanopartícula obtida, no qual não reflete a propriedade de Fe₃O₄, visto que os ensaios ocorreram em meio líquido e o tamanho hidrodinâmico secundário deve ser considerado. Como o fator tamanho é de extrema importância quando se trata das doses necessárias para alcançar os efeitos desejados, a alta agregação da nanopartícula aumentará o seu tamanho e conseqüentemente diminuirá a superfície de contato com a bactéria (PARVEEN et al, 2012; WATANABE et al, 2013). Além disso, contribui para a perda do efeito superparamagnético, necessitando de doses extremamente altas para conseguir inibição significativa (WATANABE et al, 2013; GONÇALVES et al, 2017; PARVEEN et al, 2012).

Para resolver essa questão, a literatura mostra algumas alternativas para estabilizar a suspensão de nanopartículas magnéticas, diminuindo sua agregação, sem que seja necessário revesti-las com polietilenoglicol (PEG) ou lipídeos. Essas opções incluem a utilização de soro fetal bovino (SFB) ou tampão fosfato (PBS) em diluições variadas, como veículo para o coloide de nanopartículas (WATANABE et al, 2013; WIOGO et al., 2011). Por esse motivo, foi ensaiado adicionar 10 % de SFB ao caldo LB, com base no trabalho de Watanabe e colaboradores (2013), em que não se observou diferença significativa no tamanho hidrodinâmico das partículas independente de ter ou não adição de SFB ao caldo.

A análise do potencial zeta das nanopartículas em suspensão revelou que possuem propriedade aniônica, tanto em caldo LB puro, quanto em caldo LB acrescido de SFB. E que essa característica não teve relação com a concentração de magnetita ensaiada, de modo que a carga ficou em torno de - 15 a - 25 mV, em todas as mensurações. Esse ensaio caracteriza as propriedades elétricas intrínsecas das nanopartículas não-revestidas aqui produzidas e, será importante para explicar os efeitos biológicos sobre as bactérias estudadas.

É importante salientar que para maximizar os efeitos biológicos, o magnetita em suspensão tem que exibir carga oposta ao sistema biológico exposto, para que as interações eletrostáticas facilitem o contato das nanopartículas com a superfície do sistema (células por exemplo). Nesse sentido, pode ser realizado o revestimento das nanopartículas com moléculas que lhes confirmam o caráter superficial desejado (BINI et al., 2012; ZHENG et al., 2020), ou podem ser carregadas utilizando-se contra-íons,

como nitrato (TALBOT et al., 2018). Estudos realizados por outros pesquisadores recorrem à modificação do pH do veículo de suspensão para modificar a carga das nanopartículas sem a necessidade de revesti-las (BERG et al, 2009; MARSALEK et al, 2013). No entanto, essa última metodologia não é aplicável em todo tipo de estudo, pois muitas vezes não é apropriado modificar o pH do meio, como ocorre em ensaios *in vivo*, visto que o pH tecidual ou sanguíneo fica em torno de 7,4 e é importante mimetizá-los nos ensaios biológicos (NELSON E COX, 2018).

Com a nanopartícula caracterizada, realizou-se o estudo da atividade antibacteriana, em que se determinou a fase *log* de *E. coli* DH5 α pVAX-1 com a execução da curva de crescimento, com o intuito de escolher o período adequado de exposição ao tratamento. A determinação da fase *log* é relevante, pois se a bactéria entrasse em fase estacionária ou em fase de declínio, a inibição do crescimento poderia ser atribuída erroneamente ao tratamento utilizado. No entanto, se a inibição ocorrer durante a fase *log*, essa poderia ser atribuída à exposição a magnetita e ao campo magnético utilizado. Assim, a obtenção da fase *log* permitiu exposição ao sistema de tratamento durante o período entre 4 e 24 horas.

Nos ensaios de curva de inibição, foi possível verificar que a magnetita isolada é capaz de causar diminuição do crescimento bacteriano (0 a 24 h) (Figura 10A) e que a CIM foi de 96 mg/mL (24 h) (Figura 8 e Tabela 2). Esse resultado concorda com estudo anterior (TAYLOR E WEBSTER, 2009) que obtiveram diminuição de crescimento de *Staphylococcus epidermidis* com magnetita superparamagnética com tamanhos de até 18 nm. Os autores conseguiram resultados de inibição satisfatórios em concentrações mínimas, que variaram de 100 μ g/mL a 2 mg/mL, em cultivos de 12 a 48 horas. A exposição bacteriana durante 48 horas às nanopartículas gerou morte celular (quantificadas por microscopia de fluorescência) de 20% a 33%, enquanto o controle negativo exibiu morte celular somente até 15% (TAYLOR E WEBSTER, 2009). Velusamy e colaboradores (2016) observaram atividade inibitória da nanopartícula de magnetita contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 103,7 μ g/mL e 16,18 μ g/mL, respectivamente. Acredita-se que essa atividade antibacteriana se deva a interferência desse composto sobre as funções vitais bacterianas pela ligação entre nanopartículas e membrana celular ou proteínas da membrana via interações eletrostáticas (TAYLOR E WEBSTER, 2009).

Como justificativa para esses resultados, os autores propuseram a hipótese de que a magnetita isoladamente seria capaz impedir a formação de biofilme bacteriano, e que

por isso havia diminuição do crescimento celular. Outro mecanismo possível apresentado, é que a morte bacteriana poderia advir da interrupção de funções vitais bacterianas devido à ligação entre nanopartículas e membrana celular ou proteínas da membrana via interações eletrostáticas (TAYLOR E WEBSTER, 2009).

Os ensaios aqui apresentados corroboram com outros pesquisadores anteriormente apresentados, quanto à atividade antibacteriana significativa da magnetita isolada. No entanto, difere dos outros estudos por apresentarem atividade significativa em baixas concentrações, enquanto nessa pesquisa foi obtido com concentrações mais elevadas. Apesar dessa diferença, é importante salientar que, pensando-se em ensaios *in vivo*, as concentrações necessárias de magnetita são concentrações locais e não sistêmicas, diferente dos antibióticos convencionais que devem possuir concentração sistêmica para exercer seus efeitos. Essa diferença ocorre com a magnetita pois elas serão direcionadas ao órgão-alvo com o auxílio de um campo magnético externo, e devem se acumular localmente. Sendo assim, mesmo em concentrações *in vitro* aparentemente alta, como as obtidas neste trabalho, sistemicamente isso representaria uma concentração baixa.

As altas concentrações obtidas nos ensaios de CIM, levantam duas questões importantes:

Primeiramente, para que haja efeito biológico eficiente, ou seja, necessidade de baixa concentração de nanopartículas para produzir o efeito inibitório desejado, é imprescindível que a nanopartícula seja atraída para a superfície bacteriana, que apresenta um potencial zeta geralmente negativo e uniforme, uma vez que a carga na parede bacteriana é homogênea e, em geral, varia de -10 a -90 mV (ARAÚJO et al., 2010 apud PALMER et al., 2007), dado observado na análise de *E. coli* DH5 α pVAX-1, que obteve potencial zeta de -7,35 mV. A análise do potencial zeta de magnetita mostrou que, em suspensão, também tem carga negativa. Logo, ocorre repulsão entre as nanopartículas e a superfície bacteriana. Sendo assim, para que ocorra o efeito inibitório, é necessário que haja mais nanopartícula disponível no meio para que tenha uma maior probabilidade de contato com a parede bacteriana. Essa observação, justifica a necessidade de altas concentrações de magnetita para obter inibição bacteriana.

Segundamente, a análise do DLS demonstrou agregação, visto que os tamanhos hidrodinâmicos eram bem maiores que o tamanho primário obtido no DRX. Esse fenômeno diminui as propriedades de superparamagnéticas das nanopartículas, que seria uma das propriedades que explicaria o efeito antibacteriano. Com isso, a tendência de

aglomerar as tornam ferrimagnéticas (LIU et al, 2006; WANG et al, 2004; LEE et al, 1996). Quando isso ocorre, um problema adicional surge: partículas de magnetita passam a atrair-se umas com as outras, por meio de interações magnéticas, o que pode gerar agregados particulados enormes (WATANABE, 2013). Desse modo, verifica-se diminuição da superfície de contato com a bactéria, tornando necessário doses cada vez maiores para obtenção do efeito inibitório, como foi observado no estudo. Caso não seja utilizado nenhum tipo de revestimento, que é o caso desse trabalho, a utilização de doses elevadas resultam em maiores tamanhos secundários e maior magnetização remanescente, que aumenta a atração entre as nanopartículas (WATANABE, 2013).

As concentrações acima da CIM obtida (96 mg/mL), não mostraram inibição adicional, no período de 24 horas. Esse fato demonstra que as nanopartículas de magnetita são capazes de inibir o crescimento bacteriano até chegar a um platô ou ponto ótimo. Logo, o aumento da concentração não implica em aumento do efeito. Em conjunto, esses resultados sugerem que há um ponto ótimo de inibição, por volta da CIM (96 mg/mL), e que as concentrações em torno da CIM (48 a 192 mg/mL) apesar de inibirem o crescimento, não o fazem de modo proporcional à concentração utilizada.

A escolha de combinar a magnetita com campo magnético alternado e não estático se deu devido à triagem (material suplementar), que demonstrou não haver inibição de crescimento com exposição ao campo magnético estático.

Quanto aos ensaios em que houve exposição bacteriana à associação de nanopartículas de magnetita com o CEM-FEB (70 mT, 10 Hz), observou-se que o campo magnético potencializa o efeito inibitório da nanopartícula isolada (Figura 10A, 10B, 10C). O estudo realizado com a CIM de magnetita (96 mg/mL) em 24 horas de exposição, indica que além da nanopartícula isolada produzir efeito inibitório significativo, a adição do campo magnético é capaz de reduzir em 16% o crescimento bacteriano, (60% de inibição com a magnetita isolada *versus* 76% de inibição com a associação magnetita + CEM-FEB). Adicionalmente, é importante frisar que essa diferença é ainda maior quando observado períodos de exposição inferiores a 24 horas: em 4 horas, a inibição de crescimento foi de 35,7% para 61,0%; e em 6 horas, foi de 35,6% para 67,2%.

Do ponto de vista de aplicação clínica, esse resultado é relevante devido ao fato de que campos magnéticos externos são capazes de guiar nanopartículas magnéticas à sítios-alvo (SHAGHOLANI, 2015; SADIGHIAN, 2014). Assim, a observação experimental de que esse campo externo também serviria como agente potencializador

do efeito antimicrobiano da Fe_3O_4 , demonstra que seria possível diminuir a concentração necessária para combater uma infecção localizada, por exemplo. A observação experimental de que o uso de magnetita juntamente a um campo magnético externo não consiste apenas de um sistema de entrega de fármacos sítio-específico, mas sim de um sistema constituído de dois tratamentos com propriedades antibacterianas intrínsecas, que se utilizados juntos demonstram efeito antibacteriano potencializado, é de extrema importância e de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que relata esse tipo de efeito com um campo fraco e de baixa frequência na literatura.

Os ensaios com concentrações de magnetita acima (192 mg/mL) e abaixo (24 e 48 mg/mL) da CIM, foram realizados exclusivamente com associação ao campo eletromagnético de 70 mT e 10 Hz. E, como resultado, também foi obtido inibição de crescimento significativa, com exceção da concentração de 24 mg/mL. É importante notar que a elevação da concentração não proporcionou o aumento do efeito inibitório e, em conjunto, esses resultados sugerem que as concentrações em torno da CIM (48 a 192 mg/mL) apresentam o ponto ótimo de inibição (Figura 10).

Esse tipo de associação é explorada na hipertermia magnética, um método com diversas aplicações na biomedicina que vão desde à terapia do câncer (LEE et al, 2011), até a exploração contra micro-organismos (SUNEET et al, 2019), e que pode, como os resultados aqui apresentados, causar a diminuição significativa de crescimento bacteriano, quando comparado aos processos convencionais de morte celular. Nesse processo, magnetita funciona como fonte de aquecimento local devido à sua exposição a um campo magnético, podendo causar a morte de células localmente expostas. Isso ocorre porque tais nanopartículas transformam a energia eletromagnética em calor, que dependerá de parâmetros experimentais de medição, propriedades estruturais e magnéticas das nanopartículas magnéticas, bem como, dos parâmetros coloidais das soluções (PIÑEIRO-REDONDO et al, 2011).

Corroborando com os ensaios aqui apresentados, um estudo de Bañobre-López e outros autores (2013) mostraram que *Pseudomonas fluorescens* teve a sobrevivência diminuída quando exposta a uma solução aquosa de nanopartículas de magnetita (10 nm), na concentração de 16 mg/mL associada a um CEM de 10 mT e 873 kHz, de modo que a contagem de colônias chegou a zero (BAÑOBRE-LÓPEZ et al, 2013).

Considerando que a intensidade do campo magnético utilizado e a concentração de magnetita são próximos aos parâmetros utilizados neste trabalho, os dados aqui apresentados são confirmados quando à existência de efeitos inibitórios bacterianos

significativos são advindos da associação de magnetita com um campo magnético externo.

É importante notar que a frequência do campo alternado utilizados por Bañobre-López e colaboradores (2013) é extremamente alta, estando na faixa de kHz, justamente o tipo de frequência em que é descrito a hipertermia como mecanismo de ação para morte celular (LEE et al, 2011; SUNEET et al, 2019). Nos ensaios aqui apresentados são realizados na frequência de 10 Hz, que não possui energia suficiente para gerar calor. Por esse motivo, infere-se que os resultados obtidos não advém do aquecimento local gerado nas bactérias (hipertermia), mas sim do efeito do intenso campo magnético gerado localmente pela nanopartícula exposta ao campo externo (LIU et al, 2006; WANG et al, 2004). Mesmo não havendo indução de calor, um campo magnético é capaz de causar estresse bacteriano, refletido pela alteração do metabolismo energético com maiores atividades de desidrogenase (FILIPIC et al, 2012; DANEVČIČ E STOPAR, 2011), e um aumento na concentração de ATP (FILIPIC et al, 2012; KARU et al, 1995).

A forma pelo qual um campo magnético exerce os efeitos biológicos depende de um efeito janela, no que diz respeito aos parâmetros físicos, relacionado à interação complexa entre a frequência do campo (f) *versus* a intensidade do fluxo magnético (B) (HUNT et al, 2009). Desse modo, há determinados parâmetros dos campos magnéticos que podem ser ou não biologicamente eficazes. As respostas biológicas não respondem de forma linear ao campo magnético usado, visto que campos magnéticos relativamente intensos podem não gerar efeito significativo, enquanto campos menores da ordem de 10 – 100 μ T podem gerar (BINHI E SAVIN, 2002). Somado aos fatores físicos, os parâmetros biológicos dos biosistemas ensaiados frente à exposição a um campo magnético também se mostram importantes (GRUNDLER et al, 1992), comprovados conforme experimentos realizados desde a década de 1985 (WALLECZEK et al, 1991; CONTI et al. 1985). Nesse trabalho, essas questões foram observadas durante os ensaios de triagem (material suplementar), em que a exposição de *E. coli* DH5 α a um campo magnético estático de 400 mT não foi capaz de causar inibição de crescimento bacteriano.

Os dados obtidos diferiram daqueles apresentados por Aldosky e outros autores (2012), os quais avaliaram a resposta fisiológica de *Staphylococcus aureus* a um campo magnético estático de 100, 200 e 300 mT, conferindo diminuição do crescimento bacteriano, acentuado pelo aumento da intensidade do campo (ALDOSKY et al, 2012).

Noutro estudo, dessa vez utilizando a cianobactéria *Anabaena doliolum*, a exposição a um campo magnético estático gerado por um ímã permanente de 300 mT durante 1 a 6 horas também gerou efeitos inibitórios importantes nas culturas expostas, comparado ao controle negativo (SINGH et al, 1994). Os trabalhos supracitados utilizaram parâmetros semelhantes a este trabalho: avaliaram o crescimento bacteriano por meio da densidade ótica das suspensões, e a exposição foi realizada com um mesmo tipo de campo magnético que o aqui apresentado. Apesar disso, os organismos ensaiados foram diferentes, e por esse motivo não foi possível obter os mesmos resultados inibitórios. Sendo assim, a exposição ao campo magnético estático não foi explorada nos ensaios posteriores.

Ao contrário do que foi observado com o uso de campos magnéticos estáticos, os campos eletromagnéticos ($B = 70\text{mT}$, $f = 10\text{ Hz}$) isoladamente foram capazes de causar inibição do crescimento bacteriano nos ensaios de triagem (material suplementar) e, apesar do seu uso isolado não ter sido explorado nos ensaios seguintes, esse tipo de alteração em *Escherichia coli* já havia sido relatada anteriormente por outros autores. Por exemplo, Justo e colaboradores (2006), mostraram que um campo eletromagnético de frequência extremamente baixa (CEM-FEB) de 55 mT do tipo solenoide (com frequência menor que 300 Hz) causou diminuição significativa na biomassa bacteriana em exposições durante 6,5 horas. A partir desses resultados, os autores inferiram existir efeitos letais sobre as bactérias, visto que a mensuração de biomassa conta tanto células viáveis, quanto não viáveis e, comparado ao controle negativo, a biomassa bacteriana diminuiu significativamente (JUSTO et al., 2006).

Quanto aos ensaios de associação entre o aminoglicosídeo canamicina e Fe_3O_4 , evidenciaram a existência de um efeito aditivo entre as terapias, em que o aumento significativo da inibição de crescimento demonstra que magnetita potencializa o efeito do antibiótico em bactérias resistentes (Figura 11). Esse efeito pode ser explorado no quesito da resistência bacteriana, uma vez que foi capaz de diminuir a dose necessária do antibiótico para causar inibição de crescimento nas células resistentes à canamicina. O fato da nanopartícula na concentração de 96 mg/mL requerer a associação com antibiótico numa dose 4 vezes menor, para obter o mesmo efeito inibitório, permite inferir que nanopartículas de magnetita podem ser utilizadas como adjuvante a um antibiótico que deixou de ser eficaz contra uma determinada cepa, ou se tornado obsoleto, permitindo que novamente seja útil, e em menores doses, contra infecções.

Cada vez mais, a resistência bacteriana tem diminuído o arsenal de antibióticos eficazes, tornando fármacos obsoletos contra determinada espécie bacteriana (BANIN et al, 2017). Por isso é importante que além de buscar novas terapias contra essas bactérias, seja feita uma tentativa de recuperar a utilização de substâncias já aprovadas. Essa opção pode ser feita por exemplo, utilizando-se associações que permitam ao antibiótico agir contra as bactérias resistentes em menor dose, como o que foi relatado nesse trabalho. Assim, considerando os resultados obtidos, pode-se dizer que magnetita além de possuir efeito antibacteriano intrínseco, é capaz de potencializar o efeito antibacteriano de um antibiótico.

É importante mencionar que a ausência de resultados inibitórios da canamicina, isoladamente, nas concentrações de 16 e 32 µg/mL era um resultado esperado, visto que as bactérias *E. coli* DH5α pVAX-1 são resistentes à canamicina na concentração de 30 µg/mL. Porém, a suposição inicial era que aumentos sucessivos na concentração do antibiótico isolado (para concentrações acima de 30 µg/mL) fosse capaz de aumentar o grau de inibição, o que não ocorreu, indicando que aumentar muito a dose de um antibiótico já obsoleto não repercutirá em efeito inibitório adicional, além de aumentar as chances de toxicidade. Portanto, quando se observa os efeitos inibitórios na combinação canamicina (16 – 32 µg/mL) + Fe₃O₄, estes são atribuídos ao efeito das nanopartículas de Fe₃O₄, exclusivamente.

Quanto a comparação entre as suspensões expostas a magnetita (96 mg/mL *versus* 192 mg/mL) não ter demonstrado diferença, indica que o efeito aditivo possui um platô, e que não adianta dobrar a dose da nanopartícula para aumentar o efeito. Essa observação também foi obtida com os ensaios de inibição de crescimento.

A associação benéfica entre nanopartículas magnéticas e antibióticos, melhorando o efeito inibitório do fármaco, foi relatada anteriormente por Niemirowicz e colaboradores (2016), concordando com os resultados aqui apresentados. Isolados clínicos resistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, foram incubados na presença de antibióticos convencionais (vancomicina e colistina), isoladamente e associados a magnetita e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo método de microdiluição seriada, semelhante ao estudo realizado. Como resultado, as amostras co-tratadas com nanopartículas e antibióticos demonstrou que a o tratamento combinado é mais eficaz do que a terapia isolada com agentes antibacterianos (NIEMIROWICZ et al, 2016). Noutros ensaios, nanopartículas magnéticas modularam interação de aminoglicosídeos (estreptomicina e neomicina), de modo que magnetita foi capaz de interferir nas

interações antibiótico-célula, alterando a fluidez da membrana plasmática (ISTRATE et al, 2014).

A investigação dos efeitos sobre a taxa de crescimento bacteriano e a sensibilidade a aminoglicosídeos também foi verificada pela associação desses antibióticos a campos eletromagnéticos, ao invés de nanopartículas magnéticas. *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram expostas a uma combinação entre CEM-FEB (2 mT; 50 Hz) e canamicina ou amicacina e, como resultado, a taxa de crescimento de ambas as estirpes diminuiu significativamente quando incubadas por 4, 6 e 8 h. Os autores obtiveram efeito inibitório aditivo com o CEM, visto que foram utilizadas concentrações antimicrobianas subinibitórias de canamicina (1,0 µg/mL) sobre o crescimento de *E. coli*, e de amicacina (0,5 µg/mL) sobre o crescimento de *P. aeruginosa* (SEGATORE et al, 2012). Esses resultados nos mostram a possibilidade de combinar também o campo magnético, utilizado nesse trabalho, em associação a magnetita para avaliar a possibilidade de efeito potencializado ainda superior ao que foi obtido.

A avaliação da viabilidade celular mostrou que a incubação durante 24 horas das bactérias incubadas em concentrações crescentes de magnetita (1,5 a 192 mg/mL), para o ensaio da CIM, apresenta crescimento bacteriano, indicando que mesmo quando a nanopartícula inibe completamente o crescimento, não há morte celular (Tabela 2). A permanência da viabilidade de *E. coli* DH5α pVAX-1 em todas os testes realizados nas curvas de inibição (Figura 11), indica que o efeito inibitório da exposição contínua às nanopartículas isoladas ou associadas ao CEM-FEB tem caráter bacteriostático, e não bactericida. Do mesmo modo, o ensaio de combinação entre magnetita e canamicina também mostra um efeito bacteriostático (Figura 13) visto que colônias bacterianas cresceram após a incubação em placas em todas as concentrações de antibiótico e suas combinações com magnetita. Dados confirmados pelo ensaio de curva de morte, em que evidencia a ação bacteriostática.

É importante citar que o efeito inibitório bacteriostático é bastante explorado na clínica contra infecções, havendo diversos fármacos antibióticos que são bacteriostáticos como as tetraciclina, sulfonamidas e oxazolidinonas (ANVISA, 2007), ficando a morte bacteriana a cargo do hospedeiro. Desse modo, os resultados obtidos apontam para a possibilidade de utilização das terapias magnéticas contra as infecções provocadas por bactérias resistentes.

Com o intuito de verificar a possível influência das substâncias em estudo e o campo magnético sobre *E. coli* DH5 α pVAX-1, analisou-se as suas ações na superfície celular bacteriana. A interface entre o envoltório celular externo e o ambiente extracelular desempenham papel crucial na fisiologia bacteriana. Nesse sentido, a superfície externa participa dos processos de adesão, troca com o ambiente, interação com o sistema imunológico do hospedeiro e, por fim, interfere no crescimento e divisão celular (WILSON et al., 2001).

A superfície bacteriana é carregada negativamente, pois nela estão ancoradas macromoléculas com funções químicas diversas (carboxila, fosfato e aminas, p.e.) que se ionizam em pH fisiológico, conferindo carga superficial (WILSON et al., 2001 apud MOZES e ROUXHET, 1990). A carga de superfície pode ser avaliada indiretamente com base no potencial zeta (WILSON et al., 2001 apud SAITO et al., 1997), que consiste numa ferramenta útil para avaliar o comportamento bacteriano (WILSON et al., 2001) sob efeito de um sistema terapêutico, como o aqui proposto.

Nesse trabalho, alterações no potencial zeta da suspensão bacteriana foram investigadas com a finalidade de verificar se a membrana celular seria um alvo molecular do CEM-FEB (70 mT, 10 Hz) e de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita, e se poderia ser correlacionada responsável pelos bioefeitos observados (diminuição de crescimento e alterações morfológicas).

Os resultados obtidos do potencial zeta mostram que não há diferença significativa entre os controles negativos e as amostras expostas durante 2 horas. No entanto, na exposição durante 24 horas a magnetita isolada ou combinada ao CEM-FEB foi capaz de gerar aumento significativo do potencial zeta ($p > 0,05$). Com base nisso, supõe-se que o tempo de exposição é importante para que diferenças no potencial zeta sejam detectáveis, e que 2 horas é insuficiente para demonstrar tal alteração.

Os ensaios mostraram ainda que, o maior aumento no potencial zeta foi obtido na exposição a magnetita (192 mg/mL) combinada ao campo magnético, quando comparado ao efeito da magnetita isolada (Tabela 3). Sendo assim, esse resultado aponta para a importância do campo magnético sobre o efeito.

Esses resultados confirmam trabalhos prévios, em que o campo magnético altera as propriedades elétricas superficiais de *E. coli*. El-Kaliuoby e colaboradores (2020), observaram que campos magnéticos pulsados, em frequências menores que 40 Hz, alteravam a constante dielétrica das suspensões bacterianas. E, noutra abordagem, Oncul e colaboradores (2016), observaram alterações no potencial zeta quando utilizada

um campo magnético de 1 mT e 50 Hz. Apesar desses trabalhos não utilizarem os mesmos parâmetros que os investigados aqui, o fato de ter sido utilizado um campo magnético de frequência extremamente baixa (CEM-FEB), dá suporte às observações aqui apresentadas.

Pesquisas evidenciam que um campo magnético é capaz de provocar alterações na membrana celular e, conseqüentemente, na carga de superfície (EL-KALIUBOBY et al, 2020; OHATA et al, 2004). Isso ocorre porque, ao interagir diretamente sobre a membrana celular, o CEM-FEB força os íons e moléculas dentro da célula causando mudanças elétricas heterogêneas no envoltório celular (SUDARTI et al., 2018; DI BIASIO et al., 2010). As mudanças nas propriedades elétricas da célula estão relacionadas à condutividade elétrica da membrana e a suas características dielétricas, sendo que as modificações na macroestrutura do envoltório devem-se às mudanças membranares de: canais iônicos, concentração iônica, e ligação das cargas às macromoléculas (SUDARTI et al., 2018; DI BIASIO et al., 2010).

Adicionalmente, é importante notar que a magnetita isolada também pode causar alterações significativas no potencial zeta. Isso indica que, além de estar comprovado o efeito biológico via aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO's), mediado após endocitose celular (ARAKHA et al., 2015; ZHANG et al., 2013; SCHAFER et al., 2000), as nanopartículas de óxido de ferro podem ter efeito externamente à célula, interagindo somente com a superfície.

Análises do potencial zeta bacteriano são importantes, pois esse parâmetro exerce papel significativo na manutenção da função celular, além de fornecer informações úteis sobre as características da superfície celular (TOKUMASU et al., 2012). Alterações geradas no potencial zeta são reconhecidamente um possível marcador de dano à membrana bacteriana, pois se correlaciona ao aumento da permeabilidade celular e, conforme investigado por Halder e colaboradores (2015), essas alterações podem eventualmente relacionarem-se com a diminuição da viabilidade celular (HALDER et al., 2015).

Além de predizer dano à membrana bacteriana, o potencial zeta é um dos parâmetros que se correlacionam ao processo de adesão bacteriana a uma superfície para a formação de biofilme. A problemática dos biofilmes bacterianos é que os microorganismos que o compõem aderem a superfícies inertes e colonizam material médico invasivo, o que resulta num sério problema para a saúde pública devido às bactérias em biofilme ficarem inacessíveis aos antibióticos, e ao grande potencial que estes

organismos têm de causar infecções em pacientes mais suscetíveis ou portadores de próteses ou implantes (ALVES, 2016).

A avaliação das propriedades de adesão de bactérias mostrou que, em alguns casos, as características físico-químicas da superfície da célula contribuem determinantemente no processo de adesão (CHAVES, 2004). E, conforme revisado por Araújo (2010), o potencial zeta é um importante parâmetro da superfície bacteriana no processo de adesão e formação de biofilme. Portanto, as modificações na carga de superfície podem impedir ou diminuir a formação de biofilme em espécies bacterianas que os preoduzem de modo que as alterações de potencial zeta, como aqui apresentadas, representam um importante resultado pois apontam que as células de *E. coli* expostas podem ser menos susceptíveis a produzir um biofilme bacteriano viável.

Os bioefeitos das nanopartículas de magnetita e CEM-FEB foram confirmados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permitiu visualizar alterações morfológicas importantes. Essa observação indica que o estresse causado pelo sistema terapêutico causa modificações consideráveis na bactéria e que a superfície bacteriana é um alvo dos agentes terapêuticos utilizados, considerando as alterações morfológicas identificadas na superfície. É importante frisar que, o fato do controle negativo exibir bactérias com morfologia conservada, confirma definitivamente que as alterações observadas nos grupos expostos devem-se ao tratamento e não aos processos de fixação e desidratação realizados para a microscopia. Portanto, as alterações morfológicas obtidas são resultado da tentativa de adaptação da bactéria ao estresse dos campos magnéticos e das nanopartículas magnéticas.

Considerando as alterações morfológicas encontradas nesse trabalho, é possível que o estresse gerado pelo CEM-FEB e pela magnetita tenha ocorrido pela capacidade desses agentes afetarem estruturas da superfície bacteriana, como proteínas morfogênicas. Embora não tenha sido realizado esse tipo de ensaio, essa suposição pode ser feita a partir do fato de que os fármacos direcionados à membrana bacteriana (nisina, p.e.) podem tanto interferir em proteínas de divisão celular, quanto em proteínas relacionadas à morfologia bacteriana (STRAHL E HAMOEN, 2010).

Corroborando com os resultados apresentados, estudos anteriores verificaram a existência de alterações morfológicas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quando expostas a um CEM-FEB de 0,5 mT e 50 Hz. As mudanças morfológicas relatadas para *E. coli* foram semelhantes àquelas encontradas nos ensaios aqui mostrados, como retração da membrana citoplasmática e alterações na parede,

conferindo aspecto enrugado, além de notarem desintegração da parede celular, extrusão do conteúdo citoplasmático e bolhas (INHAN-GARIP et al, 2011).

A diminuição do crescimento bacteriano, observada nos ensaios de curva de inibição, pode ter sido causada pela diminuição da divisão celular e não por alterações bacterianas que causem a morte da célula, como a destruição da membrana. Embora não tenha sido analisado a existência de lise na membrana, a microscopia não mostrou paredes destruídas e essas observações concordam com os ensaios, pois mostram que os efeitos inibitórios são de caráter bacteriostático. Logo, considerando a análise da microscopia, há indícios de que a diminuição no crescimento bacteriano pode ter sido gerada pela ação de Fe_3O_4 , e do campo magnético sobre a superfície bacteriana (parede e membrana).

As estruturas envolvidas na divisão celular e os elementos do citoesqueleto bacteriano são estruturas ancoradas na membrana, e que a ligação à membrana desempenha um papel crítico na segregação cromossômica e na regulação da divisão celular (STRAHL E HAMOEN, 2010), e com isso, é de se esperar que agentes que alterem o envoltório celular modifiquem o crescimento bacteriano. Sabe-se ainda que, além do DNA, outros parâmetros interferem na divisão celular e na proliferação bacteriana, como propriedades de empacotamento da estrutura da membrana celular. Assim, alterações ocorridas no envoltório da bactéria podem modificar a estrutura da membrana celular ou a permeabilidade iônica. Como consequência, constituintes intracelulares podem extravasar da célula ou conteúdos extracelulares podem entrar nela e interagir com o DNA, sendo que ambos fatores são capazes de prejudicar a divisão (EL-KALIUBOBY et al, 2020). Logo, como foi observado alteração no potencial zeta junto às alterações morfológicas superficiais, infere-se que essas são possíveis causas para a diminuição do crescimento bacteriano, aqui apresentado.

No entanto, a interação intracelular como fator para causar diminuição da viabilidade não pode ser descartada pois, Kadhim e colaboradores (2019) observaram que nanopartículas de magnetita são capazes de danificar cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* após permear o ácido nucleico bacteriano e a membrana citoplasmática. Adicionalmente, Jabir e colaboradores (2019) investigaram o aumento da produção de ERO's gerado, por essas nanopartículas absorvidas, causando danos em *S. aureus* e *E. coli*. Os efeitos intracelulares de um campo magnético também foi estudado por Qian e colaboradores (2016), que

observaram interação com o DNA bacteriano resultando na inativação de *Bacillus subtilis*.

Portanto, apesar dos ensaios aqui apresentados não terem investigado a interação intracelular e, suportarem a hipótese de que a interação com a superfície bacteriana é importante para gerar os efeitos inibitórios apresentados, não é descartado a existência de outros mecanismos de ação, conforme observado pelos literatura sobre o tema.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os ensaios apresentados mostram que o modelo experimental que avaliou o potencial antibacteriano de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) isoladas ou associadas a um campo magnético externo, possui atividade antibacteriana intrínseca. Isso significa que, independente da veiculação de um fármaco antibiótico, esse sistema diminui o crescimento celular por meio da interação com a superfície bacteriana.

Portanto, concluímos com este trabalho que:

1. Nanopartículas de magnetita diminuem o crescimento de *Escherichia coli* DH5 α resistente à canamicina (portadora do plasmídeo pVAX-1);
2. A associação de magnetita com um campo eletromagnético em frequência extremamente baixa (CEM-FEB) potencializa a inibição do crescimento bacteriano;
3. A magnetita potencializa o efeito inibitório do antibiótico canamicina, ao qual a bactéria não responde quando utilizado isoladamente, causando inibição significativa no crescimento bacteriano;
4. Os efeitos inibitórios apresentados possuem caráter bacteriostáticos;
5. Nanopartículas de magnetita isoladas ou associadas ao CEM-FEB alteram o potencial zeta de *E. coli*, indicando exercer efeito na superfície bacteriana;
6. Nanopartículas de magnetita e CEM-FEB causam alterações morfológicas significativas na superfície da célula estudada.

Portanto, nesse contexto, as perspectivas futuras para o desenvolvimento racional desse projeto são:

1. Dar continuidade aos ensaios *in vitro* sobre *Escherichia coli* DH5 α (pVAX-1);
2. Formular as nanopartículas de magnetita em suspensões estáveis, de modo a diminuir a agregação e aumentar a eficácia de seu efeito antibacteriano (obter resultados em menores doses):

- Revestir a magnetita, com a finalidade de obter nanopartículas com superfície positiva para interagir de modo mais eficiente com a superfície bacteriana;
3. Ensaiar as suspensões de magnetita em bactérias portando resistência de importância clínica, de acordo com a listagem da OMS;
 4. Proceder aos ensaios *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-MAGEED, Ahmed IA et al. Effect of pH and zeta potential of Pickering stabilizing magnetite nanoparticles on the features of magnetized polystyrene microspheres. **Polymer Engineering & Science**, v. 61, n. 1, p. 234-244, 2021.
- ALDOSKY, H. Y. Y.; BARWARI, W. J. O.; AL-MLALY, J. M. S. Bio-impedance detector for *Staphylococcus aureus* exposed to magnetic fields. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 407, n. 1, 2012.
- ANUSAVICE, K.J. Phillips materiais dentários. **Elsevier Brasil**. p. 72, 2013.
- ASKELAND, D. R.; PHULÉ, P. P.; WRIGHT, W. J.; BHATTACHARYA, D. K. **The science and engineering of materials**, p. 772-774, 2003.
- ALI, Z. A.; YAHYA, A. G. I.; JABIR, A. W. S. The Effect of Static Magnetic Field on Growth and Biochemical Indices of Five Fungal Genera. **Journal of Biotechnology Research Center**, v. 8, n. 3, p. 28–36, 2014.
- ALVES, M. J., REBELO, M., GONÇALVES, V., PIEDADE, J., ROCHA, R., BARREIRA, J., FERREIRA, I. C. Biofilme bacteriano e infecção hospitalar. **Saúde: Conexões e Sustentabilidade para o Entendimento Global**, 110-122, 2016.
- AMAROLI, A. et al. Effects of a 50 Hz magnetic field on *Dictyostelium discoideum* (Protista). **Bioelectromagnetics**, v. 27, n. 7, p. 528–534, 2006.
- ANAGO, Eugénie et al. Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2015.
- ANDERSSON, D. I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 452–456, 2003.
- ANTIMICROBIANOS – BASES TEÓRICAS E USO CLÍNICO. **Anvisa**, 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 04 de Novembro de 2020.
- ARAKHA, Manoranjan et al. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.
- ARAÚJO, Emiliane Andrade et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.

ARSALANI, Soudabeh et al. Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles coated by natural rubber latex as MRI contrast agent. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 475, p. 458-464, 2019.

ATOCHE-MEDRANO, J. J. et al. Magnetite-based nanobioplatfrom for site delivering Croton cajucara Benth essential oil. **Materials Chemistry and Physics**, v. 207, p. 243-252, 2018.

BAÑOBRE-LOPEZ, M. et al. Control of bacterial cells growths by magnetic hyperthermia. **IEEE transactions on magnetics**, v. 49, n. 7, p. 3508-3511, 2013.

BANIN, Ehud; HUGHES, Diarmaid; KUIPERS, Oscar P. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, i. 3, p. 450–452, 2017.

BAI, Chen et al. Synthesis of Ultrasmall Fe₃O₄ Nanoparticles as T₁–T₂ Dual-Modal Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Rabbit Hepatic Tumors. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 4, p. 3585-3595, 2020.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. Antimicrobianos: Consulta Rápida. **ARTMED**, 2013

BEREKET, W. et al. Update on bacterial nosocomial infections. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 16, n. 8, p. 1039-44, 2012.

BERG, H. Magnetobiology—underlying physical problems. **Bioelectrochemistry**, v. 59, n. 1–2, p. 131, 2003.

BERG, J. Michael et al. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276-283, 2009.

BERK, S. G. et al. Static Uniform Magnetic Fields and Amoebae. **Bioelectromagnetics**, v. 18, n. 1, p. 81–84, 1997.

BIEDERER, S. et al. Magnetization response spectroscopy of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 20, p. 205007, 2009.

BINHI, V. N.; SAVIN, A. V. Molecular gyroscopes and biological effects of weak extremely low-frequency magnetic fields. **Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics**, v. 65, n. 5, p. 10, 2002.

BINHI, V. N.; SAVIN, A. V. Effects of weak magnetic fields on biological systems: physical aspects. **Physics-Uspekhi**, v. 46, n. 3, p. 259–291, 2003.

BINI, Rafael A. et al. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 324, n. 4, p. 534-539, 2012.

BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BJÖRKMAN, J. et al. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1479-1482, 2000.

CAHILL, K. Cell-penetrating peptides electroporation and drug delivery. **IET Systems Biology**, v. 4, n. 6, p. 367–378, 2010.

CARATTOLI, A. et al. Evolution of IncA/C bla_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the bla_{NDM-1} carbapenemase gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 783–786, 2012.

CARVALHO, J. F. Nanopartículas de magnetita com oxacilina obtida por moagem de alta energia para aplicações biomédicas. Dissertação de Mestrado - **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. Natal, 2013.

CARDOSO, V. F. et al. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 5, p. 1–35, 2018.

CHANG, J. J. Biological effects of eletromagnetic field on living cells - cap 6 - pag 231 - 261.pdf. In: POPP, F.; BELOUSSOV, L. (Eds.). **Integrative Biophysics**. [s.l: s.n.]. p. 231–261.

CHAVES, LCD. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável. 2004. **Tese de Doutorado**.

CIFRA, M.; FIELDS, J. Z.; FARHADI, A. Electromagnetic cellular interactions. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 105, n. 3, p. 223–246, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 2017.

CONTI, P. et al. A role for Ca²⁺ in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. **FEBS letters**, v. 181, n. 1, p. 28-32, 1985.

CONTI, P. et al. Effect of electromagnetic fields on two calcium dependent biological systems. **Journal of Bioelectricity**, v. 4, n. 1, p. 227-236, 1985.

DANEVČIČ, Tjaša; STOPAR, David. Asymmetric response of carbon metabolism at high and low salt stress in *Vibrio* sp. DSM14379. **Microbial ecology**, v. 62, n. 1, p. 198-204, 2011.

DI BIASIO, A.; CAMETTI, C. Polarizability of spherical biological cells in the presence of localized surface charge distributions at the membrane interfaces. **Physical Review E**, v. 82, n. 2, p. 021917, 2010.

DJIDJOU-DEMASSE, R.; ALIZON, S.; SOFONEA, M. T. Within-host bacterial growth dynamics with both mutation and horizontal gene transfer. **Journal of Mathematical Biology**, v. 82, n. 3, p. 1-30, 2021.

DOI, Yohei et al. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 5, p. 641-648, 2013.

ELAHEE, K. B.; POINAPEN, D. Effects of static magnetic fields on growth of *Paramecium caudatum*. **Bioelectromagnetics**, v. 27, n. 1, p. 26–34, 2006.

EL-KALIUBOBY, Mai Ismail; KHALIL, Alaa Mahmoud; EL-KHATIB, Ahmed Mohamed. Alterations of bacterial dielectric characteristics due to pulsed magnetic field exposure. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, v. 9, n. 2, p. 103-111, 2020.

ERGLIS, K. et al. Dynamics of magnetotactic bacteria in a rotating magnetic field. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1402–1412, 2007.

FAIZAN, A. Difference between diamagnetism, paramagnetism, and ferromagnetism. **Electrical Academia**, 2017. Disponível em: <electricalacademia.com/electromagnetism/magnetic-materials-para-dia-and-ferromagnetic-materials/> Acesso em: 05 de Maio de 2020.

FAVELA-CAMACHO, Sarai E. et al. How to decrease the agglomeration of magnetite nanoparticles and increase their stability using surface properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 574, p. 29-35, 2019.

FILIPIC, Jasmina et al. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. **Bioresource technology**, v. 120, p. 225-232, 2012.

FLIPO, D. et al. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+} , and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 54, n. 1, p. 63–76, 1998.

FOJT, L. et al. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. **Bioelectrochemistry**, v. 63, n. 1–2, p. 337–341, 2004.

- FOJT, L. et al. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 918–922, 2009.
- FUNK, R. H. W.; MONSEES, T. K.; OZKUCUR, N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 177–264, 2009.
- GONÇALVES, M. A.; RAMALHO, C. T. Agentes de Contraste para Imagem por Ressonância Magnética: Uma Revisão. **Revista virtual química, Lavras-MG, Brasil**, p. 1511-1524, 2017.
- GÓMEZ-RIOS, D. Effects and Mechanisms of Interaction of Electromagnetic Fields on Cells. n. January, p. 1–6, 2020.
- GOODMAN, R.; BASSETT, C. A. L.; HENDERSON, A. S. Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription. **Science**, v. 220, n. 4603, p. 1283–1285, 1983.
- GOODMAN, R.; HENDERSON, A. S. Exposure of salivary gland cells to low-frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 3928–3932, 1988.
- Grupo de Re-elaboração do Ensino de Física (GREEF). Física 3: Eletromagnetismo – 5ª Ed. **Editora da Universidade de São Paulo (EdUSP)**, p. 303, 2005
- GRUNDLER, W. et al. Mechanisms of Electromagnetic Interaction with Cellular Systems. **Naturwissenschaften**, v. 79, p. 551–559, 1992.
- GUEVORKIAN, K.; VALLES, J. M. Aligning *Paramecium caudatum* with static magnetic fields. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 8, p. 3004–3011, 2006.
- HALDER S, ADAV KK, SARKAR R, MUKHERJEE S, SAHA P, HALDAR S, et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **Springerplus**. 4(1):1–14, 2015.
- HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. Fundamentos de Física: Eletromagnetismo, vol. 3. Editora: **LTC**, 2007.
- HAIPOUR, Mohammad J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499-511, 2012.
- HELERBROCK, R. Radiação ionizante. In: **Radiação Ionizante**. [s.l: s.n.]. p. 1–4.
- HEMMERSBACH, R.; BECKER, E.; STOCKEM, W. Influence of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on the Swimming Behavior of Ciliates. **Bioelectromagnetics**, v. 18, n. 7, p. 491–498, 1997.
- HEWITT, P. Física Conceitual – 12ª Ed. **Bookman Editora**, p. 480, 2015.

- HU, B.; YAN, L.; SHAO, M. Magnetic-field effects in organic semiconducting materials and devices. **Advanced Materials**, v. 21, n. 14-15, p. 1500-1516, 2009.
- HUNT, R. W. et al. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 10, p. 4515–4558, 2009.
- HYLAND, G. Bioelectromagnetism. In: POPP, F.; BELOUSSOV, L. (Eds.). . **Integrative Biophysics**. [s.l: s.n.]. p. 117–148.
- INHAN-GARIP, A. et al. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on growth rate and morphology of bacteria. **International Journal of Radiation Biology**, v. 87, n. 12, p. 1155–1161, 2011.
- ISTRATE, Claudia Mihaela et al. Iron oxide nanoparticles modulate the interaction of different antibiotics with cellular membranes. **Rom. J. Morphol. Embryol**, v. 55, n. 3, p. 849-56, 2014.
- JABIR MS, NAYEF UM, KADHIM WKA. Polyethylene glycol-functionalized magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles: A novel DNA-mediated antibacterial agent. **Nano Biomed Eng**. 11(1):18–27, 2019.
- JAWORSKA, M. et al. Stimulation of pathogenicity and growth of entomopathogenic fungi with static magnetic field. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 123, n. 6, p. 295–300, 2016.
- JOHNSON, Luke et al. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. **The American journal of medicine**, v. 121, n. 10, p. 876-884, 2008.
- JUSTO, O. R. et al. Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic Field. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, 2006.
- JUUTILAINEN, J.; LANG, S. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 387, n. 3, p. 165–171, 1997.
- KADHIM, WKA; NAYEF, UM; JABIR, MS. Polyethylene glycol-functionalized magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles: A good method for a successful antibacterial therapeutic agent via damage DNA molecule. **Surf Rev Lett**. 26(10):1–15, 2019.
- KAHLMETER, G.; MENDAY, P.; CARS, O. Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 1005-1010, 2003.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He • Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 27, n. 3, p. 219-223, 1995.

KOFOID, E. Formation of an F' plasmid by recombination between imperfectly repeated chromosomal Rep sequences: a closer look at an old friend (F' 128 pro lac). **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 660-663, 2003.

KIM, Min-Ho et al. Magnetic nanoparticle targeted hyperthermia of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection. **Annals of biomedical engineering**, v. 41, n. 3, p. 598-609, 2013.

KOHNO, M. et al. Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP**, v. 7, n. 2, p. 143–148, 2000.

KORZELECKA-ORKISZ, A. et al. Modulating effect of a magnetic field on *Saprolegnia parasitica*, Coker, 1923 infecting trout (*Salmo trutta*, L.) eggs. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 32, n. 5, p. 913–922, 2016.

KURINČIČ, Marija et al. Effects of natural antimicrobials on bacterial cell hydrophobicity, adhesion, and zeta potential. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 67, n. 1, p. 39-45, 2016.

LEE, Jiwon; ISOBE, Tetsuhiko; SENNA, Mamoru. Preparation of Ultrafine Fe₃O₄ Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 177, n. 2, p. 490-494, 1996.

LEE, Tae-Rin et al. On the near-wall accumulation of injectable particles in the microcirculation: smaller is not better. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2013.

LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 2, p. 261–265, 1998.

LEWIS, Susan J.; MUELLER, Bruce A. Antibiotic dosing in critically ill patients receiving CRRT: underdosing is overprevalent. In: **Seminars in dialysis**. 2014. p. 441-445.

LIMA-TENÓRIO, M. K. et al. Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1–2, p. 313–327, 2015.

LIU, Xianqiao et al. Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 306, n. 2, p. 248-253, 2006.

- LITOVITZ, T. A. et al. Temporally incoherent magnetic fields mitigate the response of biological systems to temporally coherent magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 15, n. 5, p. 399–409, 1994.
- McKENZIE, G. J.; ROSENBERG, S. M. Adaptive mutations, mutator DNA polymerases and genetic change strategies of pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 5, p. 586-594, 2001.
- MARCILIO, I.; HABERMANN, M.; GOUVEIA, N. Campos magnéticos de frequência extremamente baixa e efeitos na saúde: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, n. 2, p. 105–123, 2009.
- MARKOV, M. S. **Magnetic and electromagnetic field dosimetry-necessary step in harmonization of standards**. In: **Proceedings of WHO Meeting**. Proceedings of WHO Meeting, Varna, 2001.
- MARKOV, M. S. Angiogenesis, magnetic fields and “window effects”. **Cardiology**, v. 117, n. 1, p. 54–56, 2010.
- MARRON, M. T. et al. Effects of sinusoidal 60-Hz electric and magnetic fields on ATP and oxygen levels in the slime mold, *Physarum polycephalum*. **Bioelectromagnetics**, v. 7, n. 3, p. 307–314, 1986.
- MARRON, M. T.; GOODMAN, E. M.; GREENEBAUM, B. Mitotic delay in the slime mould *Physarum polycephalum* induced by low intensity 60 and 75 Hz electromagnetic fields. **Nature**, v. 254, n. 5495, p. 66–67, 1975.
- MARRON, M. T.; GOODMAN, E. M.; GREENEBAUM, B. Effects of weak electromagnetic fields on *Physarum polycephalum*: Mitotic delay in heterokaryons and decreased respiration. **Experientia**, v. 34, n. 5, p. 589–591, 1978.
- MARSALEK, Roman. Particle size and zeta potential of ZnO. **APCBEE procedia**, v. 9, p. 13-17, 2014.
- MUKHERJEE, Riya et al. Tetracycline-loaded calcium phosphate nanoparticle (Tet-CPNP): rejuvenation of an obsolete antibiotic to further action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 9, p. 1929-1941, 2016.
- NAKAOKA, Y. et al. Effect of a 60 Hz magnetic field on the behavior of paramecium. **Bioelectromagnetics**, v. 21, n. 8, p. 584–588, 2000.
- NAKAOKA, Y.; ITOH, J.; SHIMIZU, K. Orientation of paramecium swimming in a static magnetic field: Dependence on membrane lipid fluidity. **Bioelectromagnetics**, v. 32, n. 1, p. 66–72, 2011.

NAKAOKA, Y.; TAKEDA, R.; SHIMIZU, K. Orientation of *Paramecium* Swimming in a DC Magnetic Field. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 8, p. 607–613, 2002.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger-7. **Artmed Editora**, 2018.

NIEMIROWICZ, Katarzyna et al. Core–shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 5443, 2016.

NORDMANN, G. C.; HOCHSTOEGER, T.; KEAYS, D. A. Unsolved mysteries: Magnetoreception—A sense without a receptor. **PLoS Biology**, v. 15, n. 10, p. 1–10, 2017.

NOVICKIJ, V. et al. Microsecond pulsed magnetic field improves efficacy of antifungal agents on pathogenic microorganisms. **Bioelectromagnetics**, v. 35, n. 5, p. 347–353, 2014.

NOVICKIJ, V. et al. Pulsed Electromagnetic Field Assisted in vitro Electroporation: A Pilot Study. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–10, 2016.

OHATA, R.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effect of a static magnetic field on ion transport in a cellulose membrane. **Journal of colloid and interface science**, v. 270, n. 2, p. 413-416, 2004.

OLIVEIRA, I. S. Física Moderna para iniciados, interessados e aficcionados. Vol 1. **Editora Livraria da Física**, p. 165, 2005.

ONCUL, S. et al. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bacterial membrane. **International Journal of Radiation Biology**, v. 92, n. 1, p. 42–49, 2016a.

ONCUL, S. et al. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bacterial membrane. **International Journal of Radiation Biology**, v. 92, n. 1, p. 42–49, 2016b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Plano de ação global sobre a resistência antimicrobiana. **Microbe Magazine**, v. 10, n. 9, p. 354–355, 2015.

OZLEM-CALISKAN, S. et al. Assessment of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on *Toxoplasma gondii*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 2, p. 159–167, 2016.

PARK, Jongnam et al. One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic Iron oxide nanoparticles. **Angewandte Chemie**, v. 117, n. 19, p. 2932-2937, 2005.

- PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.
- PATRA, Jayanta Kumar et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-33, 2018.
- PARVEEN, Suphiya; MISRA, Ranjita; SAHOO, Sanjeeb K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.
- PAZUR, Alexander; SCHIMEK, Christine; GALLAND, Paul. Magnetoreception in microorganisms and fungi. **Open Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 597-659, 2007.
- PRAKASH, Nidhi et al. Cytotoxicity of functionalized iron oxide nanoparticles coated with rifampicin and tetracycline hydrochloride on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Applied Nanoscience**, v. 9, n. 6, p. 1353-1366, 2019.
- PILLA, A. A.; MARKOV, M. S. Bioeffects of weak electromagnetic fields. **Reviews on Environmental Health**, v. 10, n. 3-4, p. 155-170, 1994.
- PIÑEIRO-REDONDO, Yolanda et al. The influence of colloidal parameters on the specific power absorption of PAA-coated magnetite nanoparticles. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2011.
- QIAN, Jingya et al. Biological effect and inactivation mechanism of *Bacillus subtilis* exposed to pulsed magnetic field: morphology, membrane permeability and intracellular contents. **Food Biophysics**, v. 11, n. 4, p. 429-435, 2016.
- RATHER, Irfan A. et al. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 4, p. 808-812, 2017.
- REN, L.; RAHMAN, M.S.; HUMAYUN, M.Z. *Escherichia coli* cells exposed to streptomycin display a mutator phenotype. **J Bacteriol**, v. 181, p. 1043-1044, 1999.
- RODRÍGUEZ-DE LA FUENTE, A. O. et al. *Entamoeba invadens*: Influence of 60 Hz magnetic fields on growth and differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 202-206, 2008.
- ROSEN, M. S.; ROSEN, A. D. Magnetic field influence on *Paramecium* motility. **Life sciences**, v. 46, n. 21, p. 1509-1515, 1990.
- RIBEIRO, G. A. P. As propriedades magnéticas da matéria: um primeiro contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.

RUŽIČ, R.; GOGALA, N.; JERMAN, I. Sinusoidal magnetic fields: Effects on the growth and ergosterol content in mycorrhizal fungi. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 16, n. 2, p. 129–142, 1997.

SADIGHIAN, Somayeh et al. Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 406-413, 2014.

SASAKI, T. et al. Correlation between thermotolerance and membrane properties in *Paramecium aurelia*. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 18, p. 3580–3586, 2006.

SANTOS, S. S. B et al. Antibacterial action of extremely low frequency electromagnetic fields on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **UFRN (TCC)**, 2018.

SCHAFER, Freya Q.; QIAN, Steven Yue; BUETTNER, Garry R. Iron and free radical oxidations in cell membranes. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 46, n. 3, p. 657, 2000.

SEGATORE, B. et al. Evaluations of the effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on growth and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

SEYBOLD, J. S. Introduction to RF Propagation. **John Wiley & Sons**, 2005.

SHAGHOLANI, Hamidreza; GHOREISHI, Sayed Mehdi; MOUSAZADEH, Mohammad. Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 130-136, 2015.

SINGH, S. S. et al. Magnetobiological effects on a cyanobacterium, *Anabaena doliolum*. **Electro-and Magnetobiology**, v. 13, n. 3, p. 227-235, 1994.

SOUSA, B. C. et al. Persistent extra-radicular bacterial biofilm in endodontically treated human teeth: scanning electron microscopy analysis after apical surgery. **Microscopy research and technique**, v. 80, n. 6, p. 662-667, 2017.

SOUZA, V. M. O. et al. *Giardia lamblia* e alergia respiratória: estudo em uma amostra de crianças de área urbana com frequência elevada da protozoose. **J. pediatr. (Rio J.)**, v. 88, n. 3 PG-233–238, p. 233–238, 2012.

STRAHL H, HAMOEN LW. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107(27):12281–6, 2010.

- STRAŠÁK, L.; VETTERL, V.; FOJT, L. Effects of 50 Hz magnetic fields on the viability of different bacterial strains. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 24, n. 3, p. 293–300, 2005.
- STRAŠÁK, L.; VETTERL, V.; ŠMARDA, J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. **Bioelectrochemistry**, v. 55, n. 1–2, p. 161–164, 2002.
- SUDARTI, PRIHANDONO, T., YUSHARDI, RIDLO, Z. R., KRISTINAWATI, A. Effective dose analysis of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure to growth of *S. termophilus*, *L. lactis*, *L. acidophilus* bacteria. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. 432, 2018.
- SUNEET, K. et al. Magnetic hyperthermia adjunctive therapy for fungi: in vitro studies against *Candida albicans*. **International Journal of Hyperthermia**, v. 36, n. 1, p. 545–553, 2019.
- SZTAFROWSKI, D. et al. The influence of N and S poles of static magnetic field (SMF) on *Candida albicans* hyphal formation and antifungal activity of amphotericin B. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 6, p. 727–734, 2019.
- TABRAH, F. L. et al. Effect of alternating magnetic fields (60-100 gauss, 60 Hz) on *Tetrahymena pyriformis*. **TIT Journal of Life Sciences**, v. 8, n. 3–4, p. 73–77, 1978.
- TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.
- TALAN, David A. et al. Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole—and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis. **Clinical infectious diseases**, v. 47, n. 9, p. 1150–1158, 2008.
- TALBOT, Delphine et al. pH-sensitive magnetic alginate/ γ -Fe₂O₃ nanoparticles for adsorption/desorption of a cationic dye from water. **Journal of Water Process Engineering**, v. 25, p. 301–308, 2018.
- TAYLOR, E. N.; WEBSTER, T. J. The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. **International journal of nanomedicine**, v. 4, p. 145, 2009.
- THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–721, 2005.

TIWARI, U. et al. Cloning of human erythropoietin gene in pVAX-1 vector for production of r-DNA epo. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 56-58, 2015.

TOFANI, S. et al. Static and ELF Magnetic Fields Induce Tumor Growth Inhibition and Apoptosis. **Bioelectromagnetics**, v. 10, n. 25, p. 184–186, 2001.

TOKUMASU F, OSTERA GR, AMARATUNGA C, FAIRHURST RM. Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by Plasmodium falciparum infection. **Exp Parasitol [Internet]**. 131(2):245–51, 2012.

TRATAMENTO DAS PRINCIPAIS INFECÇÕES COMUNITÁRIAS E RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Anvisa**, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/objetivos.htm. Acesso em: 02 de Julho de 2021.

VAN DER STARRE, Willize E. et al. Risk factors for fluoroquinolone-resistant Escherichia coli in adults with community-onset febrile urinary tract infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 650-656, 2011.

VELUSAMY, P. et al. Synthesis of oleic acid coated iron oxide nanoparticles and its role in anti-biofilm activity against clinical isolates of bacterial pathogens. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 59, p. 450-456, 2016.

VISSER, J. A. G. M. The fate of microbial mutators. **Microbiology**, v. 148, n. 5, p. 1247-1252, 2002.

VIKESLAND, Peter J. et al. Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 3, p. 567-577, 2016.

VOLOVA, T.G.; PRUDNIKOVA, S.V.; SUKOVATYI, A.G. et al. Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. **Appl Microbiol Biotechnol** 102, p. 7417–7428, 2018.

WALLECZEK, J.; LIBURDY, R. P. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. **FEBS Letters**, v. 271, n. 1–2, p. 157–160, 1990.

WANG, M. et al. Field-responsive superparamagnetic composite nanofibers by electrospinning. **Polymer**, v. 45, n. 16, p. 5505–5514, 2004.

WATANABE, Masatoshi et al. Effects of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on A549 cells. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15546-15560, 2013.

WEAVER, John B. et al. Frequency distribution of the nanoparticle magnetization in the presence of a static as well as a harmonic magnetic field. **Medical physics**, v. 35, n. 5, p. 1988-1994, 2008.

WILLIAMS, D. Essential biomaterials science. **Cambridge University Press**, p. 82, 2014.

WIOGO, Hilda TR et al. Stabilization of magnetic iron oxide nanoparticles in biological media by fetal bovine serum (FBS). **Langmuir**, v. 27, n. 2, p. 843-850, 2011.

WILSON, W. William et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. **Journal of microbiological methods**, v. 43, n. 3, p. 153-164, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**. [s.l: s.n.].

YADOLLAHPOUR, Ali; JALILIFAR, Mostafa; RASHIDI, Samaneh. Antimicrobial effects of electromagnetic fields: A review of current techniques and mechanisms of action. **J Pure Appl Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 4031-43, 2014.

YAMANE, Kunikazu et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 6, p. 951, 2005.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

YSERN, Pere et al. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. **Mutagenesis**, v. 5, n. 1, p. 63-66, 1990.

ZABLOTSKII, Vitalii et al. How a high-gradient magnetic field could affect cell life. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

ZHANG, Di et al. Anti-bacterial and in vivo tumor treatment by reactive oxygen species generated by magnetic nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 38, p. 5100-5107, 2013.

ZHENG, Xinyu et al. Novel anionic polyacrylamide-modify-chitosan magnetic composite nanoparticles with excellent adsorption capacity for cationic dyes and pH-independent adsorption capability for metal ions. **Chemical Engineering Journal**, v. 392, p. 123706, 2020.

ZHELTOVA, Victoriya et al. Fe₃O₄@ HAp core-shell nanoparticles as MRI contrast agent: Synthesis, characterization and theoretical and experimental study of shell impact on magnetic properties. **Applied Surface Science**, v. 531, p. 147352, 2020.

10. APÊNDICE

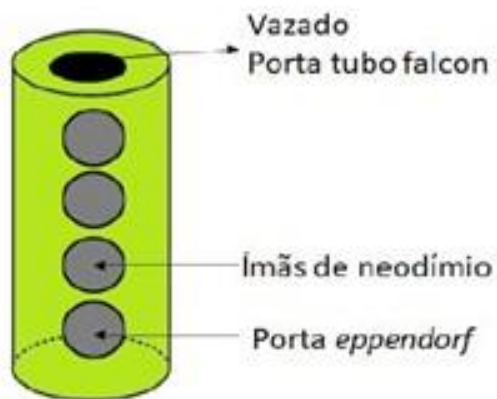


Figura suplementar 1: Campo magnético estático ($B = 400$ mT) utilizado nos ensaios de triagem. O aparato para geração de campo magnético estático é formado por suporte cilíndrico para tubos, tipo

falcon, contendo ímãs de neodímio acoplados. As suspensões bacterianas são adicionadas no tubo falcon.

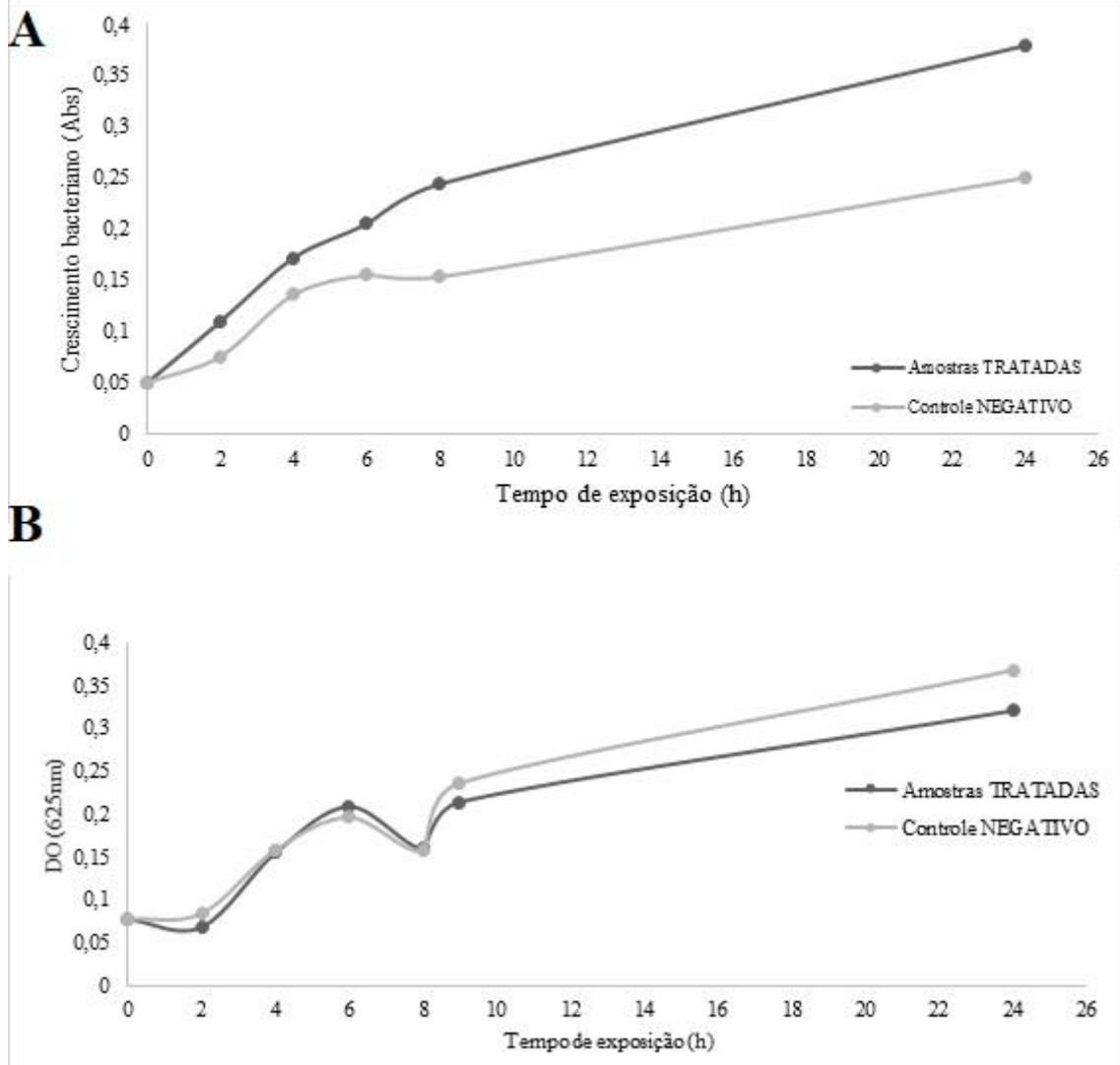


Figura suplementar 2: Ensaio de triagem. Ação do campo magnético estático sobre a curva de crescimento de *E. coli* DH5 α pVAX-1. A – Observa-se estímulo do crescimento bacteriano; B – Observa-se que não há diferença significativa sobre o crescimento bacteriano.

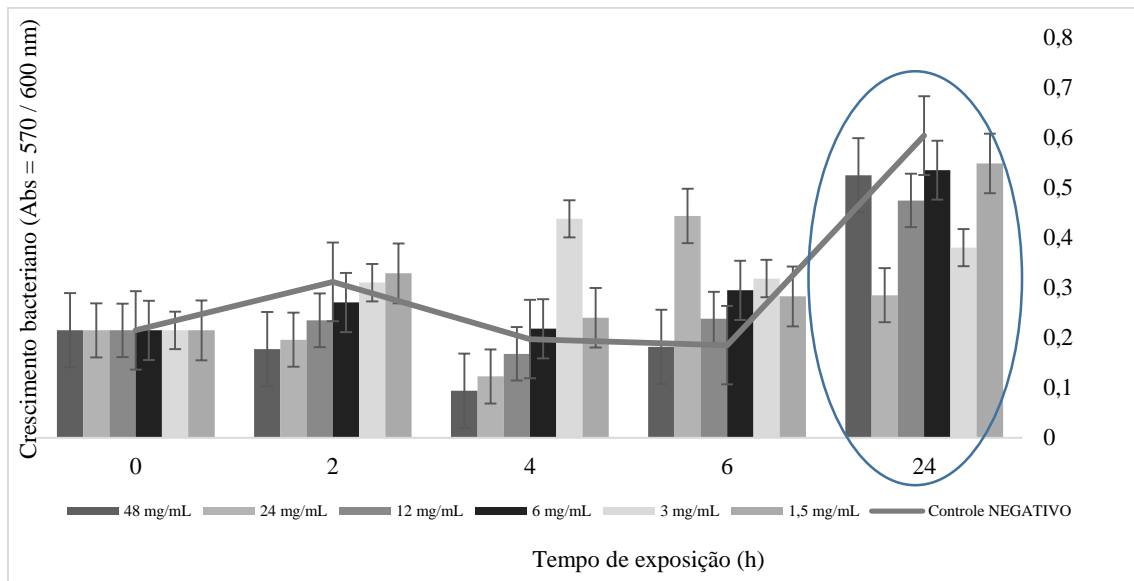


Figura suplementar 3: Ensaio de triagem. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) de Fe_3O_4 (1,5 a 48 mg/mL) sobre *E. coli* DH5 α pVAX-1 em 24 horas (circulado em azul). Nota-se que nas concentrações utilizadas, não houve inibição significativa de crescimento, sendo necessário aumentar a concentração nos próximos ensaios.