



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – *CAMPUS* ITABIRA

WIVYAN CASTRO LAGE

**NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MESOPOROSAS CARREGADAS
COM CIPROFLOXACINA: UM POTENCIAL SISTEMA CONTRA INFECCÃO
BACTERIANA**

ITABIRA

2021

PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MESOPOROSAS CARREGADAS COM
CIPROFLOXACINA: UM POTENCIAL SISTEMA CONTRA INFECÇÃO BACTERIANA

WIVYAN CASTRO LAGE

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Itajubá –
Campus Itabira, para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia de
Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares

Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Sachs

ITABIRA

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre me proteger, guiar, fornecer os recursos necessários para a realização dos meus sonhos e colocar as pessoas certas em meu caminho para auxiliar-me.

Falando em pessoas certas, agradeço ao professor Dr. Daniel Crístian pela parceria desde a iniciação científica em 2015, estou certa de que uma grande parcela das minhas conquistas profissionais e acadêmicas se deve aos seus ensinamentos. À professora Dra. Daniela Sachs por ter tornado real meu sonho de realizar o mestrado profissional em engenharia de materiais no *campus* Itabira MG, também pela amizade e orientação deste trabalho, que foi de suma importância para o aprimoramento de discussões e análises. E aos integrantes convidados para a banca de qualificação e defesa: Rossano e Amanda, pois as contribuições de vocês foram essenciais ao meu trabalho.

Expresso minha infinita gratidão aos meus pais, Wagner e Viviane, ao meu irmão, Walbert, e ao meu namorado Breno, por serem meu suporte e refúgio em todos os momentos da minha vida. E a todos os outros familiares que de alguma forma contribuíram com minha formação, pelo apoio, incentivo e compreensão pelos períodos ausentes para estudar.

O meu “muito obrigada” também é dedicado aos técnicos dos laboratórios da UNIFEI, Giane, Nilson, Jordânio, Ana, Everton e em especial ao Fábio (*in memoriam*). Aos demais colaboradores da UNIFEI, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. E a todos os colegas do Laboratório de Bioengenharia que tanto me ensinaram nesta trajetória, em especial à Nádia e à Yanka.

Agradeço aos meus colegas e gestores da Vale, por me apoiarem, incentivarem e permitirem minha ausência em alguns momentos em que precisei dedicar às atividades do mestrado.

Agradeço também à UNIFEI, à FAPEMIG e ao CNPq.

RESUMO: Atualmente, as doenças infecciosas ainda representam um grande desafio para a saúde humana e neste contexto as infecções bacterianas são uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Devido ao desenvolvimento de processos de resistência bacteriana, a busca por alternativas terapêuticas tem motivado o trabalho de diversos pesquisadores nas áreas biomédicas em muitos países. Nesse sentido, a encapsulação de agentes antimicrobianos tem surgido como alternativa relevante, capaz de melhorar a eficácia terapêutica, ao mesmo tempo em que se observa redução significativa dos efeitos adversos. Seguindo nessa mesma direção, no presente trabalho, nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs), carregadas com ciprofloxacina, foram preparadas com o objetivo de avaliar a potencial aplicação do sistema contra infecções bacterianas. MIONs e MIONs silanizados com 3-amino-propiltriétoxissilano - APTES (MIONs@APTES) foram obtidos com tamanho médio de $78,34 \pm 1,83$ nm e áreas superficiais de 258,27 e 186,27 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente. Ambas as amostras permitiram incorporar quantidades relevantes do fármaco ciprofloxacina ($> xx\%$). Também foi observado um perfil de liberação controlado do fármaco, sendo que as diferentes matrizes estudadas permitiram comportamentos cinéticos distintos, quando incubadas com fluido corpóreo simulado (SBF). Amostras de MIONs apresentaram comportamento de liberação compatível com segunda ordem cinética, enquanto a matriz MIONs@APTES permitiu a liberação seguindo uma cinética de primeira ordem. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das matrizes obtidas revelou que ambos os sistemas exibem perfis de biocompatibilidade sob células de linhagem celular humana normal (HEK-293), onde nenhum perfil citotóxico significativo foi observado. Por outro lado, os MIONs contendo o fármaco antibiótico incorporado, apresentaram relevantes propriedades antibiofilme contra cepa de *Staphylococcus Aureus*, quando comparado aos controles constituídos por ciprofloxacina livre e nanopartículas sem o fármaco. A partir de todos os resultados obtidos neste trabalho, os nanossistemas produzidos podem ser considerados como sendo um potencial sistema a ser aplicado no tratamento de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Nanopartículas de ferro mesoporosas; Sistema carreador para ciprofloxacina; Tratamento de infecções bacterianas; Atividade antibiofilme.

ABSTRACT: Nowadays, infectious diseases are still a great challenge for human health. Bacterial infections are one of the primary causes of worldwide mortality. Due to the development of resistance processes, the search for therapeutic alternatives has focused on many researchers of biomedical areas. In this sense, antimicrobial drugs' encapsulation has emerged as a relevant alternative, capable of improving the therapeutic effectiveness, while a significant reduction in the side effects can be observed. Following in the same direction, in the present work, mesoporous iron oxide nanoparticles (MIONs), loaded with ciprofloxacin, were prepared in order to evaluate the potential application of the system against bacterial infections. MIONs and MIONs silanized with 3-amino-propyltriethoxysilane - APTES (MIONs@APTES) were obtained with a mean size of 78.34 ± 1.83 nm and surface areas of 258.27 and 186.27 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, respectively. Both samples allowed to load relevant amounts of the drug, reaching a high incorporation rate and a controlled release profile, with different kinetics behavior, when incubated with simulated body fluid (SBF). MIONs samples showed release behavior compatible with second order kinetics, while the MIONs@APTES matrix allowed the release following a first order kinetics. The in vitro cytotoxicity evaluation of the obtained matrices revealed that both systems exhibit biocompatibility profiles under normal human cell lineage cells (HEK-293), where no significant cytotoxic profile was observed. On the other hand, MIONs containing the antibiotic drug incorporated showed relevant antibiofilm properties against a strain of Staphylococcus Aureus, when compared to controls consisting of free ciprofloxacin and nanoparticles without the drug. From all the results obtained in this work, the nanosystems produced can be considered as a potential system to be applied in the treatment of bacterial infections.

Keywords: Mesoporous iron oxide nanoparticles; Ciprofloxacin-loaded nanoparticles; Bacterial infections treatment; Antibiofilm activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1. Resistência bacteriana e a formação de biofilme.....	15
3.2. Nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas como agente antibacteriano.....	18
3.3. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....	21
3.3.1. Tratamentos térmicos.....	22
3.3.2. Síntese hidrotérmica.....	23
3.3.3. Método Sol-gel.....	24
3.3.4. Microemulsão.....	25
3.3.5 Co-precipitação.....	26
4. METODOLOGIA.....	28
4.1. Materiais.....	28
4.2. Síntese e funcionalização dos MIONs.....	28
4.3. Caracterizações físicas e químicas.....	32
4.3.2. Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR).....	33
4.3.5. Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas.....	34
4.4. Caracterização morfológica.....	35
4.5. Estudo da taxa de incorporação.....	36
4.6. Estudos da cinética de liberação.....	37
4.7. Avaliação <i>in vitro</i> da biocompatibilidade das matrizes.....	38
4.8. Avaliação da atividade antibiofilme.....	38
4.9. Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1. Caracterização físico-química.....	40
5.1.1. Difractometria de Raios-X (DRX).....	40

5.1.2.	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
5.1.3.	Análise Termogravimétrica (TG)	42
5.1.4.	Adsorção e dessorção gasosa (BET)	44
5.1.5.	Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas - Espectroscopia de espalhamento dinâmico da luz.....	47
5.2.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
5.3.	Taxa de incorporação e estudo cinético de liberação <i>in vitro</i>	49
5.4.	Avaliação de biocompatibilidade <i>in vitro</i>	54
5.5.	Avaliação da atividade dos CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs @ APTES sobre a formação do biofilme.....	56
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	REFERÊNCIAS	61
ANEXO 1	72
ANEXO 2	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNSSP – *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina.

VRE - *Enterococos* resistente à vancomicina.

APTES - 3-aminopropiltriétoxisilano.

BET - Brunauer-Emmett-Teller.

BJH - Barrett-Joyner-Halenda.

CFSE - Corante de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína.

CIPRO – Cirprofloxacina.

CIPRO-MIONs@APTES - Nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas silanizadas com 3-amino-propiltriétoxisilano e carregadas com ciprofloxacina.

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.

DAD - Detector de arranjo de diodos.

DLS - Dynamic Laser Scattering.

DMEM - Eagle modificado por Dulbecco.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

DRX - Difração de raios X.

EDS – Exopolissacarídeos.

FTIR- Espectroscopia por Transformada de Fourier.

GCs – Grupos de controle.

HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*.

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JCPDS - Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó.

LPS – Lipopolissacarídeo.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

MIONs – Nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas.

MIONs@APTES - nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas silanizadas com 3-amino-propiltriétoxisilano.

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

MSCs - células-tronco mesenquimais.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PDI - Índice de polidispersividade.

ROS - Espécie reativas de oxigênio.

RPM – Rotações por minuto.

SBF – Fluido corpóreo simulado.

TG – Termogravimetria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Modos de ação antibacteriano de nanopartículas metálicas por destruição da membrana plasmática, geração de radicais livres de oxigênio e destruição do DNA.	20
Figura 2 – Demonstrativo da metodologia aplicada na síntese dos MIONs, ilustrando as principais etapas realizadas.	29
Figura 3 – Sistemática da possível reação do processo de funcionalização dos MIONs com APTES.....	31
Figura 4 – Esquema demonstrativo da metodologia aplicada para a silanização dos MIONs para obtenção de MIONs@APTES.....	32
Figura 5 – Padrões de difração de Raios-X para amostras constituídas por: (A) MIONs, caracterizadas por picos das direções característica do cristal de magnetita (B) Cartão padrão do Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó (JCPDS) para magnetita (JCPDS N. 65.3167).	40
Figura 6– Espectros na região do Infravermelho de amostras constituídas por: (A) MIONs e (B) MIONs@APTES.	41
Figura 7 – Análise Termogravimétrica dos MIONs (Figura A) e MIONs@APTES (Figura B).	43
Figura 8 – Estudo da área superficial e distribuição de poros de matrizes MIONs e MIONs@APTES. As curvas laranja e azul representam as isotermas de adsorção e dessorção, respectivamente, obtidas de amostras de MIONs. As curvas rosa e verde representam as isotermas de adsorção e dessorção, respectivamente, obtidas de amostras de MIONs@APTES.	45
Figura 9 – Tipos de isotermas normalmente encontrados em análises de BET.	46
Figura 10- Análise do diâmetro hidrodinâmico médio dos MIONs.....	48
Figura 11 – Imagens coletadas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de MIONs, imagem da A com menor aumento que B.	49
Figura 12– Taxa de incorporação de soluções com concentrações de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ciprofloxacina em amostras de MIONs e MIONs@APTES. NS = diferenças estatísticas não significativas; (*) diferença estatística ao nível de $p < 0,5$	50
Figura 13– Perfil de liberação de ciprofloxacina das matrizes MIONs e MIONs@APTES após 166 h. Diferenças significativas entre as curvas podem ser observadas na área entre as linhas pontilhadas no nível de pelo menos $p < 0,5$	52
Figura 14 – Análises matemáticas do comportamento de liberação individual de ciprofloxacina a partir das matrizes MIONs @APTES (A) e MIONs (B); (C) estrutura molecular 2D da ciprofloxacina; (D) Uma estrutura 3D onde a região dos anéis de seis membros (linha pontilhada) representa a região não polar na qual as interações de Van der Waals podem ser estabelecidas com cadeias alquil dos APTES. Adaptado do banco de dados PubChem. Ciprofloxacina, CID = 2764, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacina	53
Figura 15 – Avaliação da biocompatibilidade in vitro em células HEK-293 tratadas com amostras constituídas por CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONS @ APTES. (A) Micrografia de células HEK-293 tratadas com solução de NaCl 0,9% como controle negativo. (B), (C)	

e (D) representam os resultados de células tratadas por 48 h com CIPRO-MIONs @ APTES-IONs a 200ug. mL⁻¹ (correspondendo a 0,98 µg de ciprofloxacina). (E), (F) e (G) representam os resultados de células tratadas por 48h com amostras CIPRO-MIONs, a 200 µg mL⁻¹ (correspondendo a 1,06µg de ciprofloxacina). Micrografia com amplificação de 900 X.55

Figura 16 - Imagens MEV de biofilmes de *S. aureus* caracterizadas por diferentes grupos: (A) e (B) células não tratadas (ampliação de 1000 X e 10.000 X, respectivamente) tomadas como controle negativo, (C) e (D) *S aureus* tratadas com ciprofloxacina livre a 300 µg. mL⁻¹ (ampliação de 1000 X e 10.000 X, respectivamente).57

Figura 17 – Imagens de MEV de biofilmes de *S. aureus* caracterizadas por diferentes grupos: (A) e (B) *S aureus* tratados com MIONs@APTES a 50 mg.mL⁻¹, tomados como controle (aumento de 1000 e 10.000 X, respectivamente). (C) e (D) CIPRO-MIONs a 50 mg.mL⁻¹ (143,18 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacina) (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente). Células (E) e (F) *S aureus* tratadas com CIPRO-MIONs @ APTES a 50 mg.mL⁻¹ (132,50 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacina) (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente).58

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças infecciosas ainda representam um grande desafio para a saúde humana, sendo uma das principais causas de mortalidade mundial. O uso de antibióticos tem sido o principal método utilizado na prática clínica para o tratamento de infecções bacterianas, em função de sua eficácia e resultados de custo-efetividade. No entanto tem sido observado em hospitais e nas comunidades o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase. Dessa forma a busca por alternativas terapêuticas tem sido foco de diversos pesquisadores das áreas biomédicas (RUDD *et al*, 2020; MEHMOOD *et al*, 2019; MOELLERING, 2012).

Em geral, as bactérias podem desenvolver resistência basicamente por meio de quatro mecanismos diferentes:

- (i) Limitação da quantidade de captação de fármacos;
- (ii) Modificação do alvo ativo, reduzindo a eficiência dos fármacos antibacterianos;
- (iii) Inativação de fármacos por meio de enzimas produzidas pelo microrganismo;
- (iv) Ação do efluxo da droga da bactéria célula.

As bactérias Gram-negativas fazem uso de todos os mecanismos descritos, enquanto as bactérias Gram-positivas, devido à ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na membrana externa, têm ações limitadas sobre os mecanismos de efluxo (CHANCEY *et al*, 2012; REYGAERT, 2018; KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), dados de 2019, a resistência bacteriana poderá ser a principal ameaça à saúde da comunidade global, estima-se que cause cerca de 10 milhões de mortes por ano até meados de 2050, além de danos catastróficos à economia, o que se deve principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos (O'NEILL, 2016). No Brasil, desde 2010 só é possível comprar antibióticos mediante a apresentação de receita e sua retenção. Todavia, ainda se observa o crescimento da venda de antibióticos no país. Nesse sentido, é urgente o desenvolvimento de terapias alternativas capazes de atuar

contra os mecanismos de resistência ao mesmo tempo que pode alcançar alta seletividade e baixos efeitos adversos (BAND *et al*, 2019; TORRES *et al*, 2019).

Buscando novas alternativas terapêuticas, observa-se uma melhora significativa no combate à multirresistência em microrganismos aplicando-se nanossistemas. Dentre os sistemas propostos nos últimos anos destacam-se as nanopartículas metálicas como ouro, prata e ferro. Estes materiais têm integrado um novo arsenal contra muitas cepas bacterianas, devido à elevada atividade antibacteriana de amplo espectro, alta seletividade e contorno das ações de resistência dos microrganismos (TANG & ZHENG, 2018; YUAN *et al*, 2017; TAO, 2018; MOHAMED *et al*, 2017).

Nanossistemas baseados em óxidos metálicos como os óxidos de zinco, cobre, titânio e ferro têm demonstrado importantes ações antibióticas (MEGHANA *et al*, 2015; AGARWAL *et al*, 2018; AZIZI-LALABADI *et al*, 2019; ARAKHA *et al*, 2015; PHILIP & KURIAKOSE, 2018). Os mecanismos de ação antimicrobiana dessas nanopartículas ainda são controversos e algumas questões permanecem sem solução. No entanto, o envolvimento de íons metálicos, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, danos à membrana celular, inibição enzimática e proteólise são processos que comumente ocorrem com diferentes tipos de cepas de bactérias tratadas com essas nanopartículas (DJURIŠIĆ, 2015).

O encapsulamento de fármacos antimicrobianos é outra abordagem que surgiu como uma alternativa importante para o combate ao MRSA, sendo possível melhorar o quadro terapêutico enquanto uma redução importante nos efeitos colaterais pode ser também observada (SANTOS *et al*, 2018; TRAM *et al*, 2017). Os lipossomas se apresentaram como um sistema inovador de entrega de drogas antibacterianas décadas atrás (DEOL *et al*, 1997). No entanto, devido à sua instabilidade física e química relevante, alguns pesquisadores têm investigado outros nanocarreadores alternativos, como nanopartículas lipídicas sólidas, vetores inorgânicos à base de sílica, polímero e sistemas híbridos de nanopartículas de óxido de ferro, as quais exibem alta estabilidade e relevante perfil de biodegradabilidade (KALHAPURE *et al*, 2017; ZHU *et al*, 2015; WESTMEIER *et al*, 2018; WANG *et al*; 2017). Seguindo na mesma direção, no presente trabalho, nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) carregadas com ciprofloxacina foram sintetizadas com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação do sistema contra infecções bacterianas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) e MIONs funcionalizados com o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) carregadas com ciprofloxacina e estudar *in vitro* a atividade antibiofilme das matrizes produzidas.

2.2. Objetivos específicos

- Obter nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) pelo método de co-precipitação e redução;
- Realizar a silanização do material obtido com 3-amino-propiltriétoxissilano (APTES) para obtenção de MIONs@APTES;
- Caracterizar física, química e morfológicamente os MIONs e MIONs@APTES;
- Estudar *in vitro* a taxa de incorporação de ciprofloxacina nas matrizes MIONs e MIONs@APTES;
- Avaliar a cinética de liberação do antibiótico em meio biológico simulado;
- Estudar *in vitro* a biocompatibilidade das matrizes produzidas;
- Estudar *in vitro* a atividade antibiofilme das diferentes matrizes contendo o ciprofloxacina.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Resistência bacteriana e a formação de biofilme

Dados da OMS, ano de 2016, afirmavam que a resistência bacteriana mata mais de 700 mil pessoas por ano em todo o planeta, outras informações fornecidas pela OMS, ano de 2019, estimam que infecções bacterianas serão a causa da morte de 10 milhões de pessoas por ano, até a data de 2050 (O'NEILL, 2016). Isso acontece, em parte, devido ao uso excessivo de antibióticos, capaz de provocar o desenvolvimento de cepas bactérias multirresistentes de difícil terapia. As bactérias são caracterizadas como seres unicelulares, procariontes e pertencentes ao reino monera, sendo essenciais ao planeta. Apesar disso, existem algumas famílias de bactérias prejudiciais à saúde humana, que podem causar inclusive a morte do indivíduo. Essas bactérias, após a infecção, podem residir no organismo do hospedeiro por longos períodos, o que ocorre devido à imunossupressão do hospedeiro e por mecanismos endógenos dos microrganismos de resistência aos antibióticos (TEIXEIRA *et al*, 2019; FISHER & GOLLAN, 2017; BAND *et al*, 2019; TORRES *et al*, 2019).

No início da década de 1940, cerca de 80% dos pacientes que contraíam a bactéria *Staphylococcus aureus* acabavam vindo a óbito. Após os estudos de Alexander Fleming (1881-1955) sobre os efeitos bactericidas de um contaminante fúngico produtor de penicilina, este fármaco começou a ser produzido em larga escala, aumentando as chances de cura das infecções causadas por essa bactéria. Todavia, dois anos após a produção em massa e o uso indiscriminado de penicilina, por volta de 80% dos isolados clínicos já eram resistentes a este antibiótico. Em 1959 a meticilina foi colocada em uso clínico e um ano depois, apenas, surgiu o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). As MRSA são um tipo de “superbactérias” difíceis de tratar, pois possuem elevada capacidade de adaptação e podem otimizar a expressão de genes criando cepas com maior capacidade de colonização, já sendo considerado uma ameaça urgente à saúde pública em muitos países (LAKHUNDI & ZHANG, 2018; NASKAR *et al*, 2020).

A resistência bacteriana é um problema em ascensão, pois para cada antibiótico em uso atualmente, já existem genes de bactérias resistentes. Esse fato pode ser explicado ao analisar-se a base genética. A partir de uma perspectiva evolutiva, as bactérias usam basicamente duas estratégias genéticas para se adaptarem ao ataque dos antibióticos: as mutações no gene e a aquisição de codificação de DNA. Os mecanismos da resistência, se baseiam em adaptações

celulares em que o microrganismo visa principalmente: (i) Diminuir a penetração das moléculas dos agentes terapêuticos. (ii) Incrementar significativamente o fenômeno físico de efluxo, onde os antibióticos são exocitados do meio intracelular. (iii) Modificar os locais de destino dos agentes terapêuticos no citosol das células e (iv) a inativação do antibiótico por enzimas (ROY & DONELLI, 2018; SMITH & KENDALL, 2020).

Em meados do ano de 1683, Antoni van Leeuwenhoek conseguiu observar e descrever biofilmes usando um microscópio primitivo na matéria de seus próprios dentes. No entanto, essa formação de bactérias e suas implicações não foi foco dos estudos de microbiologistas médicos até o início dos anos 1970, quando Nils Hoiby observou uma ligação entre a etiologia de uma infecção persistente e agregados de bactérias em pacientes com fibrose cística (VESTBY *et al*, 2020). A partir dessa descoberta, os biofilmes têm sido reconhecidos por estarem envolvidos em muitas infecções hospitalares. Já se comprovou, por meio de diversos estudos científicos, que os biofilmes contribuem para a patogênese, especialmente em infecções crônicas, como desenvolvimento de câncer, pois as bactérias que residem no biofilme podem ser resilientes ao sistema imunológico, aos antibióticos e a outros tratamentos. Este conhecimento é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias eficazes para o tratamento dessas infecções (LUO *et al*, 2021).

Pseudomonas aeruginosa e *Staphylococcus aureus* são bactérias que têm resistência à antibióticos, dentre outros fatores, em função da habilidade de formarem biofilmes. Darwin em seus estudos menciona que a sobrevivência das espécies é determinada pela habilidade de adaptação aos mais diversos ambientes. À luz deste ensinamento, observa-se em estudos *in vitro* e clínicos que a formação de biofilmes por bactérias estão intimamente relacionados com uma maior resistência às condições ambientais severas como fome e dessecação, além de ineficiência de tratamentos com antibióticos, fato que está relacionado com a dificuldade de as moléculas dos fármacos ultrapassarem a membrana dos biofilmes, que por sua vez são considerados uma das formas de vida mais bem sucedidas, sendo encontrados em uma vasta gama de ambientes (SPRINGER *et al*, 2016; CONLON *et al*, 2016; LUO *et al*, 2021).

Biofilmes bacterianos são aglomerados de bactérias que se fixam a uma superfície e/ou umas às outras e incorporam-se nessa matriz autoproduzida. A formação do biofilme pode ser explicada destacando-se alguns estágios distintos: (i) Adesão inicial, etapa em que as bactérias se fixam na superfície do hospedeiro (ou de algum dispositivo médico) através de adesinas associadas à superfície celular formando assim algumas micro colônias. (ii) Formação de

biofilme precoce, caracterizado pela divisão das bactérias e formação de exopolissacarídeos (EDS) também chamados de glicanos, responsáveis pelo aumento da adesão e auxílio na formação das matrizes que embutem as células bacterianas. (iii) Maturação do biofilme, onde estruturas tridimensionais se desenvolvem em uma estrutura multifuncional e protetora que permite a formação de microambientes químicos e físicos heterogêneos onde os microrganismos coexistem em interações poli microbianas e sociais. (iv) Dispersão, última etapa, onde as células deixam o biofilme para reentrar na fase planctônica e repetir o ciclo (KOO *et al*, 2017; ROY & DONELLI, 2018; VESTBY *et al*, 2020).

Roy & Donelli (2018) estudaram os mecanismos de formação de biofilmes vinculados a patologias e conseguiram demonstrar que 50% das infecções generalizadas causadas por superbactérias eram atribuídas à pacientes que possuíam dispositivos internos destinados à tratamentos médicos, como cateteres, marca-passos, próteses, dentaduras, válvulas cardíacas, dentre outros. Isso ocorre porque esses corpos estranhos, dentro do organismo do indivíduo, constituem uma superfície ideal para que as bactérias se fixem e formem o biofilme, protegendo-as das ações efectoras do sistema imunológico do hospedeiro.

Os desenvolvimentos mais recentes em terapia antibacteriana englobam sistemas de entregas de fármacos antibióticos responsivos a estímulos exógenos, com liberação térmica e/ou magnética. Também sistemas de entrega de fármacos responsivos a estímulos endógenos e nanopartículas baseadas em monocristais de antibióticos. De uma forma geral o uso das nanopartículas é o que se tem de mais promissor, pois fornece uma solução no longo prazo para as principais desvantagens da terapia antimicrobiana: resistência e gravidade dos efeitos colaterais para o organismo humano (CANAPARO *et al*, 2019).

Até o momento, muito já foi estudado e compreendido sobre a formação de biofilmes, porém sua resistência aos tratamentos existentes ainda representam um grande desafio na medicina. Neste ínterim, as pesquisas científicas têm desempenhado um papel fundamental para o desenvolvimento de formas eficazes de combater esse problema. Há estudos que demonstram a existência de biofilmes com a associação de diferentes tipos de bactérias, agravando ainda mais a situação. A estratégias mais aplicada atualmente para o tratamento de biofilmes é o uso de antibióticos, que deve ser selecionado com base na sensibilidade, bem como na capacidade de penetrar adequadamente na matriz do biofilme, aplicação de nanopartículas de óxidos metálicos, terapia fotodinâmica, uso de moléculas antibiofilme, porém pode-se afirmar que o tratamento de infecções por biofilmes requer terapias combinadas para uma maior eficácia

(ROY & DONELLI, 2018; DEVARAJ *et al.*, 2021). Nesse sentido, as nanopartículas são consideradas promissoras sistemas para o tratamento de infecções bacterianas baseadas em biofilmes, tanto no quesito relacionado à modificação superficial de dispositivos médicos, como na utilização como carreadores de fármacos.

3.2. Nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas como agente antibacteriano

Richard Feynman iniciou uma abordagem sobre os conceitos da nanotecnologia em uma palestra realizada em 1959, onde sugeriu ser possível manipular átomos individualmente em escala nanométrica. Desde então há um crescente interesse dos pesquisadores em objetos nas dimensões nanométricas. Tal interesse decorre de propriedades físicas e químicas únicas dessas nanopartículas, as quais advêm da grande fração de átomos exposta na superfície das partículas e do número finito de átomos no material ou em uma dimensão do material (FEYNMAN, 1959; NUNES, 2015). Essa ideia totalmente revolucionária para época, deu origem a diversos estudos da aplicabilidade dessas partículas, dentre elas o uso para o tratamento de doenças como as infecções bacterianas (QINDEEL *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2021).

Os sistemas nanoestruturados porosos, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) podem ser classificados em três diferentes categorias, conforme o diâmetro médio dos poros presentes na estrutura. (i) Materiais microporosos, caracterizados por terem diâmetro médio de poros com dimensões inferiores a 2 nm. (ii) Materiais mesoporosos, que possuem diâmetro médio de poros entre 2 e 50 nm. (iii) Matrizes macroporosas, que apresentam poros com diâmetro médio maiores do que 50 nm (SING *et al.*, 1985). A distribuição e o tamanho de poros é um fator muito importante para aplicações biomédicas. Por exemplo, para a aplicação de nanopartículas para o tratamento de doenças, é essencial que apresentem poros de diâmetros bem definidos, principalmente se forem destinados à liberação controlada de fármacos (CAUDA *et al.*, 2020).

O ferro é um elemento abundante e essencial à vida humana, possui baixa toxicidade, estabilidade química e biocompatibilidade. As nanopartículas de óxido de ferro têm chamado muita atenção em pesquisas recentes em função da variedade de aplicações como o transporte de fármacos de forma direcionada devido a vantagens inerentes às suas propriedades químicas, físicas e farmacológicas, tais como comportamento magnético, composição química, estrutura

cristalina, uniformidade granulométrica, propriedades de adsorção, estrutura superficial e solubilidade (GIESE, 2018; ANDRADE *et al.*, 2020).

Nesse âmbito, as nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) possuem vantagens em função de sua estrutura porosa, excepcional área superficial, seu tamanho de poro muitas vezes ajustável e da facilidade de funcionalização. Os MIONs permitem uma série de intervenções e interações biologicamente relevantes com as células. A eficácia desse sistema carreador para o tratamento de câncer já foi amplamente difundida. Uma vez que os biofilmes formados por bactérias formam um mecanismo de defesa similar ao dos tumores, enxerga-se um alto potencial nos MIONs para o tratamento de infecções bacterianas causadas por bactérias resistentes à antibióticos (COELHO *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2018).

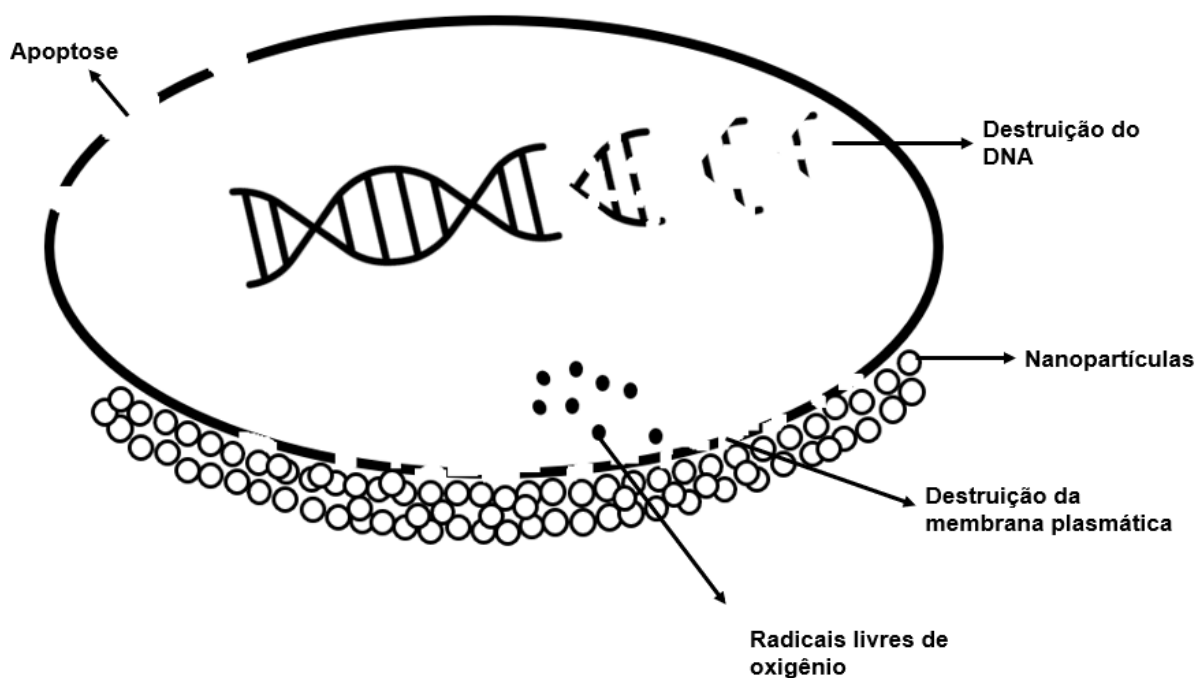
Nas últimas décadas, muito têm se preocupado sobre a introdução de fármacos em tecidos doentes, visto a complexidade do corpo humano. Isso se deve principalmente aos efeitos adversos, portanto o ideal é que os fármacos tenham interação apenas com o alvo e, ao mesmo tempo, sua liberação deve ser controlada para evitar os efeitos adversos. Os medicamentos convencionais usados para terapia antibacteriana apresentam várias limitações, o que se deve ao fato de os antibióticos terem baixa biodisponibilidade, penetração limitada nos locais de infecção e aumento de bactérias resistentes aos principais medicamentos. Embora novos sistemas de entrega controlada de fármacos como nanopartículas carregadas com agentes antibacterianos tenham sido projetados para superar essas limitações, a eficácia terapêutica não parece ter melhorado (WONG *et al.*, 2010; MOREIRA, 2014; VAZQUEZ *et al.*, 2017; CANAPARO *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos que as nanopartículas de óxidos metálicos usam para provocar a morte de bactérias, o mais difundido é o da geração de espécie reativa de oxigênio. Este mecanismo é caracterizado pela formação de compostos químicos oriundos do processo de ativação ou redução do oxigênio molecular. São moléculas instáveis e extremamente reativas, capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. Um exemplo é a peroxidação lipídica da membrana bacteriana, que provoca danos à membrana plasmática das células bacterianas, prejudicando as funções normais do DNA e levando à destruição da bactéria por apoptose (BEYTH *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2017; HSUEH *et al.*, 2017).

A Figura 1 ilustra os prováveis mecanismos de ação de nanopartículas metálicas na produção de espécie reativas de oxigênio (ROS) em células bacterianas. Quando as nanopartículas se fixam na superfície de membrana plasmática da bactéria, elas provocam a destruição da membrana, enquanto liberam radicais livres de oxigênio, que por sua vez

contribuem para a destruição do DNA. Com a membrana plasmática degradada e o DNA descontinuado, a bactéria morre por apoptose. Além do que já foi exposto, ainda podemos mencionar que os MIONs, por serem nanopartículas metálicas mesopososas, possuem a capacidade ampliada de incorporar fármacos, antibacterianos como a ciprofloxacina, o que pode potencializar a sua eficácia como um sistema antibacteriano.

Figura 1– Modos de ação antibacteriano de nanopartículas metálicas por destruição da membrana plasmática, geração de radicais livres de oxigênio e destruição do DNA.



Fonte: O autor.

Biofilmes microbianos, sejam no organismo, implantes ou dispositivos de biomateriais, são difíceis de serem eliminados por antibióticos devido à sua proteção por substâncias exopoliméricas que incorporam os organismos em uma matriz, impenetrável para a maioria dos antibióticos e células do sistema imunológico. Logo a aplicação de óxidos metálicos em sua forma nanoparticulada, como MIONs, têm sido atualmente propostos como sistemas antibacterianos. Os MIONs são capazes de propiciar a liberação espacial e temporalmente controlada de fármacos, permitindo uma melhor penetração em biofilmes de difícil tratamento, eliminando infecções de maneira profunda. Uma das principais vantagens das nanopartículas como agentes antibacterianos é que a grande proporção de área superficial que funciona como uma abordagem de alvo múltiplo enquanto os antibióticos funcionam como abordagem de alvo único (NASKAR *et al*, 2016, 2020; SATHYANARAYANAN *et al*, 2013).

Pesquisas recentes buscam ampliar o conhecimento relacionado aos mecanismos envolvidos na eficácia antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas de óxido de ferro. Porém, os dados disponíveis na literatura ainda são incompletos, controversos, apesar de apontarem para o envolvimento e geração de ROS, liberação de íons de ferro, internalização de partículas em bactérias e o da destruição mecânica direta da membrana bacteriana. Neste ínterim, estudos mais detalhados sobre os mecanismos em que as nanopartículas de óxidos metálicos como o ferro entram nas células bacterianas, suas interações com o meio intracelular e propriedades da membrana celular precisam ser conduzidos de forma a elucidar os mecanismos envolvidos no processo de morte bacteriana (HUSSAIN *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; SBALQUEIRO *et al.*, 2018).

Al-Shabib *et al.* (2018) estudaram o tratamento de biofilmes na indústria alimentícia usando nanopartículas de óxido de ferro e verificaram uma inibição na produção de componentes de biofilmes (alginato e exopolissacarídeos) em *P. aeruginosa*. Os autores também verificaram uma significativa diminuição da formação de biofilme em superfícies modificadas com essas nanopartículas. Ainda no mesmo trabalho, os autores propuseram a existência de interação entre as nanopartículas e as células da cepa *L. monocytogenes* em que houve pouco dano físico às bactérias, porém significativa inibição de crescimento de biofilmes. A conclusão final do estudo foi de que as nanopartículas de óxido de ferro podem combater a formação de biofilmes da bactéria citada.

Gabrielyan *et al.* (2020) realizaram uma pesquisa sobre os efeitos antibacterianos de nanopartículas de óxido de ferro e constatou atividade antibacteriana significativa contra *Salmonella typhimurium* MDC1759, tendo o número de colônias reduzido em quatro vezes. Os autores estudaram ainda os mecanismos de ação em que evidenciou a alteração da permeabilidade da membrana e da atividade da enzima ligada à membrana.

3.3. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Desde que as nanopartículas foram sintetizadas pela primeira vez e tiveram a sua aplicação disseminada, tem-se o desafio de obtenção desse material com tamanho e formas controlados. Assim, a escolha do método de síntese é uma importante questão que tem implicações diretas nas características finais das partículas sintetizadas (ALI *et al.*, 2016).

Neste tópico estão detalhadas as principais técnicas para a obtenção de MIONs, com foco na técnica de co-precipitação, que foi o método utilizado neste trabalho.

3.3.1. Tratamentos térmicos

A decomposição térmica quando realizada sob altas temperaturas, permite a obtenção de nanopartículas com distribuição de tamanho uniforme e alto padrão de cristalinidade. Quando comparadas com as nanopartículas obtidas por co-precipitação, observa-se que estas exibem menor cristalinidade por terem sido confeccionadas à temperatura ambiente. Alguns procedimentos para a decomposição térmica podem ser citados: (i) Método de injeção à quente, onde os precursores das nanopartículas são injetados na mistura reacional à alta temperatura; (ii) Método convencional, onde a mistura reacional é preparada à temperatura ambiente e depois aquecida num sistema de reação, podendo ser um sistema aberto ou fechado. É comum o uso de moléculas orgânicas, como o ácido oleico, para estabilizar a reação, afetando o tempo de nucleação, o que diminui o tempo gasto para o crescimento dos cristais, favorecendo partículas de tamanho pequeno (GIESE, 2018; MACHADO, 2021).

Zheng *et al.* (2019) relatam que pelo método de decomposição térmica também foi possível sintetizar nanopartículas porosas com elevada cristalinidade, elevado grau de pureza, em duas e três dimensões, a partir da evaporação de uma solução contendo o metal base e fazendo o uso de glicose como molde. É fortemente salientado na literatura que a glicose apresenta um papel crucial na morfologia de nanopartículas porosas. Singh & Chandra (2018) estudaram o método de decomposição térmica para a confecção de nanopartículas de $MnFe_2O_4$ e verificaram que as nanoferritas desenvolvidas possuíam nanoestrutura espinélica cúbica, elevado grau de pureza, tamanho médio do cristalito na faixa de aproximadamente 22,7 nm e as imagens de MEV evidenciaram um formato esférico das nanopartículas.

Nanopartículas de tamanho e formatos controlados têm sido sintetizadas pelo método de decomposição térmica, pois permite a obtenção de ampla diversidade de magnéticos, ópticos, eletrônicos, e nanomateriais catalíticos. Esses materiais individuais podem ser combinados entre si e posteriormente funcionalizados levam a materiais nanoestruturados multifuncionais, que geralmente apresentam dispersibilidade em água e baixa toxicidade, o que é necessário para aplicações em diversas áreas tecnológicas (VARANDA *et al.*, 2019).

3.3.2. Síntese hidrotérmica

O termo “hidrotérmico” é originado da geologia, para descrever um processo simples que pode ser visto na natureza durante a formação de alguns minérios, sendo desenvolvido através de simulação por cientistas principalmente para a obtenção de nanopartículas com propriedades selecionadas. Esse método pode ser aplicado para preparar pós de cerâmica ultrafinos. Associando essa técnica ao uso de micro-ondas, mistura mecânica e/ou campos elétricos é possível reduzir em pelo menos duas ordens de magnitude o tempo experimental, além disso a temperatura do micro-ondas compensa a irregularidade da temperatura durante o processo hidrotérmico. Outro fator importante a ser mencionado é que o tamanho do cristal, a morfologia e a aglomeração dos óxidos cerâmicos podem ser controladas ajustando a proporção dos reagentes, o pH da solução, o tempo e a temperatura da reação (WOJNAROWICZ *et al*, 2020).

Sínteses hidrotérmicas ou solvotérmicas promovem a cristalização sob altas temperaturas e altos valores de pressão de vapor, permitindo o crescimento de cristais em várias fases cristalinas e tendo como resultado nanopartículas de formas e tamanhos uniformes. Neste processo íons Fe^{3+} são adicionados a uma solução contendo ureia, acetato, ou citrato de sódio. Ao adicionar etilenoglicol, é formado uma dispersão homogênea, a qual deve transferida para um recipiente de aço inoxidável revestido com teflon, sendo posteriormente selado e levado à autoclave em temperaturas próximas a 200 °C em um período que, segundo a literatura, pode variar entre 8 e 24 h. As nanopartículas obtidas por este método normalmente apresentam condutividade iônica, magnetismo, magnetorresistência, baixa expansão térmica e ferroeletricidade, propriedades que tornam o método vantajoso em comparação com as rotas sintéticas tradicionais (GIESE, 2018).

Lawrence *et al* (2015) utilizaram o método hidrotermal para a confecção de nanopartículas mesoporosas e verificaram a possibilidade de sintetizar materiais mesoporosos na forma de gaiola tridimensional com tamanhos de poro ajustáveis, entre 9,9 e 15,6 nm, variando a temperatura da síntese entre 100 e 200 °C durante o tempo de envelhecimento de apenas duas horas, fazendo uso de copolímero. O uso de temperaturas inferiores a 150 °C durante a síntese contribui para ajustar o tamanho dos poros, o que se deve ao fato de que a maioria dos surfactantes se decompõe em temperaturas superiores a 130 °C.

Cao *et al* (2013) conseguiram sintetizar nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas por meio da técnica hidrotérmica seguida de ataque anisotrópico por ácido poliacrílico para formar as estruturas mesoporosas. Com isso conseguiu-se MIONs uniformes, de tamanho médio de 200 nm, com boa biocompatibilidade, possuindo potencial aplicação como agente antimicrobiano. Foi possível identificar por esse método a presença de pequenos defeitos e partículas incompletas.

Su *et al* (2015) prepararam MIONs por meio de um método assistido por ligante pela introdução de amina oleica e citrato de sódio como agentes co-coordenadores em uma reação hidrotérmica. A conclusão foi o desenvolvimento de um método escalonável e robusto para sintetizar MIONs ultra uniformes com poros hidrofóbicos tampados por bio-portões de lactoferrina. Verificou-se que os MIONs desenvolvidos podem promover a integração de abordagens teranósticas que combinam bioimagem, liberação controlada de múltiplas drogas, hipertermia e penetração profunda do tumor para terapia combinada e outras aplicações biomédicas.

Uma desvantagem do método hidrotérmico para a formação de nanopartículas mesoporosas é a necessidade um controle fino dos parâmetros, tais como temperatura, a natureza do precursor, teor de água, pH, catalisador, força iônica, natureza do agente quelante, fatores extremamente necessários para promover a seletividade de fase. Relata-se que as condições da reação são difíceis de reproduzir. A dificuldade de replicação é um fator negativo quando busca-se estudar e promover aplicação de nanopartículas (MUTUMA *et al*, 2015).

3.3.3. Método Sol-gel

O processo de sol-gel foi introduzido na década de 1980, visando resolver as dificuldades de replicação existentes em outros métodos. Têm como precursora uma solução coloidal de uma dispersão estável, o que favorece a aglomeração de partículas para formar as nanopartículas. Para a obtenção de MIONs em estado cristalino a reação usa de alcóxidos de ferro e sais de ferro, à temperatura ambiente, seguida de aquecimento (GIESE, 2018; MUTUMA *et al*, 2015).

Vazquez *et al* (2017) estudaram a preparação de nanopartículas mesoporosas para aplicação em liberação controlada de fármacos e verificou que o mecanismo de obtenção de nanoesferas e nanobastões podem ser obtidos mudando a concentração do surfactante e a

diluição do sol. O autor comprovou que o teor de surfactante desempenha um importante efeito na morfologia das partículas, passando de nanoesferas dispersas para aglomerados. Por outro lado, avaliou que a diluição do sol leva à formação de partículas em forma de bastão com uma área superficial específica de até $1480 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Em geral, conclui-se que é possível obter uma vasta gama de configurações de nanopartículas com características diferentes, alterando as condições de processamento pelo método sol-gel.

Mutuma *et al* (2015) foram outros autores que estudaram o método sol-gel para a obtenção de nanopartículas mesoporosas e evidenciaram amostras mesoporosas com tamanhos pequenos, bem dispersos, com elevada área superficial e alta cristalinidade. Os autores ainda relataram que sob diferentes tratamentos pode-se obter uma fase mista de estruturas cristalinas.

Mehmood *et al* (2019) realizaram a síntese de nanopartículas mesoporosas para estudos de citotoxicidade *in vitro* e obtiveram nanopartículas com cerca de 140 nm e tamanho de poro de aproximadamente 5,9 nm. Por esse método foi possível controlar o tamanho das nanopartículas e replicar por meio de uma síntese relativamente simples. Relata-se alto custo de algumas matérias primas usadas nesse método.

3.3.4. Microemulsão

Em uma síntese de MIONs por microemulsão, tem-se a formação de uma monocamada de moléculas de surfactante e uma interface entre óleo e água, com a parte hidrofóbica das moléculas de surfactantes dissolvidas na fase oleosa e a parte hidrofílica na fase aquosa, à temperatura ambiente. Os aglomerados recebem o nome de micelas reversas, sendo que é a fase aquosa que contém sais metálicos, enquanto a fase hidrofóbica pode ser uma mistura complexa de diferentes hidrocarbonetos e olefinas. A proporção desses componentes e o valor do equilíbrio hidrófilo-lipofílico do surfactante usado podem culminar na formação de MIONs em diferentes sistemas como óleo em água, água em óleo, bi-continua e micro-emulsões (GIESE, 2018).

Vaz-Ramos *et al* (2020) estudaram a síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas com núcleo de óxido de ferro superparamagnético e salientaram que as nanopartículas de sílica mesoporosas foram sintetizadas pela primeira vez em 1992 e desde então são amplamente usadas em liberação controlada de fármacos. A formação dos mesoporos é obtida nesse método pela inversão da emulsão. Verifica-se na literatura muitos artigos de nanopartículas de sílica mesoporosas contendo em seu interior óxido de ferro, para realizar a associação de

propriedades. Porém ainda é limitado o conhecimento da formação de nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas por este método.

O método de microemulsão pode ser usado para confecção de nanoestruturados como nanopartículas, nanoplacas, nanotubos, nanofibras, nanofios, entre outros. Toda via relata-se a presença de alguns defeitos associados à essa síntese, que não podem ser ignorados, em específico a baixa densidade de empacotamento, baixa estabilidade, baixa estabilidade termodinâmica e grande demanda de aglutinante (CHEN *et al*, 2019).

3.3.5 Co-precipitação

Dentre os métodos de síntese de nanopartículas, o método de co-precipitação, como já citado, é um procedimento muito simples, barato e altamente eficiente, tem sido altamente considerado pelos pesquisadores. Consiste na mistura de íons ferrosos (Fe^{2+}) e férricos (Fe^{3+}), numa razão estequiométrica de 1:2 em solução aquosa com posterior adição de uma base para que ocorra a precipitação, essa proporção de íons influencia diretamente na obtenção de nanopartículas com alto grau de pureza (GIESE, 2018; ROST *et al*, 2017).

A síntese de MIONs por co-precipitação é formada por nucleação e crescimento. Durante a nucleação é importante que o pH esteja entre 8 e 14, pois o pH básico favorece a formação do precipitado. A hidroxilação e a nucleação de nanopartículas de ferro são reações rápidas e de alto rendimento. Após a nucleação ocorre o crescimento dos núcleos. Se o processo de nucleação se sobressair em relação ao crescimento, teremos nanopartículas pequenas, além disso a presença de agitação durante a síntese favorece a obtenção de menores diâmetros. Relata-se que durante a síntese de co-precipitação, se a precipitação ocorrer em excesso de oxigênio e com o uso de agitação ultrassônica, é possível mudar os parâmetros de rede do material e obter uma estrutura mesoporosa. Neste método o precipitado pode ter a estrutura de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), temperaturas acima de 80°C favorecem a formação de magnetita, enquanto temperaturas abaixo de 60°C favorecem a formação de maghemita (ESLAMI *et al*, 2019; FERREIRA, 2009).

Xiao *et al.* (2018) aplicaram o método de co-precipitação para a obtenção de nanopartículas mesoporosas. Observou-se que as nanoestruturas se conectam para formar a estrutura mesoporosa, sendo que a aplicação do recozimento das partículas confere ambiente favorável para essa conexão, sendo etapa importante do processo.

Phul e colaboradores (2019) estudaram nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas e realizaram uma síntese por co-precipitação a partir de solução aquosa de cloreto de ferro, obtendo os precipitados a partir da adição de NaOH e NH_4 , após a centrifugação do precipitado, promoveu-se a secagem e então o recozimento do material a aproximadamente 750 °C, o que segundo os autores foi crucial para a formação das nanopartículas mesoporosas.

4. METODOLOGIA

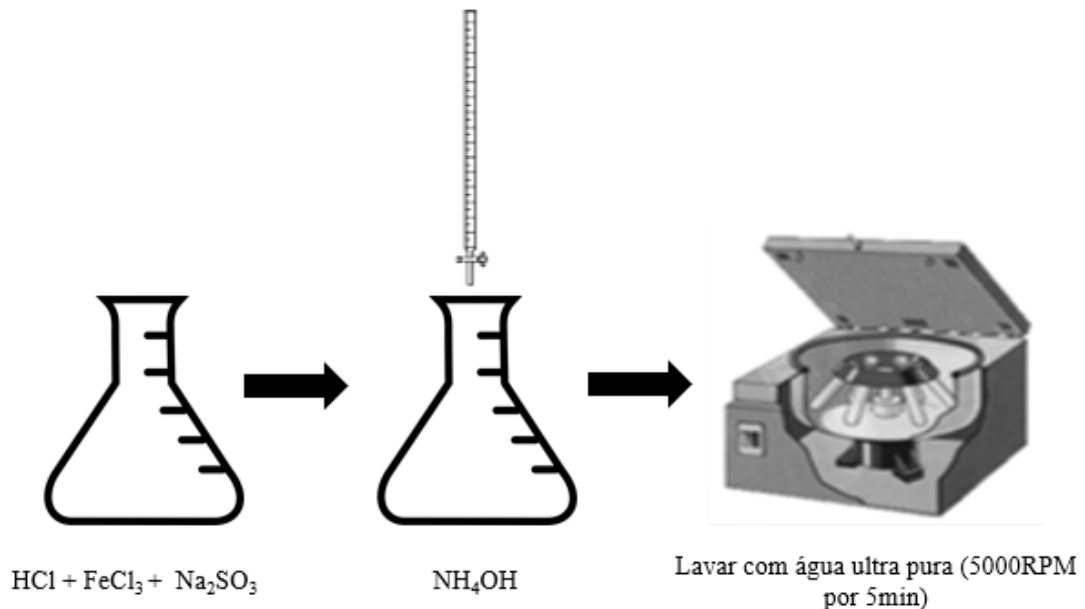
4.1. Materiais

No presente estudo foram empregados os seguintes reagentes, solventes e compostos: Hidróxido de amônio (27% p/v), cloreto de ferro hexahidratado (cloreto de ferro III) e sulfito de sódio (grau ACS), 3-aminopropil-trietoxisilano (99%), ciprofloxacina (padrão farmacêutico), fluido corpóreo simulado (SBF), soro fetal bovino, estreptomicina (grau ACS) e meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Acetonitrila (grau HPLC), etanol (95% e 99%), tris-hidroximetilaminometano (99,9%), caldo BHI-g (infusão de cérebro e coração) e ácido fosfórico (85%), adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil). A água ultrapura, produzida a partir de um *Smart 2 Pure 3 UV/UF* (Thermo, São Paulo, Brasil), foi usada em todos os experimentos. BD Horizon™, o reagente BD *Horizon Fixable Viable Stain 450* e o corante de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) foram adquiridos na BD (São Paulo, Brasil). Todos os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional.

4.2. Síntese e funcionalização dos MIONs

As nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) foram sintetizadas pelo método de co-precipitação e redução, com base no estudo anterior realizado por Ferreira (2009), com algumas modificações. Inicialmente foram preparadas soluções constituídas de HCl (0,5 M), FeCl₃ (2,67 M) e Na₂SO₃ (1,00 M) com água ultrapura, em temperatura ambiente. Na sequência, 7,5 mL da solução de FeCl₃ foram adicionados a 5,0 mL da solução de Na₂SO₃ (temperatura ambiente). A solução resultante foi agitada (800 RPM) durante 20 minutos até a obtenção de uma solução de coloração marrom. As nanopartículas foram obtidas após a adição lenta (10 mL.h⁻¹) de 40 mL de solução de NH₄OH concentrado em agitação mecânica. O material obtido foi lavado com água ultrapura em centrífuga (*ThermoScientific*, Asheville, Estados Unidos) 5000 RPM por 5 minutos. O processo foi repetido até que uma dispersão com pH neutro foi alcançada (Figura 2).

Figura 2 – Demonstrativo da metodologia aplicada na síntese dos MIONs, ilustrando as principais etapas realizadas.



Fonte: O autor.

As propriedades de superfície são parâmetros que influenciam significativamente no comportamento dos materiais nanoestruturados. Neste ínterim, a modificação da superfície é uma etapa comumente empregada com o objetivo de aumentar a dispersibilidade e estabilidade química de nanopartículas de óxido de ferro. Uma das modificações superficiais mais comuns utilizadas em trabalhos recentes publicados na literatura é a de silanização com moléculas contendo grupos alcoxissilanos, como o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). O APTES, atuando como agente de acoplamento de nanopartículas, é capaz de realizar ligações fortes com os átomos de oxigênio da estrutura cristalina do óxido de ferro, formando uma estrutura estável em meio aquoso (COSTA & SILVA, 2017).

O processo de funcionalização com soluções de alcoóxidos pode ser resumido em duas reações. Em uma primeira etapa, os alcoóxidos sofrem reações de hidrólise que pode ser descrita por uma substituição nucleofílica do tipo:



Na Equação 1, “M” representa um elemento metálico e “R” um ligante orgânico. Após esta etapa inicial ocorre a propagação de reações de condensação. As espécies hidrolisadas sofrem policondensação de acordo com reações de olação ou oxolação ligando os precursores na superfície do óxido. Olação é a etapa em que o ataque nucleofílico de um grupo OH negativamente carregado ocorre sobre um cátion metálico, levando a saída de um grupo aquo ligante da esfera de coordenação do metal, e a formação de pontes entre os metais do tipo "OH":

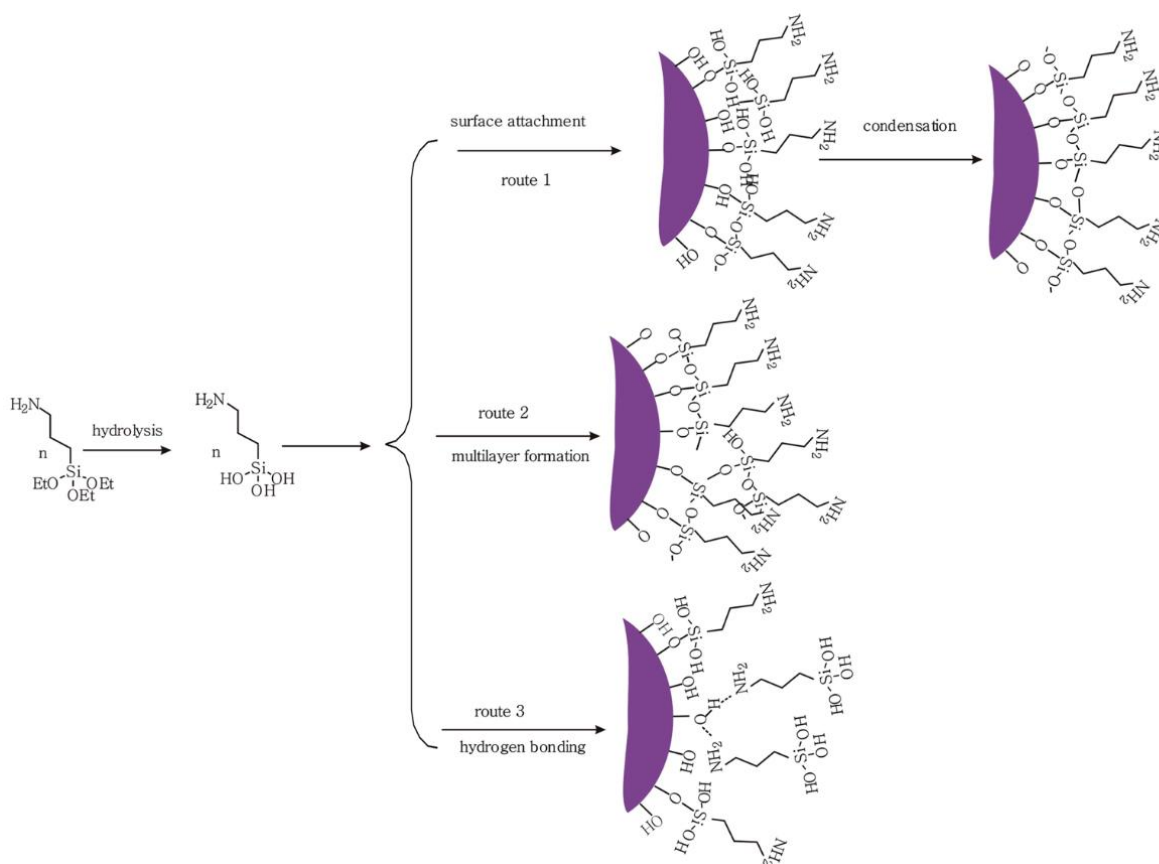


Já a etapa de oxolação envolve a reação de espécies hidroxiladas onde há formação de moléculas de água e pontes "oxo":



O avanço dessas reações resulta no recobrimento da superfície de óxido de ferro e formação de agregados entre os próprios precursores com diferentes probabilidades de interconexões entre eles (HIRATSUKA *et al.*, 1995; VIEIRA, 2014). Os precursores alcoxissilanos, quando hidrolisados em condições controladas, podem formar uma rede molecular baseada em organo-silício que recobre as nanopartículas (Figura 3) e as protege contra oxidação no ambiente fisiológico. Este recobrimento ainda tem o papel modificar o caráter químico da superfície das nanopartículas, por exemplo, reduzindo a hidrofiliabilidade delas. A superfície com grupos funcionais, que, a depender da sua natureza química podem ser empregados em etapas reacionais consecutivas com moléculas de interesse biológico (LIU *et al.*, 2013; NUNES, 2015).

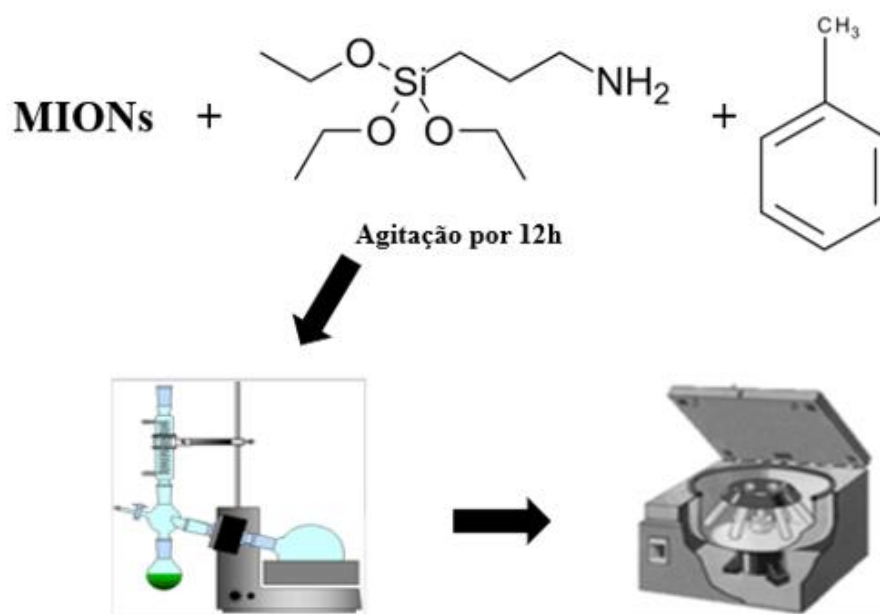
Figura 3 – Sistemática da possível reação do processo de funcionalização dos MIONs com APTES.



Fonte: Adaptado com permissão de LIU *et al* (2013). Disponível em <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/la403269u>>, acesso em 16/11/2021.

Logo pelos motivos explanados acima, as nanopartículas sintetizadas neste trabalho foram funcionalizadas com APTES. Neste procedimento, 200 mg de MIONs foram dispersos em 30,0 mL de tolueno e 1,0 mL de solução de APTES. O sistema foi deixado sob refluxo durante 24 h a 100 °C. Após, as matrizes funcionalizadas (MIONs@APTES) foram lavadas com água ultrapura em centrífuga (*Thermofisher, Asheville, Estados Unidos*) a temperatura ambiente ($25.000 \times g$, 10 min), até a obtenção de uma dispersão com pH neutro (Figura 4). Posteriormente as amostras de MIONs e MIONs@APTES foram lavadas com acetona para a retirada de eventuais grupos não ligados às nanopartículas, mas fisicamente adsorvidos, permitindo assim a obtenção de um material com maior grau de pureza.

Figura 4 – Esquema demonstrativo da metodologia aplicada para a silanização dos MIONs para obtenção de MIONs@APTES.



Fonte: O autor.

4.3. Caracterizações físicas e químicas

4.3.1. Difração de raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X é um método baseado na interferência construtiva de feixes de raios X que são espalhados pelos átomos de um cristal. Esta técnica analisa o nível de cristalinidade de uma substância, permitindo a identificação de fases cristalinas, arranjo atômico e a ainda a quantificação de elementos químicos, desde que em faixa adequada de concentração. As principais vantagens do DRX são a determinação do tipo de ligação química dos elementos presentes, análise quantitativa, imagem química e elementar da amostra (CALLISTER & RETHWISCH, 2002). Os difratogramas das amostras preparadas neste trabalho foram obtidos usando um difratômetro de raios-X Rigaku-Smart Lab (Tóquio, Japão). As análises foram conduzidas utilizando uma fonte Cu-K α de raios-X com comprimento de onda ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e o ângulo de espalhamento medido variou entre $0,5^\circ$ a 5° , filtro de níquel, usando aproximadamente 50 mg de amostras.

4.3.2. Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia por Transformada de Fourier é uma técnica em que são utilizados dois feixes de radiação eletromagnética a fim de se obter um interferograma. Assim, através da mudança do caminho óptico entre os dois feixes um sinal é gerado. Por meio de cálculos matemáticos, da transformada de Fourier, a distância do comprimento óptico pode ser convertida para o valor da frequência de radiação e vice-versa. A luz de comprimento de onda absorvida pelo material é característica de cada tipo de ligação química (Aufort *et al*, 2018).

A análise de FTIR foi realizada usando o método de pastilhas de KBr, onde 4 mg de amostras constituídas por MIONs e MIONs@APTES foram empregadas. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Frontier (Norwalk, Estados Unidos), no qual os espectros foram registrados na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com 64 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.3. Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica é uma das técnicas em que uma propriedade química ou física de uma substância é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (IONASHIRO & GIOLITO, 1980). Esses métodos incluem as análises: termogravimétrica, térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. O Conselho da Confederação de Análise Térmica e Calorimetria definiu análise térmica como “o estudo da relação entre uma propriedade da amostra e sua temperatura, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada de maneira controlada”. Em uma análise termogravimétrica, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (DENARI & CAVALHEIRO, 2012).

O equipamento utilizado nessa análise foi o Shimadzu DTG60 (Kyoto, Japão) e amostras de MIONs e MIONs@APTES constituídas por 4 mg. O gradiente de temperatura utilizado foi desde a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) até 900 $^{\circ}\text{C}$ com uma taxa de temperatura de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A atmosfera utilizada foi a de ar sintético.

4.3.4. Adsorção e dessorção gasosa (BET e BJH)

A técnica adsorção multimolecular ou método BET (Brunauer-Emmett-Teller) se baseia em cálculos matemáticos que visam descrever os processos de adsorção e dessorção física de moléculas de gás sobre uma superfície sólida e serve como base para uma importante técnica de análise para medição de área superficial específica de um material (GOMES *et al*, 2019). O método de BET é uma extensão a teoria de Langmuir e introduz o conceito de adsorção de multicamadas, segundo três hipóteses: (i) As moléculas de gás irão adsorver fisicamente na superfície sólida em camadas infinitamente. (ii) As diferentes camadas de adsorção não interagem entre si. (iii) A teoria se aplica a todas as camadas de adsorção (BRUNAUER, 1943; LOWEEL & SHIELDS, 1991).

A área superficial específica e a distribuição do tamanho dos poros das amostras de uma das matrizes produzidas (100 mg) foram estudadas por meio de isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio, determinadas a 77,3 K. O analisador de área de superfície e porosidade Quantachrome NOVA 2000e (Nova Iorque, EUA) foi empregado nas análises. O método Brunauer-Emmett-Teller (BET) foi utilizado e os dados de distribuição do tamanho dos poros foram obtidos a partir das isotermas de adsorção-dessorção pelo método Barrett – Joyner – Halenda (BJH).

4.3.5. Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas

O diâmetro hidrodinâmico médio, medido pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) é definido como o tamanho de uma esfera dura hipotética que se difunde da mesma forma como aquela da partícula a ser medida. Na prática, porém, partículas ou macromoléculas em solução coloidal não são esféricas. Em função das partículas em suspensão coloidal não serem sempre esféricas, o diâmetro calculado a partir das propriedades de difusão da partícula será a indicativa do tamanho aparente da partícula em suspensão (DI FILIPPO, 2021).

O tamanho médio, o índice de polidispersividade (PDI) das amostras constituídas por MIONs e MIONs@APTES foram determinados através da técnica *Dynamic Laser Scattering* (DLS) (retroespalhamento 90°), utilizando o equipamento *Zetasizer Zs* (Malvern Instruments, Inglaterra). Todas as medidas foram realizadas em triplicata, a 25 °C, amostras diluídas 10 vezes em solução salina (NaCl 0,9%).

4.3.6. Avaliação do Potencial Zeta

Potencial Zeta é o nome dado à diferença de tensão elétrica entre a superfície de cada coloide e sua suspensão líquida. Este efeito causado pela formação de cargas elétricas nas interfaces e estão associados ao movimento de partículas carregadas através de um meio contínuo ou do movimento do meio contínuo sobre uma superfície carregada. O Potencial Zeta é um indicador útil e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. A medida do Potencial Zeta é a chave para compreender processos de dispersão e agregação (CASANOVA, 2010).

O potencial Zeta das amostras constituídas por MIONs e MIONs@APTES foram determinados através de Correlação de Fótons Espectroscopia por técnica de Espalhamento Dinâmico de Laser (DLS) (retroespalhamento de 90 °) usando o equipamento Zetasizer Zs (Malvern Instruments, Inglaterra). Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C, as amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina (NaCl 0,9% p/v).

4.4. Caracterização morfológica

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura baseia-se no uso de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para a análise microestrutural de materiais sólidos. De acordo com Watt (1997) em um MEV típico, os elétrons, são emitidos termionicamente a partir de um filamento de tungstênio e acelerados através de um ânodo, sendo também possível obter elétrons por efeito de emissão de campo. O feixe de elétrons normalmente tem uma energia que vai desde algumas centenas de eV até 100 keV e é focalizado por uma ou duas lentes condensadoras, em um feixe com um ponto focal muito fino, com tamanho variando de 0,4 a 0,5 nm. Este feixe passa através de pares de bobinas de varredura e pares de placas de deflexão na coluna do microscópio. A imagem é formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe (GOLDSTEIN *et al.*, 1992).

Para a obtenção de imagens das nanopartículas foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da TESCAN (Brun, Tchéquia) que adiciona as capacidades de um espectrômetro de Micro-XRF completo a um microscópio eletrônico de varredura. As imagens foram coletadas com MEV operando a 30.0 kV em incrementos de 30.0 kx, e detecção de elétrons secundários.

4.5. Estudo da taxa de incorporação

A técnica de cromatografia é um poderoso método de separação com aplicação em todos os ramos da ciência. Especificamente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecido pela sigla em inglês HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*, é um método analítico que tem como objetivo separar as espécies químicas presentes numa determinada amostra consoante as suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, sendo deste modo um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de produtos através das áreas de picos que vão corresponder a cada um dos componentes da amostra. A técnica CLAE permite a separação dos analitos presentes na amostra consoante a sua afinidade com a fase estacionária contida na coluna cromatográfica relativamente à afinidade com a fase móvel. Quando associada com a MS, os analitos são detectados, resultando em espectros de massa específicos de cada composto, correspondendo como que a uma “impressão digital” do mesmo (JUNIOR *et al*, 2021).

Triplicatas de amostras constituídas por MIONs e MIONs@APTES (50 mg.mL^{-1}) foram incubadas em um agitador orbital IKA KS 260 (Staufen, Alemanha) a 190 RPM, com soluções de ciprofloxacina nas concentrações de $150 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, durante 72 h (temperatura ambiente). As concentrações do fármaco, nas diferentes soluções de incubação foram analisadas quantitativamente por meio da técnica de CLAE-DAD, no sistema Chromaster Hitachi (Tóquio, Japão).

A fase móvel consistiu em uma mistura volumétrica de água: acetonitrila na razão de 80:20 (pH 2,4, ajustado com ácido fosfórico - 85% P/V). As amostras foram eluídas isocriticamente. A coluna LiChrospher® RP-18 (Merck - São Paulo, Brasil) foi utilizada como fase estacionária. A taxa de fluxo foi de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A temperatura do forno de coluna foi ajustada para $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A detecção, realizada por detector de arranjo de diodos (DAD), foi obtida entre 210 e 290 nm, onde o comprimento de onda de 279 nm foi monitorado.

Uma curva de calibração foi preparada a partir de seis diferentes padrões (200, 100, 75, 50, 35 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que foram obtidos a partir de um padrão farmacêutico de ciprofloxacina (Material de Referência Certificado - Merck - São Paulo, Brasil). O espectro 3D e os cromatogramas obtidos foram processados pelo software Chromaster System Manager ($n = 3$).

A eficiência de incorporação de ciprofloxacina (do inglês *incorporation efficiency percentage* - IE%) nas nanopartículas foi calculada utilizando-se o quociente de concentração de ciprofloxacina não incorporada e a concentração inicial utilizada na preparação (equação 4). As amostras carregadas com ciprofloxacina foram designadas como CIPRO-MIONs@APTES e CIPRO-MIONs.

$$IE(\%) = 100 - \frac{[\text{ciprofloxacina não incorporada}]}{[\text{concentração inicial de ciprofloxacina}]} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: IE é a eficiência de incorporação.

4.6. Estudos da cinética de liberação

O estudo *in vitro* da cinética de liberação foi realizado empregando-se o fluido corpóreo simulado (do inglês *simulated body fluid* - SBF) como meio de liberação. O SBF foi preparado para ter uma concentração de íons próxima à do plasma sanguíneo humano (Na^+ 142,0; K^+ 5,0; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,5; Cl^- 147,8; HCO_3^- 4,2; HPO_4^{2-} 1,0 e SO_4^{2-} 0,5 mM), e tamponado a pH 7,25 com o tris-hidroximetil-aminometano em temperatura ambiente. Para este estudo foram escolhidas amostras ($n=4$) que apresentaram as melhores taxas de incorporação. As amostras constituídas por 30 mg de CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES foram pesadas e adicionadas em tubos contendo 1 mL de SBF. As amostras foram submetidas a agitação orbital (IKA KS 260, Staufen, Alemanha) em que foi utilizada a rotação de 80 $\text{ciclos}\cdot\text{min}^{-1}$ em temperatura ambiente. Após 4, 8, 30, 45, 55, 68, 75, 92, 116, 140, 164 e 188 horas (7,8 dias) amostras dos sobrenadantes foram coletadas e analisadas pela técnica de CLAE-DAD. Um total de 48 amostras foram empregadas neste estudo, sendo quadruplicada para cada tempo estudado. O modelo cinético de Korsmeyers-Peppas foi usado como modelo de difusão e a equação empírica foi usada com o objetivo de descrever a cinética de liberação de ciprofloxacina das nanopartículas com o tempo (equação 5).

$$\ln \frac{M_t}{M} = \ln K + n \ln t \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: K é uma constante, a razão M_t / M é a fração do soluto liberado, t é o tempo de liberação e n é uma característica do mecanismo de liberação considerado.

4.7. Avaliação *in vitro* da biocompatibilidade das matrizes

Todos os procedimentos de meio de cultura celular e citometria de fluxo foram realizados de acordo com os critérios de biossegurança exigidos. As análises foram realizadas usando células renais embrionárias humanas HEK-293 (ATCC® CLR-1573). O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina foi usado como meio de cultura. As células foram incubadas (*Thermo Fisher Scientific*, Asheville, Estados Unidos) em atmosfera controlada (5% CO₂), a 37 °C. Após as células atingirem a confluência adequada, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células foram transferidas para placas de cultura de células de 12 poços onde permaneceram por 24 h para adesão.

A citotoxicidade de dispersões constituídas por CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES, na concentração de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (correspondente a 1,14 μg e 1,06 μg , respectivamente de ciprofloxacina) e grupos controles, constituídos por células tratadas com MIONs e MIONs@APTES ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e NaCl 0,9%, foram estudados por meio da técnica de citometria de fluxo (BD FACsVERSE, San Jose, Estados Unidos), utilizando o kit *Fixable Viability Stain*[®]. Este kit tem um fluorocromo que possui emissão máxima a 450 nm, que reage ligando-se covalentemente às aminas da superfície celular e ao meio intracelular. As células mortas apresentam fluorescência aumentada quando comparadas às células vivas. Para cada amostra, foram realizadas 50.000 aquisições.

4.8. Avaliação da atividade antibiofilme

A atividade antimicrobiana das amostras CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES foi avaliada através da formação de biofilme, desenvolvido por Machado *et al.* (2020), com algumas modificações. A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para avaliar o comportamento de biofilmes da cepa *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC-23235) sobre lamínulas de vidro. O inóculo foi ajustado para o padrão de 0,5 McFarland e um

total de 16 discos de vidro esterilizado foram usados. Após o processo de esterilização, os grupos de controle (GCs) foram agrupados da seguinte forma (n = 4):

- (i) Grupo controle: (a) *S. aureus* não tratado; (b) ciprofloxacina livre (300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); (c) MIONs (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e (d) MIONs@APTES (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- (ii) Grupo de tratamento: (a) CIPRO-MIONs a 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (b) CIPRO-MIONs@APTES a 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (correspondendo a 143,58 μg e 132,50 μg de ciprofloxacina, respectivamente).

Os GCs (grupo de controle) foram colocados em placas de poliestireno de 24 poços com 1 mL de caldo BHI-g (Brain Heart infusion) e 0,1 mL do inóculo bacteriano. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C e, em seguida, cada GC foi preparado de acordo com os seguintes procedimentos:

- (i) lavagem asséptica com 3 mL de solução salina estéril (0,9% p/v);
- (ii) fixação com 2,5% glutaraldeído por 1 h;
- (iii) desidratação, conduzida por 5 lavagens com etanol (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 min e etanol, a 99,5% por 1 h.

As amostras foram secas durante a noite em incubadora bacteriológica a 37 °C e, posteriormente, montadas em suportes de alumínio, com fita de cobre, revestidos com ouro em atmosfera de baixa pressão com revestimento por *sputter* iônico (*Denton Vacuum Desk II*, *Denton Vacuum*, EUA). As topografias de superfície dos biofilmes foram visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-5310, JEOL, Japão), operando a 20 kV em incrementos de 1000 e 10.000 X.

4.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os grupos de dados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre os grupos foram medidas pelo pós-teste de Tukey onde os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

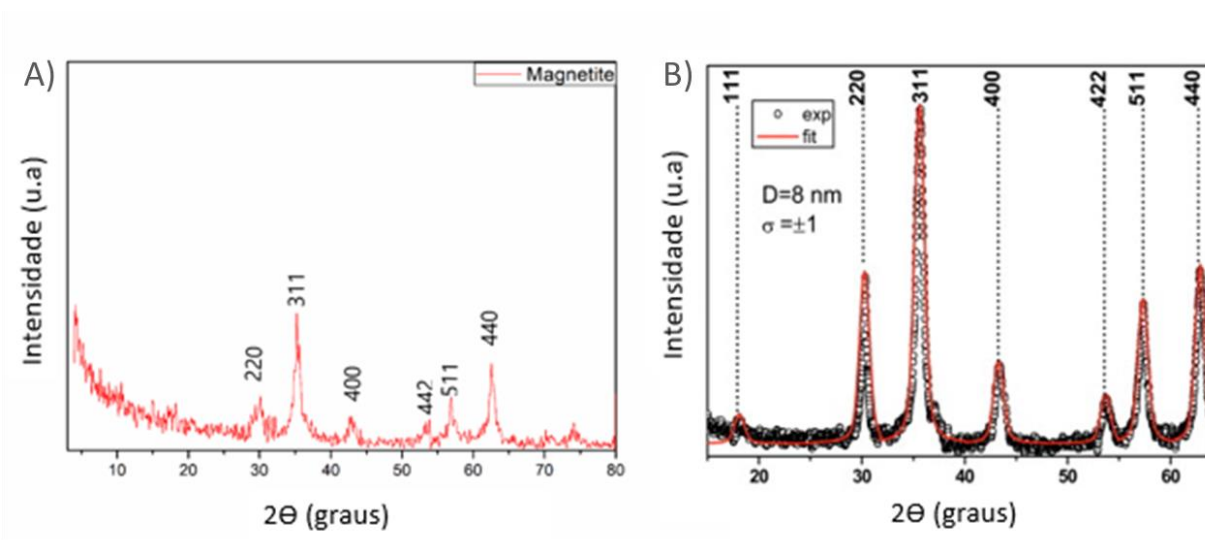
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização físico-química

5.1.1. Difractometria de Raios-X (DRX)

A investigação da fase cristalina das amostras obtidas foi realizada por difração de raios-X (DRX) usando radiação Cu-K α . O difratograma obtido para amostra constituída por MIONs está disponível na Figura 5A e revelaram picos estreitos compatíveis com a fase cristalina da magnetita, Fe₃O₄, composta por um total de seis picos, observados nas direções (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2) (5 1 1) e (4 4 0) que foram comparados com o cartão padrão do Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó (JCPDS) para magnetita (JCPDS N. 65.3167). O tamanho médio do cristalito foi calculado usando a equação de Scherrer e o software Match! (versão 3.10.169, licença estudantil). Para o cálculo foi considerada a largura a meia altura dos picos (FWHM), das direções (3 1 1), (4 4 0) e (2 2 0) (Figura 5B). Os dados obtidos revelaram um tamanho médio de cristalito de $8,01 \pm 0,09$ nm.

Figura 5 – Padrões de difração de Raios-X para amostras constituídas por: (A) MIONs, caracterizadas por picos das direções característica do cristal de magnetita (B) Cartão padrão do Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó (JCPDS) para magnetita (JCPDS N. 65.3167).



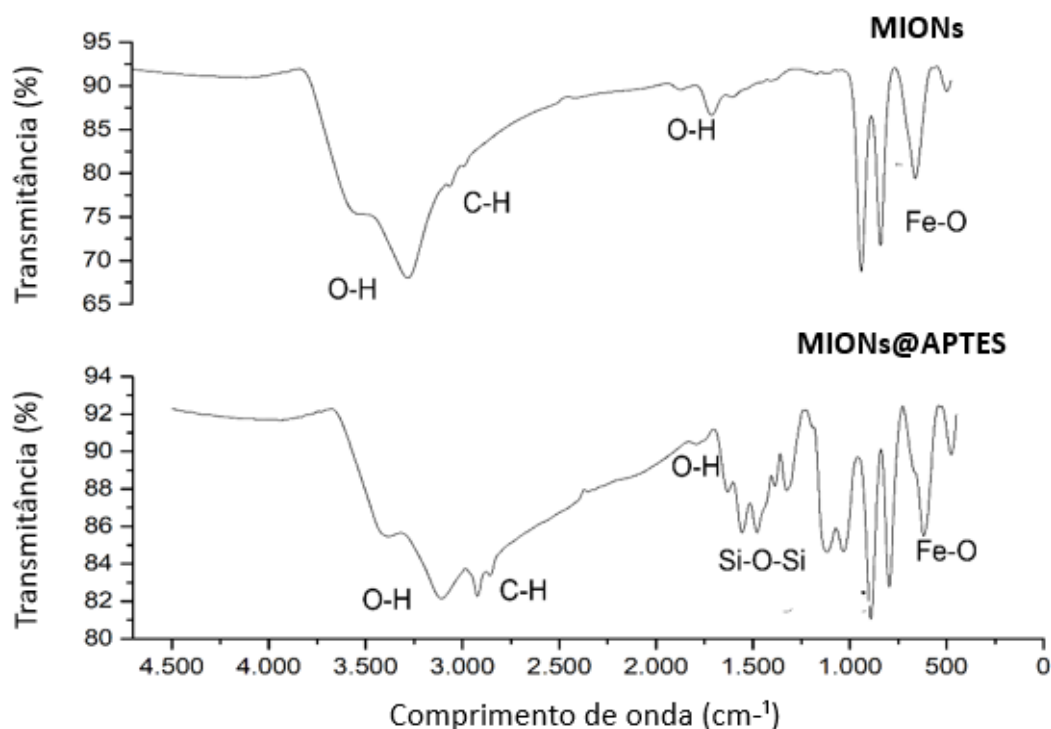
Fonte: O autor.

5.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado para auxiliar na identificação da funcionalização dos MIONs com grupos alcoxissilano, os resultados estão disponíveis na Figura 6, esta análise em conjunto com outras técnicas pode nos apresentar indícios de que as nanopartículas foram funcionalizadas. Muitos autores atribuem as bandas de absorção em 570 cm^{-1} ao estiramento da ligação Fe-O, ligação presente no óxido de ferro, magnetita (UNAL *et al.*, 2010; VIEIRA, 2014). A banda observada em 1040 cm^{-1} para amostras de MIONs@APTES, foi atribuída às vibrações de Si-O-Si e Si-O sugerindo a formação de camada de sílica que envolve as nanopartículas funcionalizadas (GALEOTTI *et al.*, 2011; VIEIRA, 2014). Uma banda larga em cerca de 3380 cm^{-1} foi observada e atribuída ao estiramento de ligações O-H, que pode ser atribuído à presença de água fisicamente adsorvida na superfície das nanopartículas.

Estes resultados sugerem que a funcionalização dos MIONs teve como resultado nanopartículas funcionalizadas com APTES, MIONs@APTES.

Figura 6– Espectros na região do Infravermelho de amostras constituídas por: (A) MIONs e (B) MIONs@APTES.



Fonte: O autor.

5.1.3. Análise Termogravimétrica (TG)

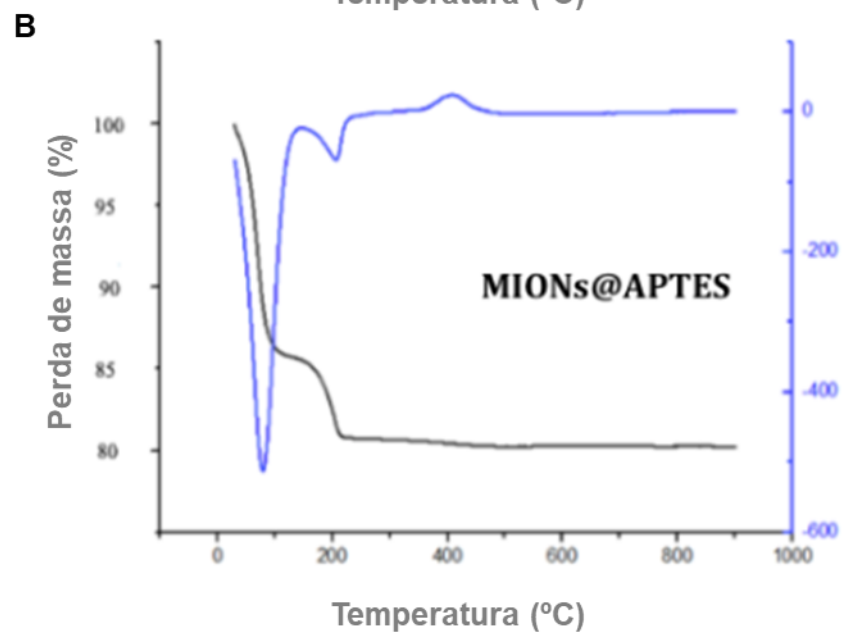
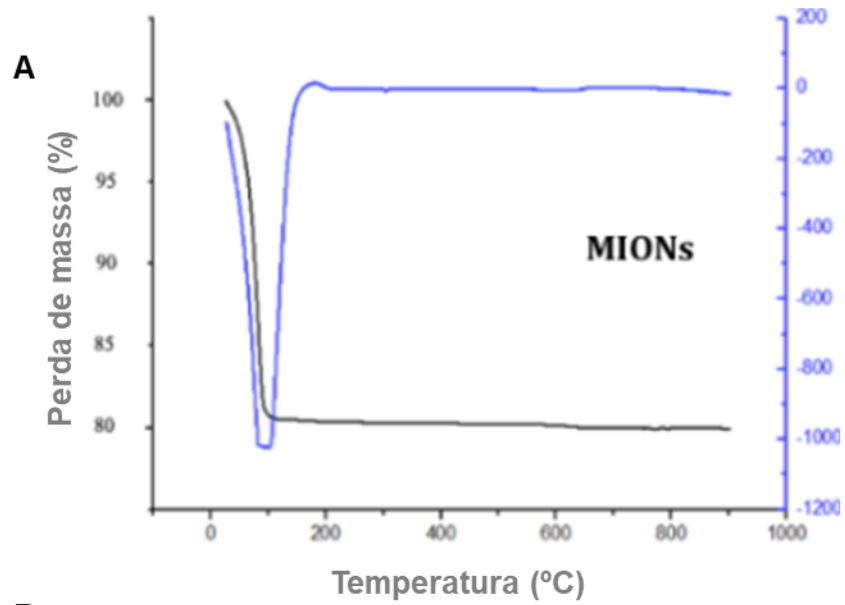
Buscando ainda, confirmar o processo de funcionalização por meio da presença de moléculas de APTES ancoradas nas nanopartículas, foi realizada a análise termogravimétrica. Os resultados estão disponíveis na Figura 7, onde estão os dados de TG e DTG, curva azul e preta, respectivamente. Os dados obtidos a partir de amostras MIONs revelaram uma perda de massa inicial de cerca de 21%, observado até 150°C, o que foi atribuído a moléculas de água que provavelmente estavam fisicamente adsorvidas pelos poros da matriz, a presença de água nas nanopartículas também foi observada na análise de FTIR. Por outro lado, as amostras MIONs@APTES revelaram um pico variando de 200 a 290°C, que foi atribuído à decomposição térmica de moléculas de APTES. Finalmente, um pico exotérmico de baixa intensidade, aparecendo na faixa de 400 a 480°C, foi atribuído ao produto de oxidação do Fe₃O₄ (FERREIRA, 2009).

Leão (2021) realizou um estudo comparativo de nanopartículas de óxido de ferro e nanopartículas funcionalizadas com APTES e verificou que o material funcionalizado perde menos massa que o material não funcionalizado em valores de temperatura entre 30 e 150 °C, a autora explicou esse fato em função da ancoragem de APTES reduzir as características de polaridade superficial. Já no estágio de temperatura de 150 °C a 600°C, notou-se que a perda de massa para as nanopartículas puras foi pouco significativa e muito menor que para as funcionalizadas com APTES. Esse maior valor para o material funcionalizado foi atribuído à decomposição e perda total dos grupos amino-alcoxisilanos incorporados na matriz. Esses dados também estão de acordo com os estudos feitos por Andrade *et al.* (2018), que no segundo estágio de aquecimento encontraram valores de perda de massa de aproximadamente de 2 % para nanopartículas puras e de aproximadamente de 14 % de perda de massa para nanopartículas funcionalizadas.

A partir de estudos prévios realizados por Ribeiro *et al.* (2019), foi possível o emprego da Equação 6 para calcular a perda de massa entre as temperaturas de 150 °C e 290 °C, atribuídas ao APTES, onde verificou-se uma perda de massa de 1,1mmol/g. Esses dados sugerem a funcionalização dos MIONs com o APTES.

$$\frac{N=\% \text{ Perda de massa (150 a 290°C)}}{100} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{221,37} \cdot \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} = 1,1 \text{ mmol/g} \text{ (Equação 6)}$$

Figura 7 – Análise Termogravimétrica dos MIONs (Figura A) e MIONs@APTES (Figura B).

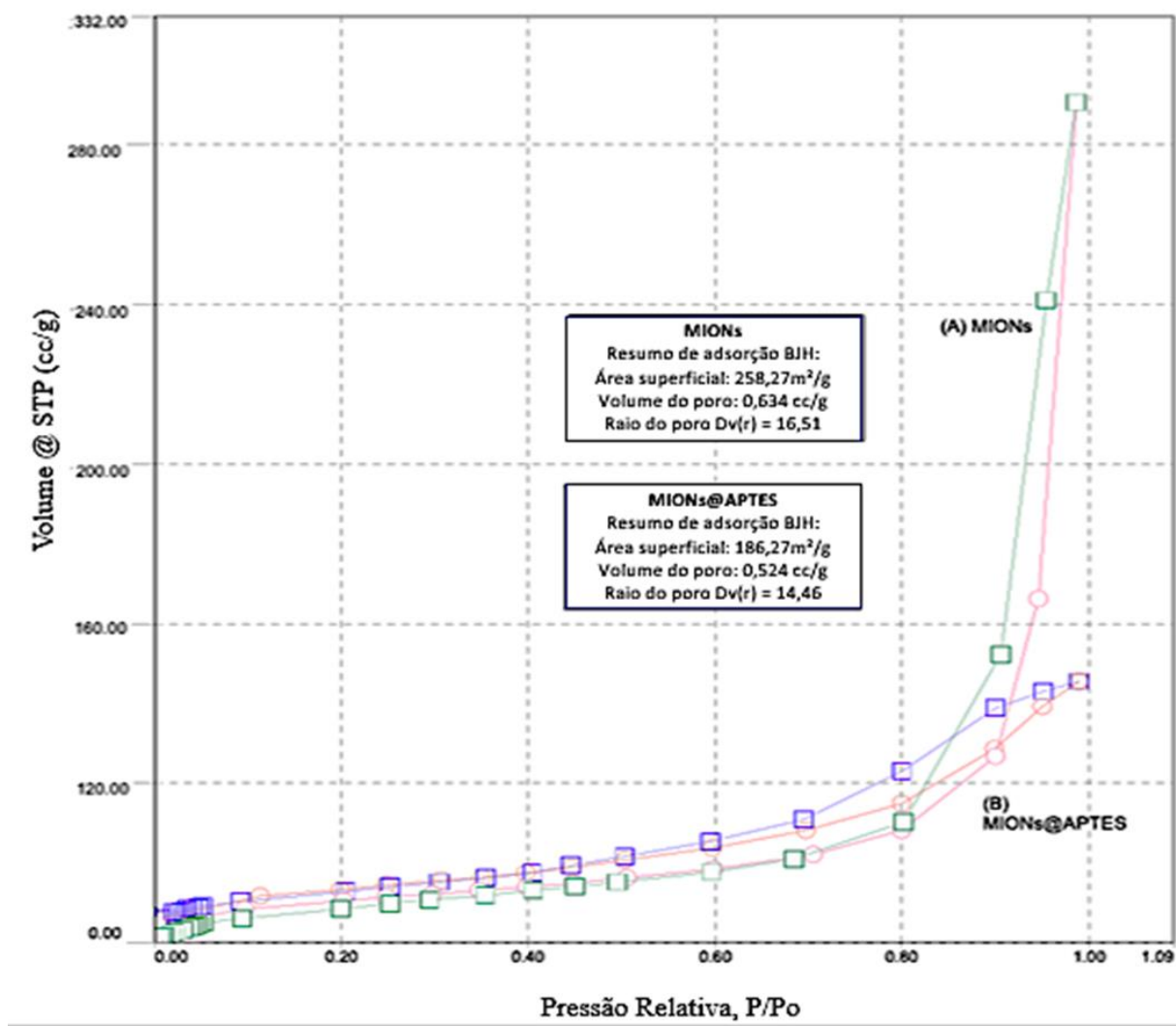


Fonte: O autor

5.1.4. Adsorção e dessorção gasosa (BET)

A área superficial e a distribuição de poros das diferentes matrizes obtidas foram estudadas através da técnica de adsorção e dessorção gasosa. A construção de uma isoterma de adsorção é de fundamental importância, pois sua forma revela muitos detalhes sobre as características do material. A isoterma mostra a relação entre a quantidade molar de gás adsorvido ou dessorvido por um sólido, a uma temperatura constante, em função da pressão do gás. Por convenção, a quantidade de gás adsorvida pelo seu volume V_a sob condições padrão de temperatura e pressão (0 °C e 760 torr) é expressa, enquanto a pressão é determinada pela pressão relativa P / P_0 , ou seja, a relação entre a pressão de trabalho e a pressão de vapor do gás na temperatura utilizada (TEIXEIRA, 2018). A histerese gerada neste estudo é mostrada na Figura 8.

Figura 8 – Estudo da área superficial e distribuição de poros de matrizes MIONs e MIONs@APTES. As curvas laranja e azul representam as isotermas de adsorção e dessorção, respectivamente, obtidas de amostras de MIONs. As curvas rosa e verde representam as isotermas de adsorção e dessorção, respectivamente, obtidas de amostras de MIONs@APTES.



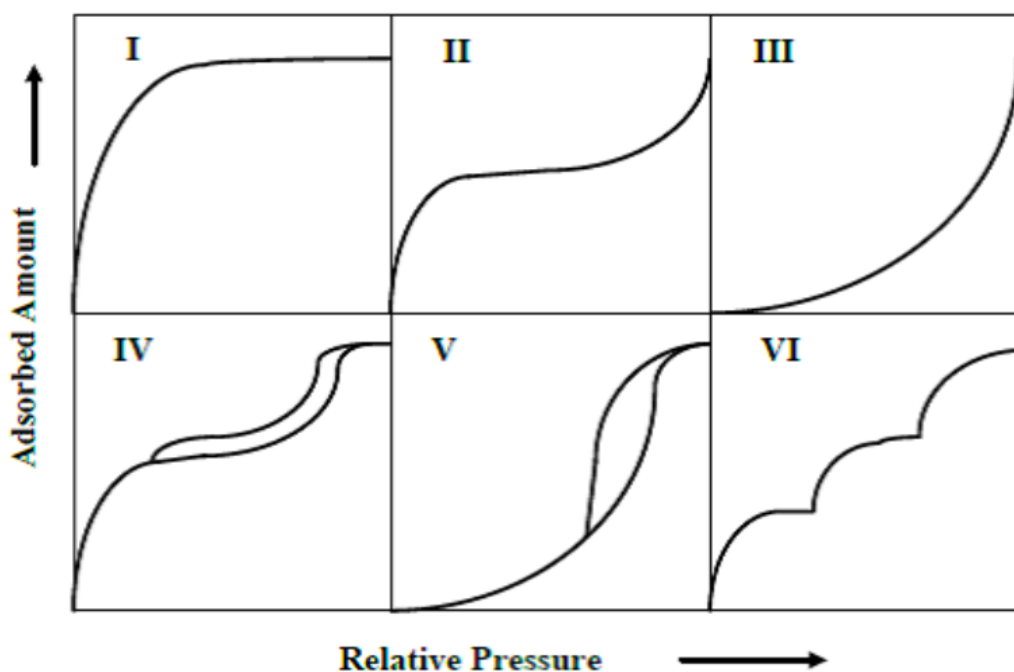
Fonte: O autor.

As curvas isotérmicas foram construídas por adsorção e dessorção de nitrogênio, a partir de baixas pressões relativas, visando preencher os microporos, obtendo-se a formação de um filme delgado. Em ambas as amostras, quando a pressão relativa atinge valores elevados ($P/P_o \cong 0,9$) ocorre o preenchimento dos macroporos. A região onde há o principal consumidor de nitrogênio está localizada entre o $P/P_o > 0,6$, para MIONs@APTES e $P/P_o > 0,85$ para

amostras MIONs, revelando a presença de quantidade relevante de mesoporos grandes na matriz não silanizada, quando comparada às amostras MIONs@APTES.

As curvas obtidas foram comparadas com isoterma típicas de diferentes sistemas porosos conforme a Figura 9. Os dados obtidos revelam que as curvas obtidas exibem uma característica típica das isotermas dos tipos IV e V (THOMMES *et al*, 2015). O loop de histerese reflete a transição de fase de equilíbrio e aparece quando as curvas de adsorção e dessorção não coincidem, e este comportamento é típico de materiais mesoporosos preenchidos com multicamadas, consistente com as porosidades relatadas recentemente para nanopartículas de óxidos de ferro mesoporosas. Além disso, esses materiais têm dessorção a uma pressão menor do que a respectiva adsorção.

Figura 9 – Tipos de isotermas normalmente encontrados em análises de BET.



Fonte: TECHNOLOGY, Gas Adsorption. Adsorption Equilibrium. 2016. Disponível em: <<https://gasadsorptiontech.wordpress.com/2016/01/08/adsorption-equilibrium/>>. Acesso em: 05/07/2021.

A curva isotérmica apresentou correlação de 0,9945, e o método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) foi empregado para determinar o volume médio e o diâmetro dos poros. As amostras constituídas por MIONs revelaram uma área superficial de $258,27 \pm 7,51 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e um diâmetro médio dos poros de 33,02 nm. Por outro lado, as amostras MIONS@APTES apresentaram $186,27 \pm 6,68. \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e diâmetro médio dos poros de 28,92 nm. Devido ao

diâmetro dos poros, os materiais foram caracterizados como mesoporosos, que são materiais cujo diâmetro de poro compreende tamanho entre 2 e 50nm (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos poros de acordo com o diâmetro.

Classificação	Diâmetro (nm)
Microporo	$\Phi < 2$
Mesoporo	$2 < \Phi < 50$
Macroporo	$\Phi > 50$

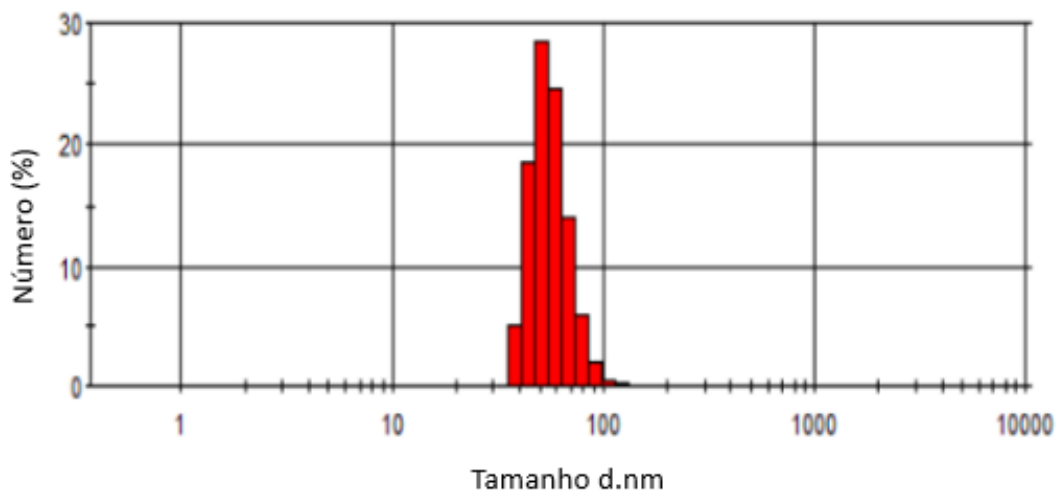
Fonte: O Autor

Como esperado, a silanização promove uma redução significativa da área superficial das nanopartículas, calculada em torno de 27% (de 258 a 186 m².g⁻¹). Naghiloo *et al.* (2015) também observaram uma redução de aproximadamente 65% (de 879 para 306 m².g⁻¹), após a silanização das nanopartículas de sílica com APTES. Goscianska *et al.* (2017) experimentou uma redução mais severa, atingindo cerca de 70% da área superficial (de 740 m².g⁻¹ para 220 m².g⁻¹) Essa redução de área após o processo de silanização, pode reduzir significativamente a taxa de incorporação de medicamentos. Além disso, mudanças significativas no comportamento de liberação podem ocorrer uma vez que as características superficiais das matrizes mesoporosas são modificadas e as possíveis interações polares entre as drogas e as matrizes de óxido de ferro podem ser significativamente reduzidas.

5.1.5. Diâmetro hidrodinâmico médio das partículas - Espectroscopia de espalhamento dinâmico da luz

O método de síntese proposto permitiu a obtenção de um sistema monodisperso (PDI = 0,23), no qual foi determinado um tamanho médio de 78,34 ± 1,83 nm (Figura 10). As amostras silanizadas revelaram um ligeiro aumento de tamanho, atingindo 86,32 ± 2,0 nm.

Figura 10- Análise do diâmetro hidrodinâmico médio dos MIONs.



Fonte: O autor.

5.1.6. Avaliação do potencial zeta

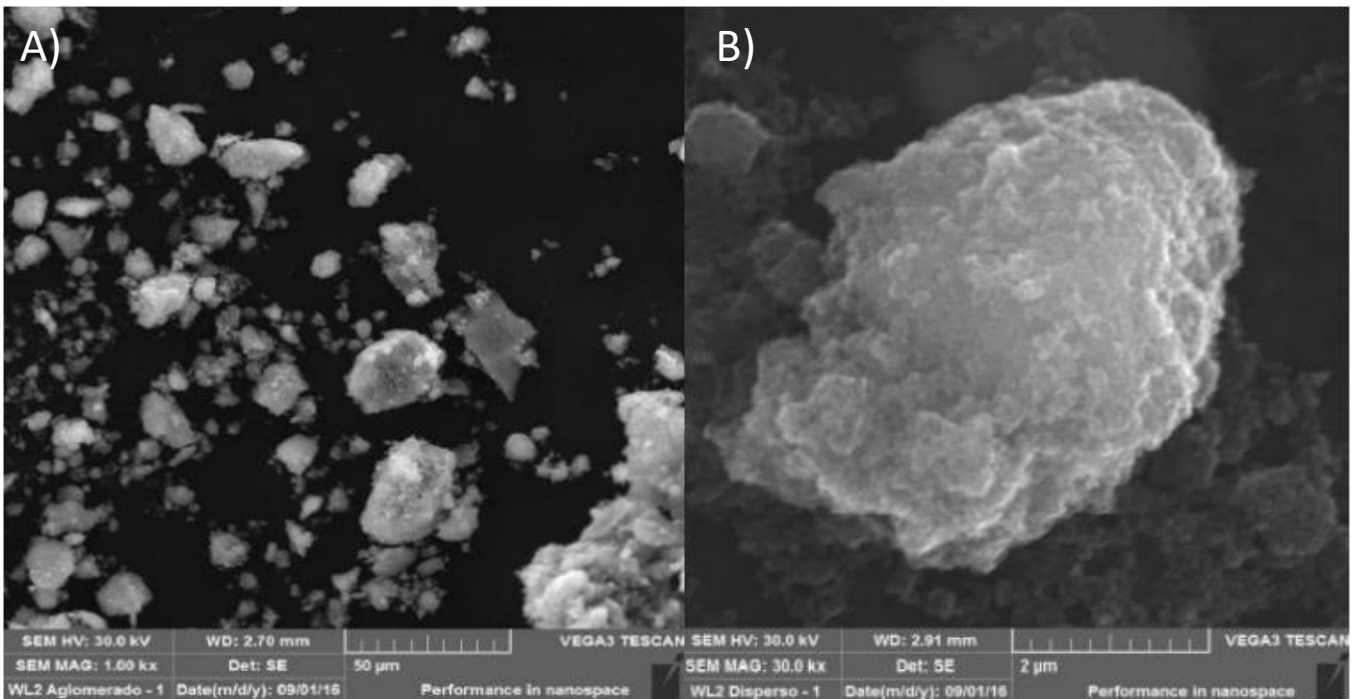
O potencial zeta das amostras MIONs foi determinado em $-18,45 \pm 1,89$ mV. No entanto, as amostras MIONs@APTES revelaram um aumento significativo, exibindo valores positivos que chegaram a $+5,76 \pm 0,65$ mV. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de grupos amino-terminais, que foram adicionados superficialmente à superfície das nanopartículas, por meio do processo de funcionalização.

Ferreira (2009) conseguiu comprovar que a funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro com APTES promove uma melhor estabilidade, através de repulsão eletrostática que pode evitar o fenômeno de agregação das nanopartículas suspensas em água, o que é importante para aplicação deste material *in-vivo*, uma vez que requerem aplicações em pH próximo de 7.

5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 11 apresenta as imagens de MIONs obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura. Na micrografia (A) é possível observar que o material sofre tendência de aglomeração sendo constituído de tamanhos e formas variadas. Na Imagem (B) é possível verificar um aglomerado de nanopartículas, observamos que eles não possuem geometria definida e suas superfícies são irregulares. Os aglomerados apresentam tamanho de poucos micrômetros e não são suficientes para determinar o tamanho das partículas.

Figura 11 – Imagens coletadas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de MIONs, imagem da A com menor aumento que B.

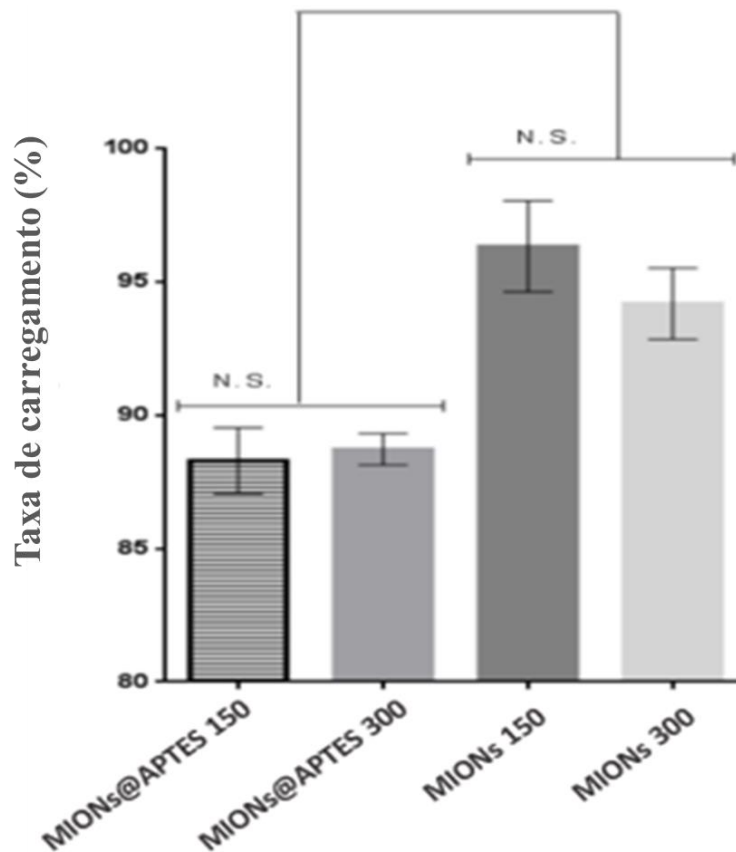


Fonte: O autor.

5.3. Taxa de incorporação e estudo cinético de liberação *in vitro*

O estudo de incorporação foi conduzido em nanopartículas MIONs e MIONs@APTES (50 mg.mL^{-1}). As amostras foram incubadas e agitadas (190 RPM) com diferentes soluções de ciprofloxacina (150 µg.mL^{-1} e 300 µg.mL^{-1}). A técnica de HPLC foi empregada para determinar quantitativamente a quantidade de droga carregada nas nanopartículas. Os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 12, e os dados revelaram uma taxa de incorporação relevante do fármaco para ambas as matrizes testadas, atingindo valores de $95,45 \pm 4,17\%$ para a matriz MIONs e $88,23 \pm 3,87\%$ para as amostras MIONs@APTES.

Figura 12– Taxa de incorporação de soluções com concentrações de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ciprofloxacina em amostras de MIONs e MIONs@APTES. NS = diferenças estatísticas não significativas; (*) diferença estatística ao nível de $p < 0,5$.



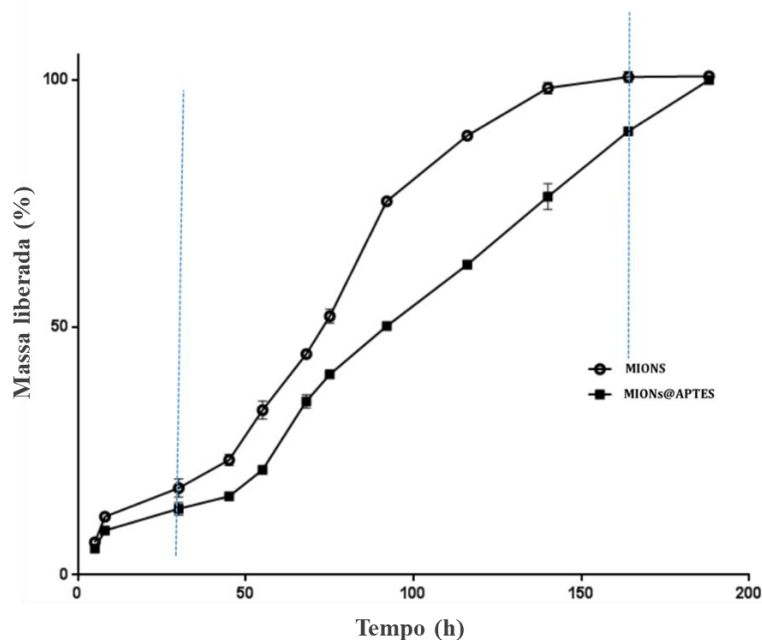
Fonte: O autor.

Como esperado, a matriz não funcionalizada (MIONs) apresentou a maior taxa de incorporação do fármaco, atingindo aproximadamente 97%, quando incubada com ciprofloxacina a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A mesma matriz incubada com ciprofloxacina a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ revelou taxas de incorporação semelhantes e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p > 0,5$). Por outro lado, a matriz silanizada (MIONs@APTES) revelou importante redução na taxa de incorporação do fármaco, chegando a $88,34 \pm 7,43\%$ (ciprofloxacina a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Novamente, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando a mesma matriz foi incubada com uma solução de ciprofloxacina a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p > 0,05$). Comparando os valores encontrados para matrizes silanizadas e não silanizadas, foram calculadas diferenças estatísticas significativas ao nível de $p < 0,5$ (*).

Esse comportamento pode ser atribuído à redução da área superficial (em torno de 28%) dada pelo processo de silanização, que está de acordo com as curvas isotérmicas obtidas. Os grupos APTES podem interagir entre eles ou com a superfície dos MIONs por meio de ligações de hidrogênio, promovendo a formação de uma rede organo-siloxana capaz de ocluir parcialmente o sistema poroso, portanto não acessível nem mesmo a pequenas moléculas.

Para o estudo da cinética de liberação *in vitro*, a técnica de HPLC foi empregada com o objetivo de determinar as quantidades de ciprofloxacina liberadas no meio SBF, a partir das matrizes MIONs ($150\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e MIONs@APTES ($150\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após 4, 8, 30, 45, 55, 68, 75, 92, 116, 140, 164 e 188 h (7,8 dias), amostras de 100 μl do sobrenadante foram coletadas, sem reposição do volume coletado, e analisadas por HPLC. A massa liberada de ciprofloxacina (%) foi plotada em função do tempo e os resultados estão disponíveis na Figura 13. Os dados obtidos revelaram que ambos os sistemas permitiram uma liberação controlada do fármaco, com comportamento cinético distinto em que a matriz de MIONs@APTES apresentou um ritmo lento em relação à matriz não silanizada. Até 8 h, ambos os sistemas revelaram comportamento de liberação semelhante, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em um nível de $p > 0,5$. Porém, entre 30 e 160 h, notou-se diferença significativa entre as matrizes, em que o fármaco foi liberado lentamente da matriz MIONs@APTES ($p < 0,5$).

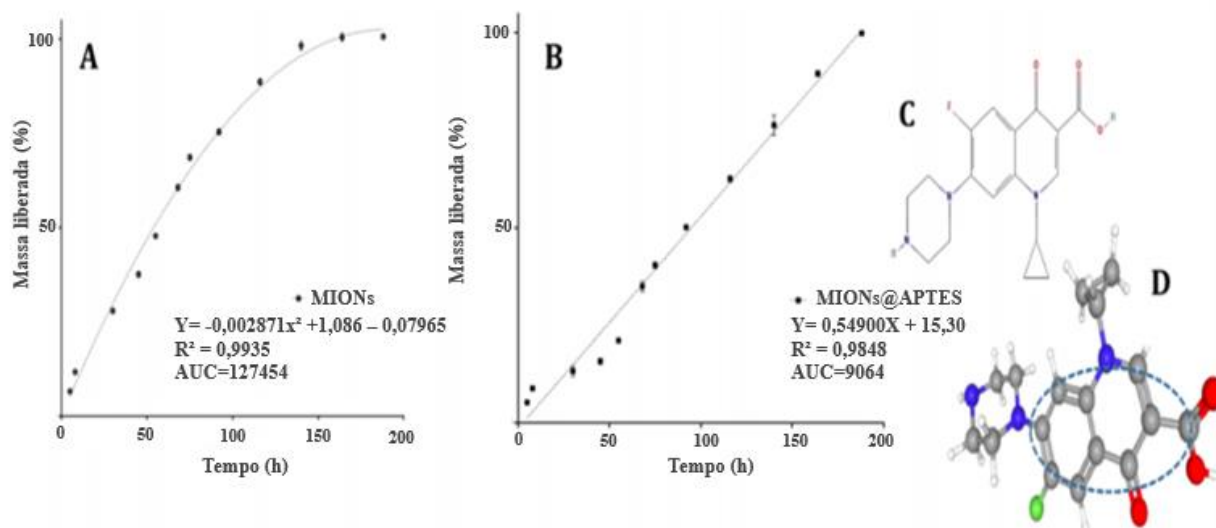
Figura 13– Perfil de liberação de ciprofloxacina das matrizes MIONs e MIONs@APTES após 166 h. Diferenças significativas entre as curvas podem ser observadas na área entre as linhas pontilhadas no nível de pelo menos $p < 0,5$.



Fonte: O autor.

Análises matemáticas individuais da cinética de liberação de ciprofloxacina das matrizes MIONs@APTES e MIONs estão disponíveis na Figura 14, respectivamente. Os resultados revelaram que uma matriz MIONs@APTES, forneceu um comportamento de liberação de ciprofloxacina que segue uma cinética de primeira ordem ($R^2=0,9848$). Por outro lado, os da matriz de MIONs revelou um comportamento diferente onde uma ciprofloxacina foi liberada seguindo uma ordem de 2° cinética ($R^2 = 0,9935$).

Figura 14 – Análises matemáticas do comportamento de liberação individual de ciprofloxacina a partir das matrizes MIONs @APTES (A) e MIONs (B); (C) estrutura molecular 2D da ciprofloxacina; (D) Uma estrutura 3D onde a região dos anéis de seis membros (linha pontilhada) representa a região não polar na qual as interações de Van der Waals podem ser estabelecidas com cadeias alquil dos APTES. Adaptado do banco de dados PubChem. Ciprofloxacina, CID = 2764, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacina>.



Fonte: O autor.

A partir de uma modalidade de liberação Fickiana pura, o termo "n" na equação foi definido como 0,43 assumindo que as amostras têm natureza esférica. Assim, as constantes cinéticas K1 para as matrizes MIONs@APTES e MIONs foram calculadas, e os resultados estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 - Constantes cinéticas K1 e R2 para matrizes MIONs @ APTES e MIONs

Amostra	Constante cinética (K ₁)	R ²
MIONs@APTES	6,9 x 10 ⁻²	0,9948
MIONs	8,2 x 10 ⁻²	0,9935

Fonte: O autor.

A ciprofloxacina carregada na matriz MION@APTES (CIPRO-MIONs@APTES) exibiu um comportamento cinético de liberação distinto em contraste com as nanopartículas MIONs. Esse sistema foi capaz de liberar o fármaco que seguiu uma cinética mais lenta,

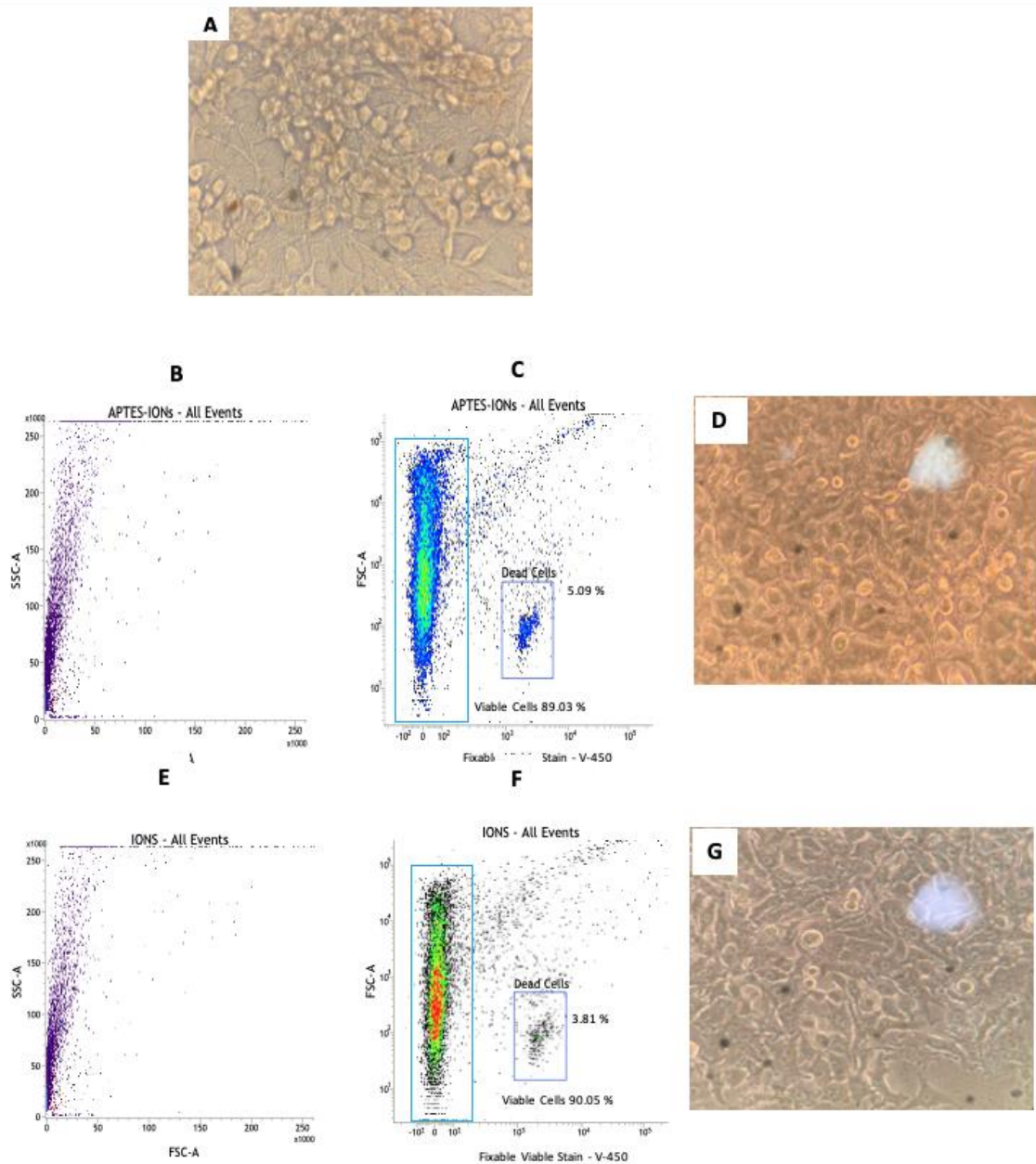
fechando o ciclo de liberação em torno de oito dias. Por outro lado, o sistema não silanizado revelou capacidade de liberação do fármaco mais rapidamente, em contraste com o sistema silanizado, atingindo 100% de liberação do fármaco em torno de seis dias.

A introdução de diferentes grupos orgânicos na matriz de nanopartículas de sílica pode controlar muitas propriedades superficiais, como hidrofobicidade, capacidade de adsorção de estabilidade térmica, capacidade de troca iônica e interações de superfície hospedeiro-hóspede. Neste estudo, a presença de moléculas de APTES pode justificar o comportamento observado, visto que poderiam permitir o estabelecimento de interações químicas adicionais a partir dos fenômenos de ancoragem em relação à matriz não silanizada. De acordo com a Figura 14 itens C e D, a ciprofloxacina possui uma região central, caracterizada por uma área plana apolar, localizada entre os anéis de seis membros. Nesta região, algumas interações de Van der Waals podem ter ocorrido entre as cadeias alquílicas das moléculas de APTES e o fármaco. Esta hipótese integraria uma possível elucidação para a lenta taxa de liberação cineticamente observada neste estudo.

5.4. Avaliação de biocompatibilidade *in vitro*

Células HEK-293, linhagem de fibroblastos humanos saudáveis, foram utilizadas neste trabalho com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade *in vitro* dos sistemas preparados. Nesse sentido, foi avaliado o perfil de citotoxicidade das amostras CIPRO-MIONs@APTES e CIPRO-MIONs, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 15. Na micrografia 16A (amplificação de 900 X), estão disponíveis os resultados do tratamento de células HEK-293 com solução estéril de NaCl 0,9% (tomado como controle negativo). A imagem revelou uma população densa e confluenta de células saudáveis, apresentando um perfil de crescimento semelhante a seixo bem aderente, forma fusiforme longa, quantidades reduzidas de grânulos citoplasmáticos e limites celulares claros. Por outro lado, na Fig. 15B e C, estão disponíveis painéis de citometria de fluxo de células tratadas com amostras CIPRO-MIONs@APTES a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (correspondendo a 1,06 μg de ciprofloxacina). Os dados revelaram um número significativo de células com tamanho e complexidade interna semelhantes (Figura 15B) e duas populações diferentes, constituídas por células mortas (5,09%) e células viáveis (89,03%) (Figura 15C). Na Figura 15D está disponível a micrografia (amplificação de 900 X) de células que receberam o mesmo tratamento descrito. É possível observar que as células tratadas apresentam características semelhantes às do grupo controle negativo, onde não foram identificadas diferenças morfológicas significativas.

Figura 15 – Avaliação da biocompatibilidade in vitro em células HEK-293 tratadas com amostras constituídas por CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES. (A) Micrografia de células HEK-293 tratadas com solução de NaCl 0,9% como controle negativo. (B), (C) e (D) representam os resultados de células tratadas por 48 h com CIPRO-MIONs@APTES a 200ug. mL⁻¹ (correspondendo a 0,98 µg de ciprofloxacina). (E), (F) e (G) representam os resultados de células tratadas por 48h com amostras CIPRO-MIONs, a 200 µg mL⁻¹ (correspondendo a 1,06µg de ciprofloxacina). Micrografia com amplificação de 900 X.



Fonte: O autor.

Os painéis de citometria de fluxo para as células tratadas com CIPRO-MIONs, a 400 µg mL⁻¹ (correspondendo a 1,14 µg de ciprofloxacina) estão disponíveis na Figura 15E e F. Os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados nas células tratadas com nanopartículas silanizadas, revelando uma população de células viáveis de 90,05%. Além disso,

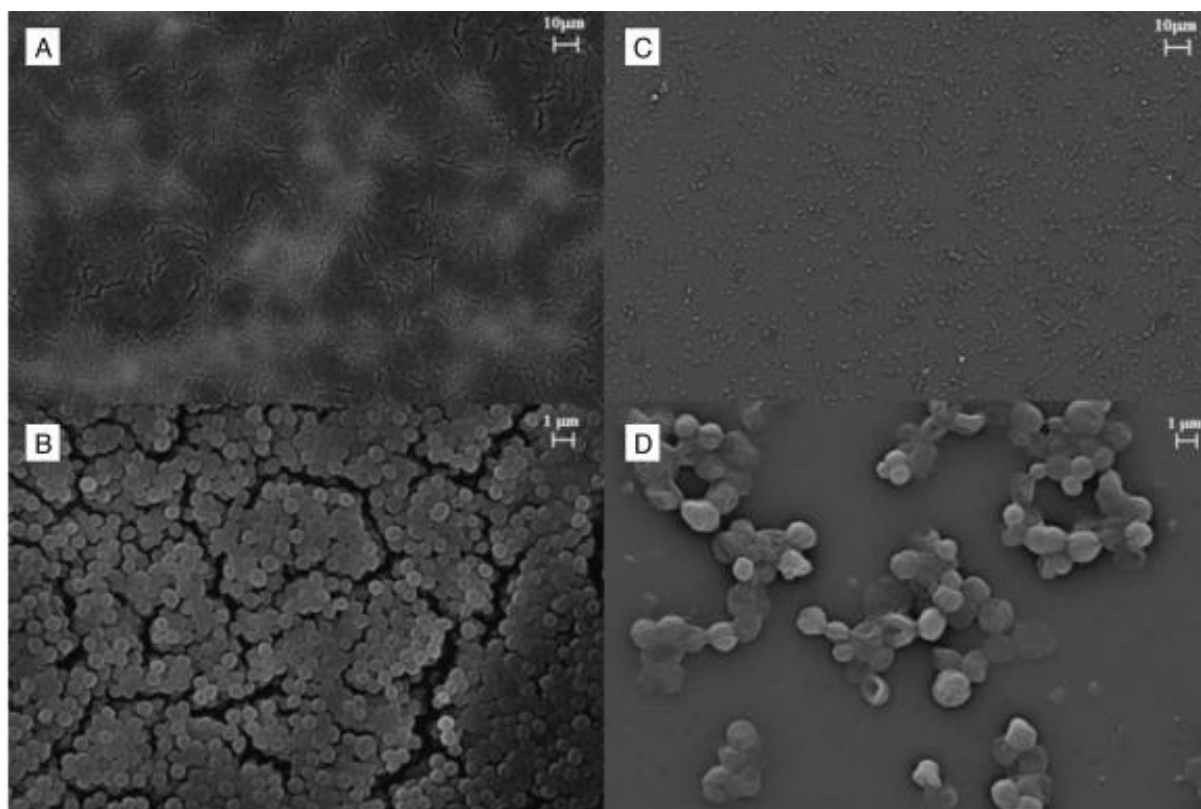
a imagem localizada na Figura 15G (amplificação de 900 X) revelou características morfológicas das células HEK-293, concordantes com um perfil de alta biocompatibilidade.

Resultados biocompatíveis semelhantes foram encontrados por Sibov *et al.* (2012) quando as células-tronco mesenquimais (MSCs) foram tratadas com nanopartículas de óxido de ferro (IONs) a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores investigaram a capacidade de proliferação das células quando expostas a diferentes concentrações de MIONs. Os resultados revelaram que as nanopartículas não interferem na atividade normal de proliferação das CTMs quando comparadas aos controles não tratados. Mais recentemente, Silva *et al.* (2016) avaliaram a biocompatibilidade de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em MSCs. Com o objetivo de verificar a influência dos MIONs funcionalizados sobre as taxas de proliferação das células, os autores avaliaram o perfil de citotoxicidade. Os resultados também revelaram um perfil biocompatível relevante do sistema sobre as células estudadas. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os estudos previamente citados disponíveis na literatura, mesmo carregados com uma quantidade relevante de ciprofloxacina, as nanopartículas não apresentam uma atividade citotóxica importante sobre as células HEK-293, revelando um perfil biocompatível. No entanto, a continuidade dos estudos, considerando outras linhagens celulares humanas normais, bem como os estudos *in vivo* devem integrar futuras investigações visando obter um perfil biocompatível detalhado do sistema proposto.

5.5. Avaliação da atividade dos CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs @ APTES sobre a formação do biofilme

A atividade antimicrobiana das matrizes CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs @ APTES foi avaliada através do método de formação de biofilme, no qual a técnica de MEV foi empregada para estudar a formação de biofilme. Os controles foram constituídos por *S. aureus* não tratado e ciprofloxacina livre. Os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 16, que são imagens obtidas por um MEV identificadas por (A) e (B) *S. aureus* não tratado, em que é possível identificar um agregado saudável de blastosporos que estão cobrindo toda a área da superfície do substrato e exibindo matriz extracelular leve (ampliação de 1000X e 10.000X, respectivamente); (C) e (D) *S. aureus* tratado com ciprofloxacina livre a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ampliação de 1000 X e 10.000 X, respectivamente). Na imagem é possível observar a redução de células no substrato e uma diminuição da matriz extracelular, evidenciando a atividade antibiofilme do fármaco livre na concentração empregada.

Figura 16 - Imagens MEV de biofilmes de *S. aureus* caracterizadas por diferentes grupos: (A) e (B) células não tratadas (ampliação de 1000 X e 10.000 X, respectivamente) tomadas como controle negativo, (C) e (D) *S aureus* tratadas com ciprofloxacina livre a 300 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (ampliação de 1000 X e 10.000 X, respectivamente).

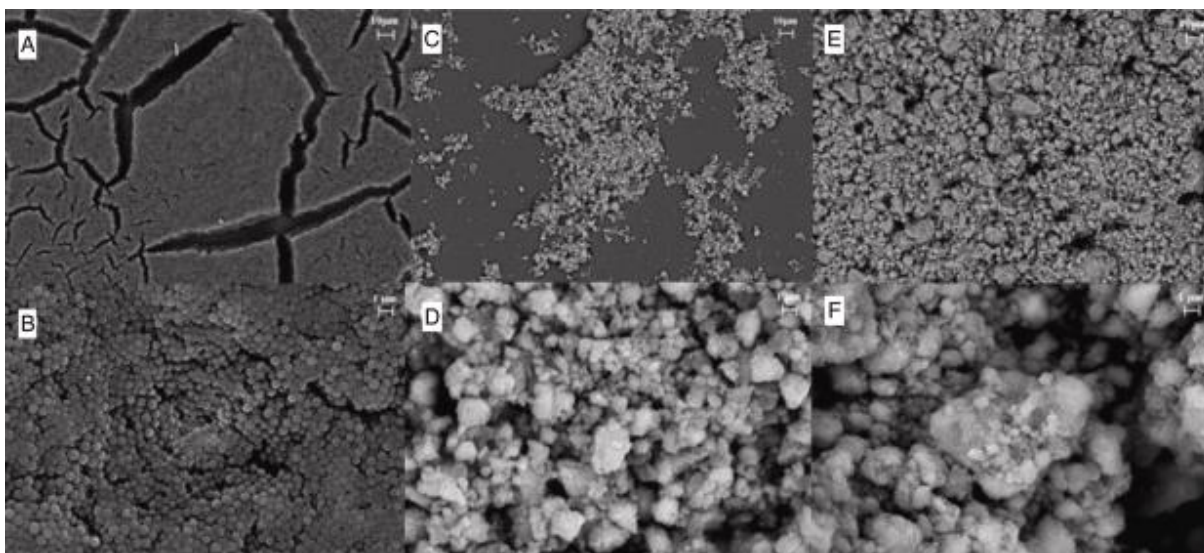


Fonte: O autor.

Na Figura 17 estão disponíveis os resultados obtidos para *S aureus*, tratado com os nanossistemas. Nas imagens (A) e (B) estão disponíveis imagens MEV de *S. aureus* tratado com 50 mg mL^{-1} de MIONs@APTES (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente). A partir da concentração empregada, os dados obtidos revelaram que a presença das nanopartículas fabricadas, MIONs (50 mg.mL^{-1}) e MIONs@APTES, não alteram a formação do biofilme, apresentando propriedades antibiofilme desprezíveis. Por outro lado, quando cepas de bactérias foram tratadas com nanopartículas carregadas com ciprofloxacina, um cenário diferente foi observado. As imagens MEV dos grupos tratados com amostras CIPRO-MIONs@APTES, a 50 mg.mL^{-1} (143,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ciprofloxacina) estão disponíveis na Figura 17 (C) e (D) (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente) Os dados obtidos revelaram células dispersas e perda completa da arquitetura do biofilme, formando agregados densos de nanopartículas, sem presença significativa de células bacterianas. Um padrão semelhante também pode ser observado nas Figura 17 (E) e (F), onde as células de *S aureus* foram tratadas com 50 mg.mL^{-1} de CIPRO-MIONs@APTES (132,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de

ciprofloxacina) (ampliação de 1.000 e 10.000 X, respectivamente). As imagens de MEV revelaram agregados de nanopartículas sem estrutura de biofilme.

Figura 17 – Imagens de MEV de biofilmes de *S. aureus* caracterizadas por diferentes grupos: (A) e (B) *S. aureus* tratados com MIONS@APTES a 50 mg.mL⁻¹, tomados como controle (aumento de 1000 e 10.000 X, respectivamente). (C) e (D) CIPRO-MIONS a 50 mg.mL⁻¹ (143,18 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacina) (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente). Células (E) e (F) *S. aureus* tratadas com CIPRO-MIONS @ APTES a 50 mg.mL⁻¹ (132,50 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacina) (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente).



Fonte: O autor.

Pelos dados obtidos, o papel antibiofilme da ciprofloxacina pôde ser confirmado, uma vez que todos os grupos tratados com o composto ciprofloxacina não apresentam crescimento importante do biofilme quando comparados aos controles. Por outro lado, embora as concentrações de ciprofloxacina empregada via nanopartículas tenham sido significativamente menores (143,18 µg.mL⁻¹ e 132,50 µg.mL⁻¹) em comparação com o grupo de ciprofloxacina livre (300µg.mL⁻¹), as imagens MEV demonstram uma atividade antibiofilme superior nos grupos tratados com a ciprofloxacina inserida na matriz de nanopartículas. Esse mesmo comportamento também foi observado em trabalhos publicados anteriormente utilizando outros nanossistemas. Por exemplo, Kashef *et al.* (2020) avaliou o efeito da ciprofloxacina carregada em niossomas na inibição de *S. aureus* na formação de biofilme. Os autores confirmaram por MEV uma redução significativa no biofilme formado pelos niossomas carregados (ciprofloxacina a 128ug.mL⁻¹). No presente trabalho, ciprofloxacina carregada em nanopartículas mesoporosas de ferro revelou comportamento semelhante, revelando propriedades antibiofilme quando uma concentração semelhante foi usada (CIPRO-MIONS@APTES a 132,50 µg.mL⁻¹).

Muitas estratégias têm sido desenvolvidas por grupos de pesquisa em diferentes países do mundo, aplicando nanopartículas de óxido de ferro e conjugados contra microrganismos. Por exemplo, Grumezescu *et al.*, 2014, relatam a síntese e caracterização de nanoestruturas de magnetita funcionalizadas com amoxicilina contra *S. aureus*. O material obtido revelou um perfil biocompatível relevante e potente efeito antimicrobiano. Mais recentemente, Olar *et al.* (2020) preparou um sistema *core-shell* baseado em óxido de ferro, funcionalizado com um derivado tiolato. O sistema híbrido obtido apresentou ação relevante contra biofilmes de *Candida albicans*. Li *et al.* (2018) e Li *et al.* (2020) avaliaram as atividades antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas mesoporosas ocas de Fe₃O₄, na presença de um campo magnético alternado.

A capacidade antimicrobiana e antibiofilme das nanopartículas de ferro já foi amplamente demonstrada em diversos trabalhos publicados anteriormente, nos quais existe um consenso do envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte bacteriana, através de danos à membrana celular e internalização das nanopartículas. No entanto, como as nanopartículas de óxido de ferro causam danos na membrana bacteriana e se tornam internalizadas são questões que ainda devem ser respondidas. Nesse sentido, o presente trabalho confirma as propriedades antibiofilme das amostras CIPRO-MIONs e de CIPRO-MIONs@APTES. De nosso conhecimento, o presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, a atividade antibiofilme da ciprofloxacina carregada em MIONs. Porém, outros testes detalhados certamente ampliarão a compreensão a respeito da atividade antibiótica das nanopartículas produzidas.

6. CONCLUSÃO

O conjunto de procedimentos experimentais conduzidos neste trabalho permitiu a obtenção de dois diferentes sistemas caracterizados por partículas que em meio aquoso apresentam distribuição de tamanhos nanométricos, baixo índice de dispersão e alta área superficial constituída por uma matriz mesoporosa. Este trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) e sua matriz silanizada (MIONs@APTES), ainda pouco explorada em aplicações biomédicas, em incorporar quantidades significativas do antibiótico ciprofloxacina. Os resultados encontrados revelaram que as amostras CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES reuniram um conjunto de características que incluem uma significativa taxa de incorporação de ciprofloxacina, associada a um perfil de liberação lenta. Mesmo em altas concentrações ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as nanopartículas produzidas não revelam um perfil citotóxico importante para células humanas normais). Os dados obtidos nos testes antibiofilme revelaram que a presença de MIONs e MIONs@APTES não alteram a formação do biofilme, apresentando propriedades antibiofilme desprezíveis. Por outro lado, embora as concentrações de ciprofloxacina empregada via nanopartículas tenham sido significativamente menores ($143,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $132,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em comparação com o grupo de ciprofloxacina livre ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as imagens MEV demonstram uma atividade antibiofilme superior nos grupos tratados com a ciprofloxacina quando inserida na matriz de nanopartículas. Outros testes com diferentes cepas bacterianas, investigações pré-clínicas e avaliações toxicológicas devem integrar outros experimentos com o objetivo de ampliar a compreensão da atividade antibiótica das nanopartículas produzidas. Nesse sentido, os resultados apresentados sugerem que os nanossistemas produzidos podem ser considerados um sistema potencial a ser aplicado no tratamento de infecções bacterianas.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, Happy et al. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 60-70, 2018. ALI, Attarad et al. Síntese, caracterização, aplicações e desafios de nanopartículas de óxido de ferro. **Nanotecnologia, ciência e aplicações**, v. 9, p. 49, 2016.

AL-SHABIB, Nasser A. et al. Low temperature synthesis of superparamagnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles and their ROS mediated inhibition of biofilm formed by food-associated bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2567, 2018.

ANDRADE, Gracielle Ferreira et al. Mesoporous silica SBA-16/hydroxyapatite-based composite for ciprofloxacin delivery to bacterial bone infection. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 85, n. 2, p. 369-381, 2018.

ANDRADE, Raquel GD; VELOSO, Sérgio RS; CASTANHEIRA, Elisabete. Shape anisotropic iron oxide-based magnetic nanoparticles: Synthesis and biomedical applications. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2455, 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.

AUFORT, Julie et al. Macroscopic electrostatic effects in ATR-FTIR spectra of modern and archeological bones. **American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials**, v. 103, n. 2, p. 326-329, 2018.

AZIZI-LALABADI, Maryam et al. Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

BAND, Victor I. et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. **Nature microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1627-1635, 2019.

BEYTH, Nurit et al. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, 2015.

BRUNAUER, Stephen. **The Adsorption of Gases and Vapors: Texte Imprimé**. Princeton University Press, 1943.

CALLISTER JUNIOR, William D.; RETHWISCH, David G. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. **Rio de Janeiro: LTC**, v. 589, p. 249, 2002.

CANAPARO, Roberto et al. Recent developments in antibacterial therapy: Focus on stimuli-responsive drug-delivery systems and therapeutic nanoparticles. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1991, 2019.

CAO, Binrui; QIU, Penghe; MAO, Chuanbin. Mesoporous iron oxide nanoparticles prepared by polyacrylic acid etching and their application in gene delivery to mesenchymal stem cells. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 9, p. 936-941, 2013.

CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CAUDA, Valentina; CANAVESE, Giancarlo. Mesoporous materials for drug delivery and theranostics. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1108, 2020.

CHANCEY, Scott T.; ZÄHNER, Dorothea; STEPHENS, David S. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 959-978, 2012.

CHEN, Sheng et al. Facile microemulsion synthesis of mesoporous ZnMn₂O₄ submicrocubes as high-rate and long-life anodes for lithium ion batteries. **Ceramics International**, v. 45, n. 5, p. 5594-5600, 2019.

COELHO, Thalia Camila et al. Desenvolvimento de fluídos e filmes magnéticos a partir de óxidos de ferro para aplicações biomédicas. 2011.

CONLON, Brian P. et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. **Nature microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1-7, 2016.

COSTA, Alessandro Mariano; SILVA, Viviane Viana. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2017.

DE SOUZA, Luana Miranda; DA SILVA PORTO, Paulo Sérgio; MUNIZ, Eduardo Perini. A utilização da síntese verde na produção de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: uma análise bibliométrica. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 1, p. 1081518, 2018.

DENARI, Gabriela Bueno; CAVALHEIRO, E. T. G. Princípios e aplicações de análise térmica. **São Carlos: IQSC**, 2012.

DEOL, Parampal; KHULLER, G. K.; JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against Mycobacterium tuberculosis infection induced in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1211-1214, 1997.

DEVARAJ, Aishwarya et al. Produção aprimorada de biofilme e matriz extracelular por transporte crônico versus isolados agudos de Salmonella Typhi. **Patógenos PLoS**, v. 17, n. 1, p. e1009209, 2021.

DI FILIPPO, Leonardo Delello. Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no tratamento de glioblastoma multiforme. 2021.

DJURIŠIĆ, Aleksandra B. et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. **Small**, v. 11, n. 1, p. 26-44, 2015.

UNAL, B. et al. Synthesis, structural and conductivity characterization of alginic acid-Fe₃O₄ nanocomposite. **Journal of nanoparticle research**, v. 12, n. 8, p. 3039-3048, 2010.

ESLAMI, Hadi et al. Synthesis of mesoporous Fe-Mn bimetal oxide nanocomposite by aeration co-precipitation method: Physicochemical, structural, and optical properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 224, p. 65-72, 2019.

FERREIRA, Roberta Viana. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita. 2009.

RICHARD, P. Feynman. There's Plenty of Room at the Bottom. In: **Annual Meeting of the American Physical Society, (1959), December 29**. 1959.

FISHER, Robert A.; GOLLAN, Bridget; HELAINE, Sophie. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453-464, 2017.

GABRIELIAN, Lilit et al. Comparable antibacterial effects and action mechanisms of silver and iron oxide nanoparticles on Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

GALEOTTI, et al. A controlled approach to iron oxide nanoparticles functionalization for magnetic polymer brushes. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 360, n. 2, p.540-547, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.076>.

GIESE, Ellen Cristine. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro. 2018.

GOLDSTEIN, Joseph I. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. Springer, 2017.

GOMES, Henrique Miller Andrade et al. Aplicação das técnicas de processamento digital de imagens na caracterização de carvão ativado da biomassa do coco babaçu. 2019.

GOSCIANSKA, Joanna; OLEJNIK, Anna; NOWAK, Izabela. APTES-functionalized mesoporous silica as a vehicle for antipyrine–adsorption and release studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 533, p. 187-196, 2017.

GRUMEZESCU, Alexandru Mihai et al. Biocompatible Fe₃O₄ increases the efficacy of amoxicillin delivery against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5013-5027, 2014.

HIRATSUKA, Renato Satoshi; SANTILLI, Celso Valentim; PULCINELLI, Sandra Helena. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química nova**, p. 171-180, 1995.

HSUEH, Yi-Huang et al. Antimicrobial effects of zero-valent iron nanoparticles on gram-positive Bacillus strains and gram-negative Escherichia coli strains. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2017.

HUSSAIN, Sazid et al. Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy. **Nature biomedical engineering**, v. 2, n. 2, p. 95-103, 2018.

IONASHIRO, Massao; GIOLITO, Ivo. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

JÚNIOR, Dilceu Silveira Tolentino et al. Revisão sobre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicada à análise toxicológica de alimentos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e47910515419-e47910515419, 2021.

KALHAPURE, Rahul S. et al. Enhancing targeted antibiotic therapy via pH responsive solid lipid nanoparticles from an acid cleavable lipid. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 6, p. 2067-2077, 2017.

KASHEF, Mona T. et al. The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming staphylococcus aureus. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1619, 2020.

KOO, Hyun et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740, 2017.

KUMAR, Ayush; SCHWEIZER, Herbert P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

LAWRENCE, Geoffrey et al. Quick high-temperature hydrothermal synthesis of mesoporous materials with 3D cubic structure for the adsorption of lysozyme. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 024806, 2015.

LEÃO, Nádia Miriceia et al. Mesoporous silica nanoparticles loaded with alamandine as a potential new therapy against cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102216, 2021.

LI, Wenqin et al. The antibacterial and antibiofilm activities of mesoporous hollow Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating magnetic field. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 16, p. 4492-4507, 2020.

LI, Yunqiao et al. The detailed bactericidal process of ferric oxide nanoparticles on E. coli. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 606, 2018.

LIU, Yue et al. Kinetics of (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15275-15282, 2013.

LOWELL, Seymour; SHIELDS, Joan E. **Powder surface area and porosity**. Springer Science & Business Media, 1991.

LUO, Ying et al. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms. 2021.

MACHADO, Derik Tilly. **Síntese e caracterização de nanopartículas de carbeto metálicos (Fe, Co, Ni, Mo, W) e seus materiais híbridos com óxido de grafeno reduzido via decomposição térmica mediada por oleilamina**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MACHADO, Thamiris Santana et al. Virulence factors found in nasal colonization and infection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates and their ability to form a biofilm. **Toxins**, v. 13, n. 1, p. 14, 2021.

MEGHANA, Surapaneni et al. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. **RSC advances**, v. 5, n. 16, p. 12293-12299, 2015.

MEHMOOD, Yasir et al. Facile synthesis of mesoporous silica nanoparticles using modified solgel method: Optimization and In Vitro cytotoxicity studies. **Pak. J. Pharm. Sci**, v. 32, n. 4, p. 1805-1812, 2019.

MOELLERING JR, Robert C. MRSA: the first half century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 4-11, 2012.

MOHAMED, Marwah M. et al. Antibacterial effect of gold nanoparticles against Corynebacterium pseudotuberculosis. **International Journal of veterinary science and medicine**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 2017.

MOREIRA, José Ranclenison Lopes. A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama. 2014.

MUTUMA, Bridget K. et al. Sol-gel synthesis of mesoporous anatase-brookite and anatase-brookite-rutile TiO₂ nanoparticles and their photocatalytic properties. **Journal of colloid and interface science**, v. 442, p. 1-7, 2015.

NAGHILOO, M. et al. Functionalization of SBA-16 silica particles for ibuprofen delivery. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 74, n. 2, p. 537-543, 2015.

NASKAR, Atanu et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of Ag incorporated ZnO-graphene nanocomposites. **RSC advances**, v. 6, n. 91, p. 88751-88761, 2016.

NASKAR, Atanu et al. A new nano-platform of erythromycin combined with Ag nano-particle ZnO nano-structure against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 841, 2020.

NUNES, Eloiza da Silva. Preparação e caracterização de nanocompósitos de Fe@ SiO₂, Fe@ Fe₃O₄ e Fe₃O₄@. PNIPAM. 2015.

OLAR, Rodica et al. Anti-biofilm Fe₃O₄@ C18-[1, 3, 4] thiadiazolo [3, 2-a] pyrimidin-4-ium-2-thiolate Derivative Core-shell Nanocoatings. **Materials**, v. 13, n. 20, p. 4640, 2020.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

PHILIP, Sherin; KURIAKOSE, Sunny. Studies on the antibacterial activity of water-soluble iron oxide nanoparticle-β-cyclodextrin aggregates against selected human pathogenic bacteria. **Nanostructures & Nano-Objects**, v. 16, p. 347-353, 2018.

PHUL, Ruby et al. One pot synthesis and surface modification of mesoporous iron oxide nanoparticles. **Nanostructures & Nano-Objects**, v. 19, p. 100343, 2019.

QINDEEL, Maimoona et al. Nanomaterials for the diagnosis and treatment of urinary tract infections. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 546, 2021.

RAMO, Luciano Bernardo et al. Avaliação da performance fotocatalítica do óxido modificado SrZrxSn1-xO₃ quanto a degradação da microcistina-LR em águas de abastecimento. 2019.

REYGAERT, Wanda C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482, 2018.

ROST, Nathanne Cristina Vilela et al. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE SÍNTESE DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 872, 2017.

ROY, Ranita et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

RUDD, Kristina E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200-211, 2020.

SANTOS, Rita S. et al. Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 136, p. 28-48, 2018.

SATHYANARAYANAN, Madhu Bala et al. The effect of gold and iron-oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

SBALQUEIRO, Giovanni et al. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 242-252, 2018.

SIBOV, Tatiana Taís et al. Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cell labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with Poly-L-lysine. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 10, p. 180-188, 2012.

SIBOV, Tatiana Taís et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 5, p. 511-521, 2012.

SILVA, Luisa HA et al. Labeling mesenchymal cells with DMSA-coated gold and iron oxide nanoparticles: assessment of biocompatibility and potential applications. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2016.

SILVA, Suéllen Kelcya Gomes da et al. Efeito de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. 2018.

SING, Kenneth SW. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and applied chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SINGH, Gita; CHANDRA, Sudeshna. Desempenho eletroquímico de nanoferritas de MnFe₂O₄ sintetizadas pelo método de decomposição térmica. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 8, pág. 4058-4066, 2018.

SMITH, Hayden Z.; KENDALL, Brian. Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. **StatPearls [Internet]**, 2020.

SPRINGER, Matthew T. et al. Effect of clpP and clpC deletion on persister cell number in Staphylococcus aureus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 848-857, 2016.

SU, Yu-Lin et al. Targeted mesoporous iron oxide nanoparticles-encapsulated perfluorohexane and a hydrophobic drug for deep tumor penetration and therapy. **Theranostics**, v. 5, n. 11, p. 1233, 2015.

TANG, Shaoheng; ZHENG, Jie. Atividade antibacteriana de nanopartículas de prata: efeitos estruturais. **Materiais avançados de saúde**, v. 7, n. 13, pág. 1701503, 2018.

TAO, C. Atividade antimicrobiana e toxicidade de nanopartículas de ouro: progresso da pesquisa, desafios e perspectivas. **Cartas em microbiologia aplicada**, v. 67, n. 6, pág. 537-543, 2018.

TEIXEIRA, Alysson Ribeiro et al. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. 2019.

TEIXEIRA, Genisson Barbosa. Nanocarreador baseado em quitosana tiolada e nanopartícula de ouro como sistema de liberação controlada para o fármaco antineoplásico docetaxel. 2018.

THOMMES, Matthias et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and applied chemistry**, v. 87, n. 9-10, p. 1051-1069, 2015.

TORRES SANGIAO, Eva; HOLBAN, Alina Maria; GESTAL, Mónica Cartelle. Applications of nanodiamonds in the detection and therapy of infectious diseases. **Materials**, v. 12, n. 10, p. 1639, 2019.

TRAM, Nhan Dai Thien; EE, Pui Lai Rachel. Conjugado macromolecular e abordagens de transportadores biológicos para a distribuição direcionada de antibióticos. **Antibióticos**, v. 6, n. 3, pág. 14, 2017.

VARANDA, Laudemir C. et al. Nanomateriais de tamanho e forma controlados com base em poliol modificado e abordagens de decomposição térmica. Uma breve revisão. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

VAZQUEZ, Naiara I. et al. Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa por sol-gel como nanocontêiner para futuras aplicações de entrega de drogas. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**. 2017.

VAZ-RAMOS, Joana et al. Nanopartículas de sílica mesoporosa supercriticamente secas superparamagnéticas para teranósticos de câncer. **Ciência e Engenharia de Materiais: C**, v. 115, p. 111124, 2020.

VESTBY, Lene K. et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

VIEIRA, José Vitor de Aguiar. Nano partículas magnéticas recobertas com precursores organometálicos tipo siloxano como carreadores para fármacos: bioconjugados de clorambucila. 2014.

WANG, Chongwen et al. Vancomycin-modified Fe₃O₄@ SiO₂@ Ag microflowers as effective antimicrobial agents. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 3077, 2017.

WATT, Ian M. **The principles and practice of electron microscopy**. Cambridge University Press, 1997.

WESTMEIER, Dana et al. Nanoparticle binding attenuates the pathobiology of gastric cancer-associated *Helicobacter pylori*. **Nanoscale**, v. 10, n. 3, p. 1453-1463, 2018.

WOJNAROWICZ, Jacek; CHUDOBA, Tadeusz; LOJKOWSKI, Witold. A Review of Microwave Synthesis of Zinc Oxide Nanomaterials: Reactants, Process Parameters and Morphologies. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1086, 2020.

WONG, Ho Lun et al. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 503-517, 2010.

XIAO, Xuechun et al. The high efficient catalytic properties for thermal decomposition of ammonium perchlorate using mesoporous ZnCo₂O₄ rods synthesized by oxalate co-precipitation method. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

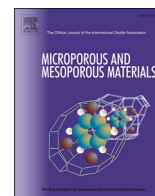
YUAN, Yu-Guo; PENG, Qiu-Ling; GURUNATHAN, Sangiliyandi. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 569, 2017.

ZHENG, Si-Di et al. CD-g-CS nanoparticles for enhanced antibiotic treatment of *Staphylococcus xylosum* infection. **Microbial Biotechnology**, 2021.

ZHENG, Yuanyuan et al. Fabrication of 2D NiO porous nanosheets with superior lithium storage performance via a facile thermal-decomposition method. **ACS Applied Energy Materials**, v. 2, n. 11, p. 8262-8273, 2019.

ZHU, Minjun et al. Construction of Fe₃O₄/vancomycin/PEG magnetic nanocarrier for highly efficient pathogen enrichment and gene sensing. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 23, p. 12873-12881, 2015.

ANEXO 1



Mesoporous iron oxide nanoparticles loaded with ciprofloxacin as a potential biocompatible antibacterial system

Wivyan Castro Lage^a, Daniela Sachs^b, Tainara Aparecida Nunes Ribeiro^b, Marli Luiza Tebaldi^a, Yanka dos Reis Soares de Moura^a, Stephanie Calazans Domingues^a, Daniel Cristian Ferreira Soares^{a,*}

^a Universidade Federal de Itajubá, Campus Itabira, Laboratório de Bioengenharia, Avenida Irma Ivone Drumond, 200, Itabira, Minas Gerais, 35.903-087, Brazil

^b Universidade Federal de Itajubá, Campus Itajubá, Lamicro- Laboratório de Análise Microbiológica, Avenida BPS, 1303, Itajubá, Minas Gerais, 37500-903, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Mesoporous iron oxide nanoparticles
Ciprofloxacin-loaded nanoparticles
Bacterial infections treatment
Antibiofilm activity

ABSTRACT

Nowadays, infectious diseases are still a great challenge for human health. Bacterial infections are one of the primary causes of worldwide mortality. Due to the development of resistance processes, the search for therapeutic alternatives has focused on many researchers of biomedical areas. In this sense, antimicrobial drugs' encapsulation has emerged as a relevant alternative, capable of improving the therapeutic effectiveness, while a significant reduction in the side effects can be observed. Following in this same direction, in the present work, mesoporous iron oxide nanoparticles (MIONs), loaded with ciprofloxacin, were prepared, aiming to evaluate the system's potential application against bacterial infections. MIONs and silanized MIONs (MIONs@APTES) were prepared, presenting an average size below 100 nm and a superficial area of 258.27 and 186.27 m² g⁻¹, respectively. Both samples allowed to load relevant amounts of the drug, reaching a high incorporation rate and a controlled release profile, with different kinetics behavior, when incubated with simulated body fluid (SBF). The in vitro evaluation revealed that fabricated systems display biocompatible profiles over normal human cell lineage, where no significant cytotoxic profile was observed. However, it presented relevant antibiofilm (*S aureus* strain) properties when compared to controls constituted by free ciprofloxacin and nanoparticles without the drug. From all Results obtained in this work, the produced nanosystems can be considered a potential system to be applied in bacterial infection treatment.

1. Introduction

Infectious diseases are still a great challenge for human health. Bacterial infections are one of the leading causes of worldwide mortality, and the use of antibiotics has been the primary method used in clinical practice, given the efficacy and cost-effectiveness outcomes obtained. However, due to the development of resistance processes, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the search for therapeutic alternatives has been the focus of many researchers of biomedical areas [1–3]. Another factor that Results in the resistance of these pathogens to antimicrobials agents is their ability to form a biofilm, which can be understood as a community of microorganisms, surrounded by an extracellular matrix of polysaccharides adhered to each other and over a surface [4,5]. Furthermore, Bacteria in biofilms can resist antimicrobials in concentrations greater than those used in the

same bacteria in the planktonic state [5,6].

In general, bacteria can develop resistance basically through four different mechanisms constituted by: (i) limiting the amount of a drug uptake; (ii) modifying the active site of the target, reducing the efficiency of a drug; (iii) inactivating a drug through specific enzymes produced by the microorganism and (iv) acting of the drug efflux from the bacteria cell. Gram-negative bacteria make use of all described mechanisms, while gram-positive bacteria, due to the absence of lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane, have limited actions over efflux mechanisms [7–10].

Only in the United States, annually, approximately 500.000 people are affected by bacterial infections, developing diseases related to pneumonia, endocarditis, skin and soft tissue infections (SSTI) and, bone and joint infections, constituting a public health problem. Thus, new approaches capable of acting selectively against these infections are an

* Corresponding author.

E-mail address: soares@unifei.edu.br (D.C. Ferreira Soares).

<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111127>

Received 8 March 2021; Received in revised form 6 April 2021; Accepted 22 April 2021

Available online 1 May 2021

1387-1811/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

emerging issue [11–13]. Among the ultimately proposed systems, metallic nanoparticles, such as gold (AUNPs) and silver nanoparticles (AgNPs), have integrated the new arsenal against many bacterial strains due to their broad-spectrum antibacterial activity [14–18]. Metal oxide nanosystems also have demonstrated relevant antibiotic actions, in which the oxide nanoparticles, based on zinc, copper, titanium, and iron can be highlighted [19–23]. The action mechanisms of these nanoparticles are still controversial, and some questions remain still unsolved. On the other hand, after being treated with nanoparticulated oxides, different bacteria strains share similar processes such as oxidative stress, lipid peroxidation, cell membrane damage, enzyme inhibition, and proteolysis processes [24].

The encapsulation of antimicrobial drugs is another approach that has emerged as a relevant alternative to combating MRSA, improving the therapeutic effectiveness, while a significant reduction in the side effects can be observed [25,26]. Liposomes have proposed as an innovative delivery system for antibacterial drugs some decades ago [27]. However, due to the intrinsic physical and chemical instability, other nanocarriers have been proposed in which, silica nanoparticles and hybrid systems based on iron oxide nanoparticles can be highlighted [28–31]. Following in the same direction, in the present work, mesoporous iron oxide nanoparticles, loaded with ciprofloxacin were prepared aiming to evaluate the potential application of the system against bacterial infections.

2. Experimental

2.1. Materials

Ammonium hydroxide (27%), Iron chloride hexahydrate and sodium sulfite (ACS grade), 3-aminopropyl-triethoxysilane (99%), ciprofloxacin (pharmaceutical standard), Simulated Body Fluid (SBF), Fetal Bovine Serum, Streptomycin and Dulbecco's modified Eagle culture medium (DMEM) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Acetonitrile (HPLC grade), ethanol (95% and 99%), tris-hydroxymethyl-aminomethane (99.9%), BHI-g (Brain Heart infusion) broth, and Phosphoric acid (85%) were purchased from Merck (São Paulo, Brazil), Ultrapure water, produced from a Smart2Pure 3 UV/UF (Thermo, São Paulo, Brazil), was used in all experiments. BD Horizon™ BD Horizon Fixable Viable Stain 450 reagent and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dye were purchased from BD (São Paulo, Brazil). All chemicals were used without further purification.

2.2. Synthesis and functionalization

Mesoporous iron oxide nanoparticles (MIONs) were synthesized based on the previous study conducted by Ferreira (2009), with some modifications [22]. Solutions constituted by HCl (0.5 M), FeCl₃ (2.67 M), and Na₂SO₃ (1.00 M) were prepared using ultrapure water, at room temperature. In the second step, 7.5 mL of the FeCl₃ solution was mixed with 5.0 mL of the Na₂SO₃ solution (room temperature). The obtained solution was stirred (800 rpm) for 20 min until obtaining a yellow-green color suspension. The nanoparticles were obtained after the slow addition of 40 mL of NH₄OH solution, by adding 10 mL h⁻¹. The obtained material was washed 8 times with ultra-pure water, reaching a neutral pH. Subsequently, the nanoparticles were functionalized with APTES (3-aminopropyl-triethoxysilane). In this procedure, 200 mg of synthesized MIONs were dispersed in 30.0 mL of toluene and 1.0 mL of APTES solution. The system was left under reflux for 24 h at 100 °C. The functionalized nanoparticles obtained (MIONs@APTES) were washed with ultra-pure water through centrifugation, at room temperature (25.000×g, 10 min), until obtaining a neutral pH of the dispersion.

2.3. Physicochemical characterization

The average size, the polydispersity index (PDI) and zeta potential of

samples constituted by MIONs and MIONs@APTES were determined through the Dynamic Laser Scattering (DLS) technique (90° backscattering), using the Zetasizer Zs equipment (Malvern Instruments, England). All measurements were performed in triplicate at 25 °C, which the samples were diluted 10 times in saline solution (NaCl 0,9%).

FTIR analysis was performed using the KBr pellet method where 4 mg of samples constituted by MIONs and MIONs@APTES were employed. The equipment used was a Perkin-Elmer spectrometer, model Frontier in which the spectra were recorded in the range of 400–4000 cm⁻¹, with 64 scans, at a resolution of 4 cm⁻¹.

The thermogravimetric analyses were performed in the Shimadzu DTG-60 TGA equipment. Approximately 4 mg of each sample was used during the procedure in which the heating rate from room temperature to 950 °C (5 °C.min⁻¹), using an atmosphere of synthetic air.

Diffractionograms were obtained using a Rigaku-Smart Lab X-Ray Diffractometer (Tokyo, Japan). The analyses were conducted by X-ray Cu-Kα source, with wavelength (λ = 1.54056 Å) and a scattering angle of 0.5°–5°. Approximately 50 mg of MIONs and MIONs@APTES were used in the analyses. The specific surface area and pore size distribution of samples (100 mg) were studied through nitrogen adsorption and desorption isotherms, determined at 77 K. The Quantachrome (NOVA 2000e) surface area and porosity analyzer was employed in the analyses. Brunauer–Emmett–Teller (BET) method was employed, and pore size distributions data were obtained from the adsorption branch of the isotherms by the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method.

2.4. Evaluation of ciprofloxacin incorporation rate

Triplicates of samples constituted by MIONs and MIONs@APTES (50 mg mL⁻¹) were incubated in an orbital shaker (IKA KS 260, Staufen, Germany) at 190 RPM, with ciprofloxacin at 150 µg mL⁻¹ and 300 µg mL⁻¹, for 72 h (room temperature). The drug concentrations were quantitatively analyzed through the HPLC-DAD technique in the Chromaster Hitachi system (Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of a volumetric mixture of water: acetonitrile (80:20 - pH 2.4, adjusted with phosphoric acid - 85%) was isocratically eluted. The column LiChrospher® RP-18 (Merck - São Paulo, Brazil) was used as a stationary phase. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹ and the volume of injection was 20 µL. The column oven temperature was adjusted to 25 °C. The DAD detection was obtained from 210 to 290 nm, where the wavelength of 279 nm was monitored. The calibration curve was prepared from six different standards (200, 100, 75, 50, 35, and 20 µg/ml). The standards were prepared from a ciprofloxacin pharmaceutical standard (Certified Reference Material - Merck - São Paulo Brazil) (n = 3). The obtained 3D-spectrum and chromatograms were processed by Chromaster System Manager Software.

The ciprofloxacin incorporation efficiency (IE%) in nanoparticles was calculated using the concentration quotient of the nanoparticles embedded in ciprofloxacin solutions and the initial concentration used in the preparation (equation (1)). For the study continuing, the pellet obtained after the centrifugation process was resuspended in saline solution (NaCl 0.9% p/v) obtaining the same initial concentration. The samples loaded with ciprofloxacin were designated as CIPRO-MIONs@APTES and CIPRO-MIONs.

$$IE (\%) = 100 - \frac{[non - incorporated\ ciprofloxacin]}{[initial\ ciprofloxacin]} \quad (1)$$

Where: IE is the incorporation efficiency.

2.5. Release kinetics evaluation

The in vitro release kinetic study was performed using Simulated Body Fluid (SBF), which was prepared to have an ion concentration nearly to the human blood plasma (Na⁺ 142.0; K⁺ 5.0; Ca²⁺ 2.5; Mg²⁺ 1.5; Cl⁻ 147.8; HCO⁻³ 4.2; HPO₄⁻² 1.0, and SO₄⁻² 0.5 mM), and buffered

at pH 7.25 with the tris-hydroxymethyl-aminomethane at room temperature. Samples displaying better loading rates were employed in quadruplicates. Samples constituted by 30 mg of CIPRO-MIONS and CIPRO-MIONS@APTES were weighted and added to tubes with 1 mL of SBF. The samples were submitted to an orbital shaker (80 rpm min⁻¹) at sink conditions, 37 °C. After 4, 8, 30, 45, 55, 68, 75, 92 h, the samples of the supernatants were collected and analyzed through the HPLC technique. The model of Korsmeyers-Peppas was used as diffusion model and the empirical equation (equation (2)) was used aiming to describe the ciprofloxacin release from the nanoparticles with the time.

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln K + n \ln t \quad (2)$$

Where: K is a constant, ratio M_t/M_∞ is the fraction of solute released, t is the time of the released and the n is characteristic of release mechanism considered.

2.6. In vitro biocompatibility evaluation

All cell culture medium and flow cytometry procedures were performed according to the required biosafety criteria. Analyzes were carried using Human Embryonic Kidney cells HEK-293 (ATCC® CLR-1573). Dulbecco's modified Eagle culture medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin was used as culture medium. Cells were incubated (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA) in a controlled atmosphere (5% CO₂) and humidity at 37 °C. After the cells reached adequate confluency, approximately 1.0 x 10⁶ cells were transferred to 12-well cell culture plates and remained for 24 h.

The cytotoxicity of CIPRO-MIONS and CIPRO-MIONS@APTES, at 400 µg mL⁻¹ (correspond to 1.14 µg and 1.06 µg, respectively of ciprofloxacin) and controls constituted by MIONS and MIONS@APTES (400 µg mL⁻¹) and NaCl 0.9%, were studied through the flow cytometry technique (BD FACsVERSE, San Jose, USA), using the kit Fixable Viability Stain®. This kit has a maximum emission of fluorochrome at 450 nm, which reacts by binding covalently to the amines of the cell surface and the intracellular medium. Dead cells show increased fluorescence when compared to living cells. For each sample, 50,000 acquisitions were conducted.

2.7. Antibiofilm evaluation

The antibiotic activity of the CIPRO-MIONS and CIPRO-MIONS@APTES samples was evaluated through the biofilm formation method, developed by Machado et al. (2020), with some modifications [32]. The SEM technique was used to evaluate the biofilms formation over the glass coverslips by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC-23235). The inoculum was adjusted to 0.5 McFarland standard and a total of 16 disks of sterilized glass (GC) were used. After the sterilization process, the GCs were assigned as follow (n = 4):

- (i) Control group: (a) untreated *S. aureus*; (b) free ciprofloxacin (300 µg mL⁻¹); (C) MIONS (50 mg mL⁻¹) and MIONS@APTES (50 mg mL⁻¹).
- (ii) Treatment group: (a) CIPRO-MIONS at 50 mg mL⁻¹ and (b) CIPRO-MIONS@APTES at 50 mg mL⁻¹ (corresponding to 143,58 µg and 132,50 µg of ciprofloxacin, respectively).

The GCs were placed in 24-well polystyrene plates with 1 mL of BHI-g (Brain Heart infusion) broth and 0.1 mL of the bacterial inoculum. The plate was incubated for 24 h at 37 °C and then each GC was prepared according to the following procedures: (i) aseptically washing with 3 mL of sterile saline solution (0.9% w/v), (ii) fixation using 2.5% glutaraldehyde for 1 h, and (iii) dehydration, conducted through 5 washes using ethanol (10, 25, 50, 75, and 90%) for 20 min and ethanol, at 99.5% for 1 h.

The topographies of the biofilms were visualized and photographed through the Scanning Electron Microscope technique (SEM) (Carl Zeiss EVO®, Oberkochen, Germany). The samples were dried overnight in a bacteriological incubator at 37 °C, and afterward, they were mounted on aluminum stubs, with copper tape, coated with gold in a low-pressure atmosphere with an ion sputter coater (Denton Vacuum Desk II, Denton Vacuum, USA). The surface topographies of the biofilms were visualized and photographed using a scanning electron microscope (JSM-5310, JEOL, Japan), operating at 20 kV in increments of 1000 and 10,000 X were taken.

2.8. Statistical analysis

The Results were expressed as mean ± standard deviation. The groups of data were analyzed through ANOVA and the differences between the groups were measured by Tukey post-test where the P values < 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization

The proposed synthesis method allowed obtaining a monodispersed system (PDI = 0.23), which was determined an average size of 78.34 ± 1.83 nm (Fig. 1A). The silanized samples revealed a slight size increasing, reaching 86.32 ± 2.0 nm (data non showed). The zeta potential of the MIONS samples was determined in -18.45 ± 1.89 mV. However, the MIONS@APTES samples revealed a significant increase, displaying positive values that reached +5.76 ± 0.65 mV. This behavior can be explained by the presence of amino-terminal groups, that were superficially added to the nanoparticle's surface, through the functionalization process. The FTIR technique was performed, and the Results are available in Fig. 1B. The presence of iron oxide can be confirmed by the strong absorption band around 570-590 cm⁻¹, confirming the metal-oxygen stretch [33]. In the region between 1000 and 1250 cm⁻¹, a wide-band was observed in samples constituted by MIONS@APTES, which was attributed to Si-O-Si vibrations. The presence of these types of bonds can be attributed to the silica formation from the use of glass flasks, during the synthesis processes. This behavior was firstly observed by Galeotti et al., 2011 [34]. The presence of silica network is often adsorbed onto the surface of the magnetite by FeO-Si bonds. The signals associated with this particular vibration cannot be seen in the infrared spectra because it appears around 584 cm⁻¹ and therefore overlaps with Fe-O vibrations. Besides, the presence of anchored propyl groups was confirmed by a weak signal associated with C-H stretching vibrations at about 2931 cm⁻¹ [35]. The bands observed around 3100 cm⁻¹ (strong) and 1634 cm⁻¹ (weak) were attributed to the O-H elongation bonds and were associated with the presence of water molecules physically adsorbed on the nanoparticle's surface.

APTES molecules anchored on the nanoparticle surfaces were also evaluated through the thermogravimetric analysis technique. The Results obtained are available in Fig. 1C and D. Data obtained from MIONS samples revealed an initial weight loss of around 21%, observed around 150 °C, attributed to water molecules probably physically adsorbed into pores of the matrix. On the other hand, samples of MIONS@APTES revealed a peak ranging from 200 to 290 °C, which was attributed to the thermal decomposition of APTES molecules. Finally, a small exothermic peak, appearing in the range of 400–480 °C, was attributed to the oxidation product of Fe₃O₄ [36].

The crystalline phase of the samples was investigated through the X-ray diffraction (XRD) technique, using the Cu-Kα radiation. The obtained spectrum for samples constituted by MIONS is available in Fig. 1E. The data revealed narrow peaks compatible with the crystalline phase of Fe₃O₄ (magnetite), composed of a total of six peaks, observed in (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2) (5 1 1), and (4 4 0), which were compared to card JCPDS N. 65.3167 (magnetite). The average crystallite size was

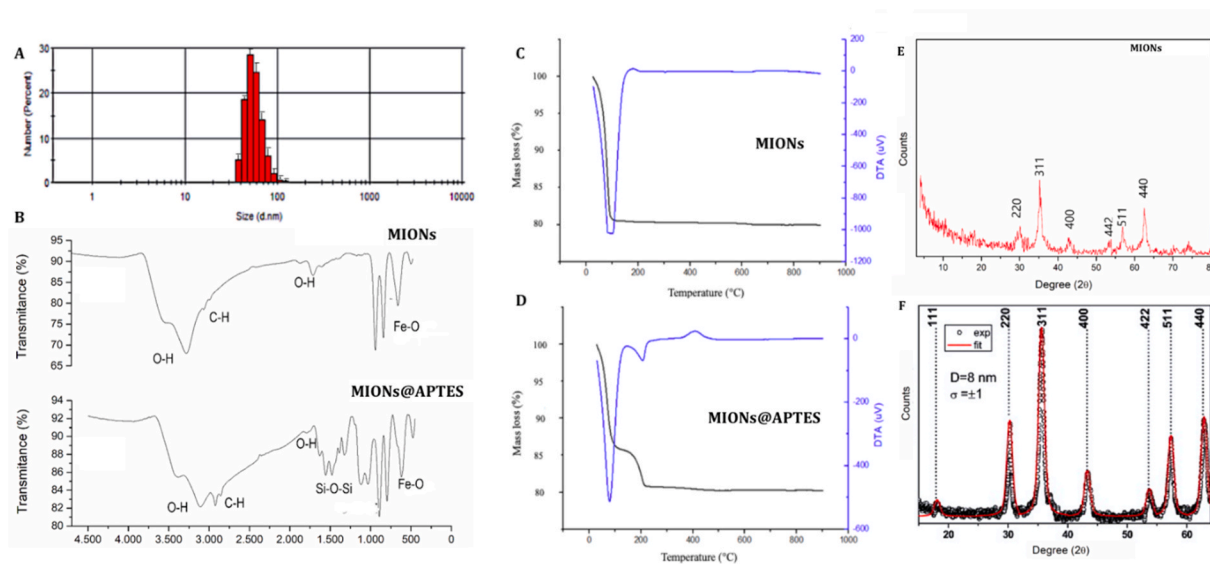


Fig. 1. Chemical and physical characterization of obtained nanoparticles. (A) Size distribution of MIONs@APTES sample ($n = 3$). (B) FTIR spectra of non-MIONs and MIONs@APTES samples. (C) Thermograms of MIONs and MIONs@APTES samples. (E) X-ray patterns obtained for MIONs sample and (F) Comparative pattern of XRD obtained and compared with Standard Cards from the Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) for magnetite N. 65.3167.

calculated using the Scherrer equation and the software Match! (version 3.10.169). The Full Width at Half Maximum (FWHM) of the peaks, in the directions of (3 1 1), (4 4 0), and (2 2 0) were employed (Fig. 1F). The obtained data revealing an average crystallite size of 8.01 ± 0.09 nm.

The textural parameters used to characterize the MIONs and MIONs@APTES nanoparticles are available in Fig. 2. The isothermal curves were built up through nitrogen adsorption and desorption, starting from low relative pressures, aiming to fill the micropores, obtained a thin film formation. In both samples, when the relative pressure achieves high values ($P/P_0 \cong 0,9$) the macropores filling occurred. The region where the main nitrogen consuming is located between the $P/P_0 > 0.6$. for MIONs@APTES and $P/P_0 > 0.85$ for MIONs samples, revealing the presence of relevant amount of large mesopores in the non

silanized matrix, when compared to MION@APTES samples.

The obtained curves exhibit a typical characteristic of type IV and V isotherms. The hysteresis loop reflects the equilibrium phase transition and appears when the adsorption and desorption curves do not coincide, and this behavior is typical of multilayer filled mesoporous materials, consistent with the recently reported porosities for mesoporous iron oxides. Besides, these materials have desorption at a lower pressure than the respective adsorption [37,38].

The isothermal curve showed a correlation of 0,9945, and the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method was employed to determine the average volume and diameter of the pores. Samples constituted by MIONs revealed a superficial area of 258.27 ± 7.51 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ and an average pore diameter of 33.02 nm. On the other hand, MIONs@APTES samples presented 186.27 ± 6.68 . $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and average pore diameter of 28.92 nm. Due to the diameter of pores, the materials were characterized as mesoporous, which the pore diameter comprehend sizes between 5 and 50 nm.

As expected, the silanization process promotes a significant reduction in the area, which was calculated around 27% (from 258 to 186 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). Naghiloo et al. (2015) also observed a reduction of approximately 65% (from 879 to 306 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), after the silanization of silica nanoparticles with APTES [39]. Goscianska et al. (2017) experienced a more severe reduction, reaching around 70% of the superficial area (from 740 to 220 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) [40]. This area reduction after the silanization process, can significantly reduce the incorporation rate of drugs. Furthermore, significant changes in the release behavior can occur since the superficial characteristics of mesoporous matrices are modified, and the possible polar interactions between drugs and the iron oxide matrices can be significantly are reduced.

3.2. Incorporation rate and release kinetic study

The incorporation study was conducted in MIONs and MIONs@APTES (50 mg mL^{-1}) nanoparticles, in which the samples were incubated and shaken (190 RPM) with different solutions of ciprofloxacin ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $300 \mu\text{g mL}^{-1}$). The HPLC technique was employed to determine quantitatively the amount of drug-loaded into the nanoparticles. The obtained Results are available in Fig. 3, and data revealed a relevant incorporation rate of the drug for both tested matrices, reaching values of $95.45 \pm 4.17\%$ for the MIONs matrix and $88.23 \pm 3.87\%$ for MIONs@APTES samples.

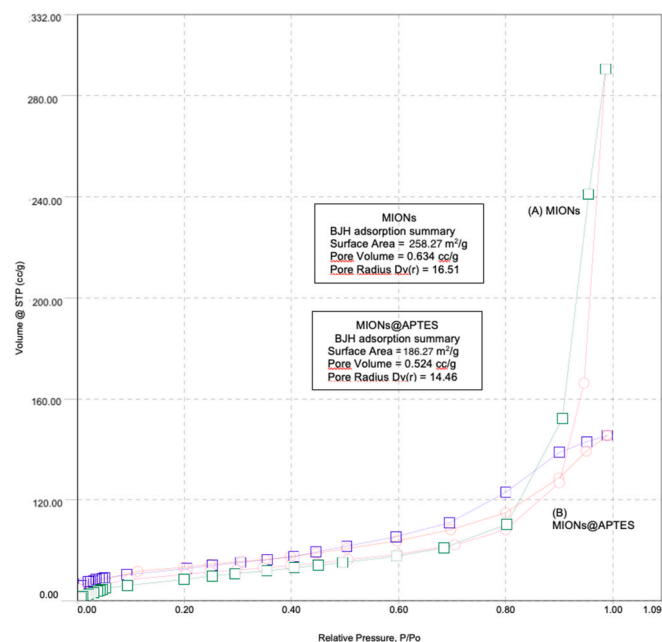


Fig. 2. Isothermal curves obtained through nitrogen adsorption and desorption in (A) MIONs and (B) MIONs@APTES samples. BJH method was employed to determine the surface area, pore volume and pore radius of nanoparticles.

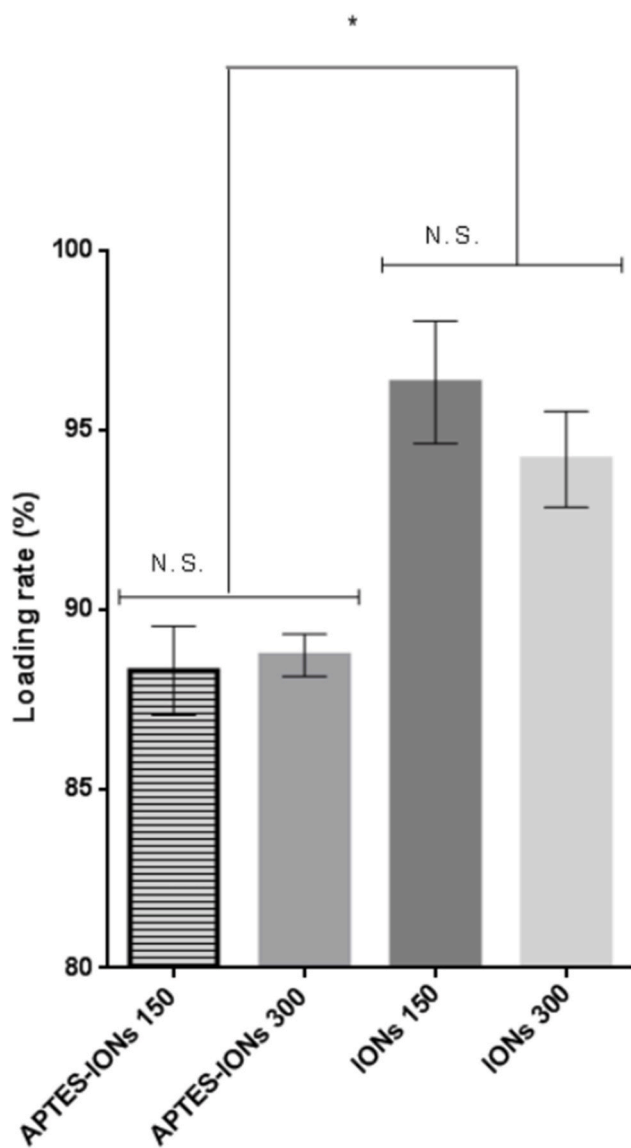


Fig. 3. Incorporation rates of ciprofloxacin at 150 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in MIONs and MIONs@APTES matrices; N.S = non-significant statistical differences; (*) statistically difference at level of $p < 0.5$.

As expected, the non-functionalized matrix (MIONs) displayed the highest drug incorporation rate, reaching approximately 97%, when incubated with ciprofloxacin at 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The same matrix incubated with ciprofloxacin at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ revealed similar incorporation rates, and no statistically significant differences were found among the samples ($p > 0.5$). On the other hand, the silanized matrix (MIONs@APTES) revealed an important reduction in the drug incorporation rate, reaching $88.34 \pm 7.43\%$ (ciprofloxacin at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Again, no statistically significant differences were found when the same matrix was incubated with a solution of ciprofloxacin at 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($p > 0.05$). Comparing the values found for silanized and non-silanized matrices, significant statistical differences at the level of $p < 0.5$ (*) were calculated.

This behavior can be attributed to the surface area reduction (around 28%) given by the silanization process, which is in accordance with the isothermal curves obtained (Fig. 2). APTES groups can interact among them or with the silica surface through hydrogen bonds, promoting a formation of an organo-siloxane network capable of occluding partially the pore system, which is therefore not accessible even to small molecules [41].

For the release kinetic study, the HPLC technique was employed aiming to determine the amounts of ciprofloxacin released in the SBF medium, from the MIONs (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and MIONs@APTES (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) matrices. After 4, 8, 30, 45, 55, 68, 75, 92, 116, 140, 164, and 188 h (7.8 days) samples of the supernatant were collected and analyzed by HPLC. The released mass of ciprofloxacin (%) was plotted as a function of time, and the Results are available in Fig. 4. The obtained data revealed that both systems allowed a controlled release of the drug, with different kinetics behavior in which the matrix of MIONs@APTES displayed a slow rate compared to the non-silanized matrix. Until 8 h, both systems revealed similar release behavior, and no statistically significant differences were observed at a level of $p > 0.5$. However, between 30 and 160 h, a significant difference among the matrices could be noted, in which the drug was slowly released from the MIONs@APTES matrix ($p < 0.5$).

The individual mathematical analyses of the release kinetics patterns of ciprofloxacin from the MIONs@APTES and MIONs matrices are available in Fig. 5(A) and (B), respectively. The Results revealed that the MIONs matrix (A) provided a release behavior of ciprofloxacin that followed a pattern that suggests a second-order kinetics behavior ($R^2 = 0.9935$). On the other hand, the MIONs@APTES matrix revealed a different behavior, where ciprofloxacin was released following a pattern that suggests a first-order kinetics behavior ($R^2 = 0.9848$).

From a pure Fickian release modality, the term "n" in equation (1) was defined to be 0.43, assuming a spherical nature of the nanoparticles. Thus, the kinetic constants K_1 for MIONs@APTES and MIONs matrices were calculated, and the results are available in Table 1.

Ciprofloxacin loaded in MION@APTES (CIPRO-MIONs@APTES) matrix displayed a distinct release kinetic behavior contrasted to MIONs nanoparticles. This system was capable of releasing the drug that followed a slower kinetic, closing the release cycle after around eight days. On the other hand, the non-silanized system revealed the capacity to release the drug faster, contrasted to the silanized system, reaching 100% of drug release after around six days.

The introduction of different organic groups to silica nanoparticles matrix can control many superficial properties, such as hydrophobicity, thermal stability adsorption capacity, ion exchange capacity, and surface host-guest interactions [41,42]. In this study, APTES molecules' presence can justify the observed behavior since they could be allowed an establishing of additional chemical interactions based on the anchoring phenomena compared to the non-silanized matrix. According to Fig. 5C and D, ciprofloxacin has a central region, characterized by a

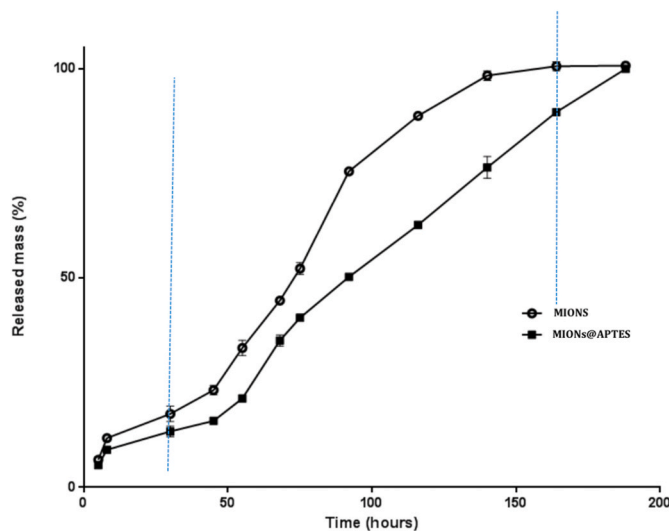


Fig. 4. Release profile of ciprofloxacin from MIONs and MIONs@APTES matrices after 166 h. Significant differences between the curves can be observed in the area among the dotted lines at the level at least $p < 0.5$.

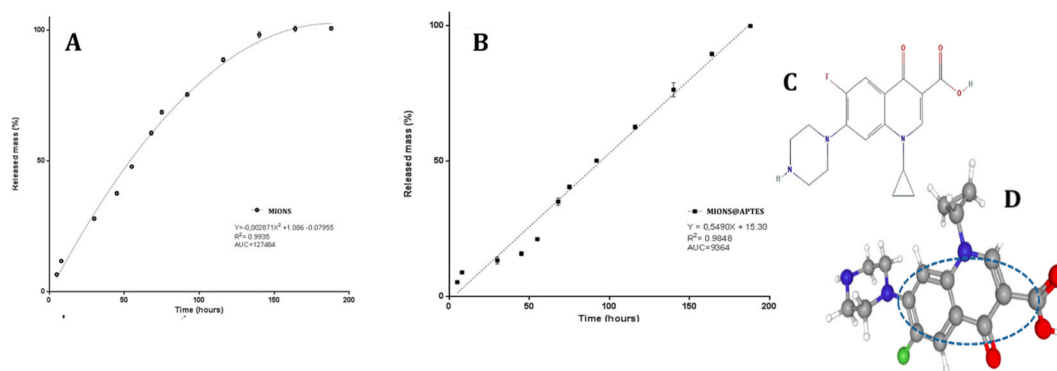


Fig. 5. Mathematical analyses of individual release behavior of ciprofloxacin from MIONs@APTES (A) and MIONs (B) matrices; (C) 2D molecular structure of ciprofloxacin; (D) A 3D structure where the region of the six-members rings (dotted line) represents the non-polar region which Van der Waals interactions can be established with alkyl chains of the APTES. Adapted from PubChem Database. Ciprofloxacin, CID = 2764, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>.

Table 1

Kinetic constants K1 and R2 for MIONs@APTES and MIONs matrices.

Sample	Kinetic constant (K_1)	R^2
APTES-IONs	6.9×10^{-2}	0.9948
IONs	8.2×10^{-2}	0.9935

non-polar plane area, located between the six-members rings. In this region, some Van der Waals interactions may have occurred between the alkyl chains from the APTES molecules and the drug. This hypothesis would integrate a possible elucidation for the slow rate release kinetically observed in this study.

3.3. In vitro biocompatibility evaluation

HEK-293 cells, a human healthy fibroblast lineage, were used in this work aiming to evaluate the in vitro biocompatibility of the prepared systems. In this sense, the cytotoxicity profile of CIPRO-MIONs@APTES and CIPRO-MIONs samples were evaluated, and the Results obtained are presented in Fig. 6. In the micrograph 6A (amplification of 900 X), is available the results for HEK-293 cells treated with a sterile solution of NaCl 0.9% (taken as a negative control). The image revealed a dense and confluent population of healthy cells, presenting a well-adherent pebble-like growth profile, long fusiform shape, reduced amounts of cytoplasmic granules, and clear cell boundaries. On the other hand, in Fig. 6B and C, are available panels of flow cytometry of cells treated CIPRO-MIONs@APTES samples at $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (corresponding to $1.06 \mu\text{g}$ of ciprofloxacin). The data revealed a significant number of cells with similar size and internal complexity (Fig. 6B) and two different populations, constituted by dead cells (5.09%) and viable cells (89.03%) (Fig. 6C). Fig. 6D is available the micrograph (amplification of 900 X) of cells that received the same described treatment. It is possible to observe that treated cells have similar characteristics to the negative control group, where significant morphological differences were not identified.

The flow cytometry panels for the cells treated with CIPRO-MIONs, at $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (corresponding to $1.14 \mu\text{g}$ of ciprofloxacin) are available in Fig. 6E and F. The Results found are similar to those encountered in the cells treated with silanized nanoparticles, revealing a population of viable cells 90.05%. Furthermore, the image located in Fig. 6G (amplification of 900 X) revealed morphological characteristics of HEK-293 cells, concordant with a high biocompatibility profile.

Similar biocompatible Results were found by Sibov et al. (2012) when mesenchymal stem cells (MSCs) were treated with iron oxide nanoparticles (IONs) at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ [43,44]. The authors investigated the proliferation capacity of cells when exposed to a different

concentration of IONs. The results revealed that nanoparticles do not interfere in the normal proliferation activity of MSCs when compared to non-treated controls. More recently, Silva et al. (2016) evaluated the biocompatibility of maghemite nanoparticles functionalized with 2, 3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) in MSCs [45]. Aiming to verify the influence of the functionalized IONs over the proliferation rates of the cells, the authors evaluated the cytotoxicity profile. The results also revealed a relevant biocompatible profile of the system over the studied cells. The findings obtained in this work are concordant with the previously cited studies available in the literature, even loaded with a relevant quantity of ciprofloxacin, the nanoparticles do not show an important cytotoxic activity over HEK-293 cells, revealing a biocompatible profile. However, the continuing of studies, considering other normal human cell lineages, as well as in vivo studies must integrate future investigations aiming to obtain a detailed biocompatible profile of the proposed system.

3.4. Antibiofilm evaluation

The antibiotic activity of CIPRO-MIONs and CIPRO-MIONs@APTES was evaluated through the biofilm formation method, in which the SEM technique was employed to study the biofilm formation. The controls were constituted by untreated *S aureus* and free ciprofloxacin. The obtained results are available in Fig. 7, which are available SEM images characterized by (A) and (B) untreated *S aureus*, in which is possible to identify a healthy aggregated of blastospores that are covering all area of the substratum surface and displaying light extracellular matrix (magnification of 1000 X and 10,000 X, respectively); (C) and (D) *S aureus* treated with free ciprofloxacin at $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (magnification of 1000 X and 10,000 X, respectively). As expected, the image exhibits a few numbers of cells on the substratum and a decrease of the extracellular matrix, revealing a relevant antibiofilm activity of the free drug in the employed concentration.

In Fig. 8 are available the Results obtained for *S aureus*, treated with the prepared nanosystems. In the images (A) and (B) are available SEM images of *S aureus* treated with 50 mg mL^{-1} of MIONs@APTES (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively). From the concentration employed, the obtained data revealed that the presence of the fabricated nanoparticles does not alter the biofilm formation, displaying negligible antibiofilm properties. Similar results were found for *S aureus* treated with non silanized samples (MIONs), also at 50 mg mL^{-1} , where no relevant activity was observed (data non showed). On the other hand, when bacteria strains were treated with nanoparticles loaded with ciprofloxacin, a different scenario was observed. The SEM images of the groups treated with MIONs@APTES samples, at 50 mg mL^{-1} ($143,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ciprofloxacin) are available in Figure (C) and (D) (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively). The obtained data revealed

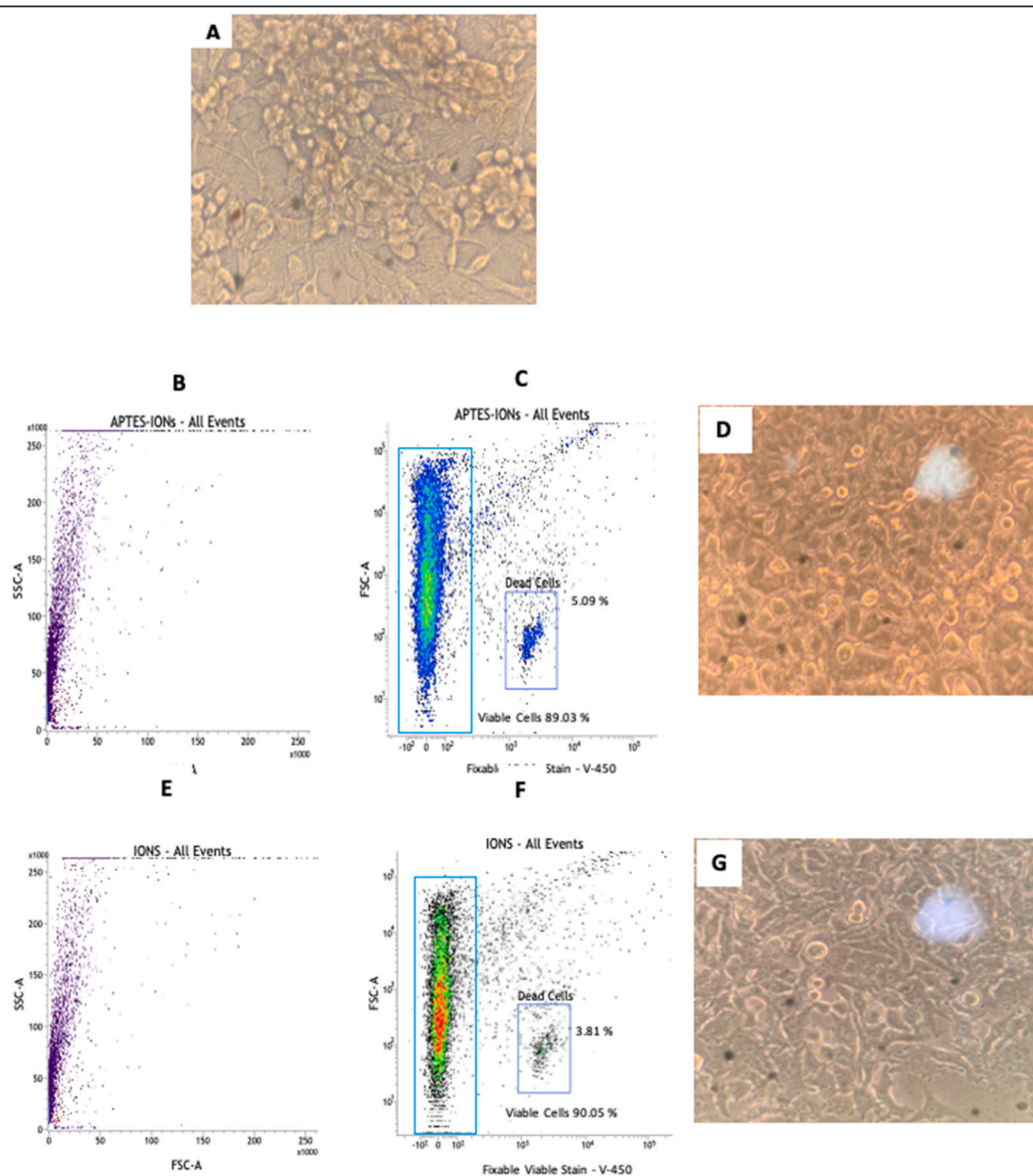


Fig. 6. In vitro biocompatibility evaluation in HEK-293 cells treated with samples constituted by CIPRO-MIONS and CIPRO-MIONS@APTES. (A) Micrograph of HEK-293 cells treated with NaCl 0.9% w/v solution, as negative control. (B), (C) and (D) represents the Results of cells treated for 48 h with CIPRO-MIONS@APTES-IONS at 200 µg/mL (corresponding to 0.98 µg of ciprofloxacin). (E), (F) and (G) represents the results of cells treated for 48h with CIPRO-MIONS samples, at 200 µg mL⁻¹ (corresponding to 1.06 µg of ciprofloxacin). Micrograph with amplification of 900 X.

scattered cells and a complete loss of the biofilm architecture, forming dense aggregates of nanoparticles, without a significant presence of bacteria cells. A similar pattern can also be observed in Fig. 8(E) and (F), where the *S aureus* cells were treated with 50 mg mL⁻¹ of CIPRO-MIONS@APTES (132,50 µg mL⁻¹ of ciprofloxacin) (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively). The SEM images revealed aggregates of nanoparticles without a biofilm structure.

Considering the obtained data, the antibiofilm role of ciprofloxacin can be confirmed, since all groups treated with the antibiotic compound do not reveal important biofilm growth when compared to controls. On the other hand, although the concentrations of ciprofloxacin employed via nanoparticles were significantly lower (143,18 µg mL⁻¹ and 132,50 µg mL⁻¹) compared to the free ciprofloxacin group (300 µg mL⁻¹), the SEM images are suggesting a superior antibiofilm activity in the groups treated with nanoparticles. This same behavior was also observed by previously published works employing other nanosystems. For example, Kashef et al. (2020) evaluated the effect of ciprofloxacin-loaded in niosomes on inhibition of *S aureus* biofilm formation [46]. The authors

confirmed by SEM a significant reduction in the formed biofilm by the loaded niosomes (ciprofloxacin at 128 µg mL⁻¹). In the present work, ciprofloxacin-loaded in iron mesoporous nanoparticles revealed similar behavior, revealing antibiofilm properties when a similar concentration was used (CIPRO-MIONS@APTES at 132.50 µg mL⁻¹).

Many strategies have been developed by research groups in different countries in the world, applying iron oxide nanoparticles and conjugates against microorganisms. For example, Grumezescu et al., 2014, report the synthesis and characterization of amoxicillin-functionalized magnetite nanostructures against *S. aureus*. The obtained material revealed a relevant biocompatible profile and potent antimicrobial effect [47]. More recently, Olar et al. (2020) prepared a core-shell system based on iron oxide, functionalized with a thiolate derivative. The obtained hybrid system displayed relevant action against *Candida albicans* biofilms [48]. Li et al. (2020) evaluated the antibacterial and antibiofilm activities of mesoporous hollow Fe₃O₄ nanoparticles, in the presence of an alternating magnetic field (AMF) [49].

The antibiotic and antibiofilm capacity of iron nanoparticles was

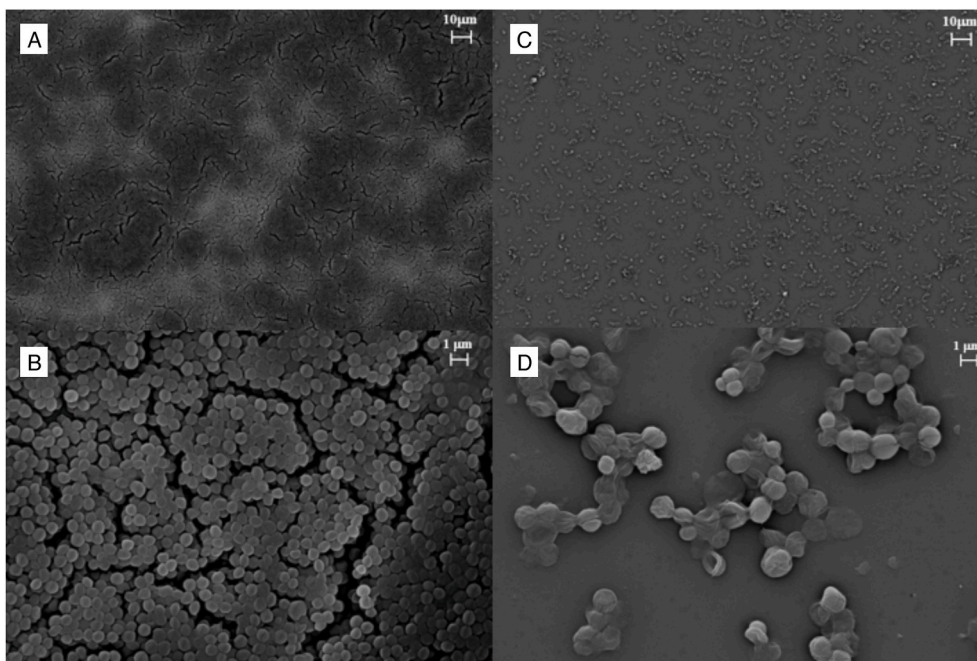


Fig. 7. SEM images of *S. aureus* biofilms characterized by different groups: (A) and (B) untreated cells (magnification of 1000 X and 10,000 X, respectively) taken as negative control, (C) and (D) *S. aureus* treated with free ciprofloxacin at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (magnification of 1000 X and 10,000 X, respectively).

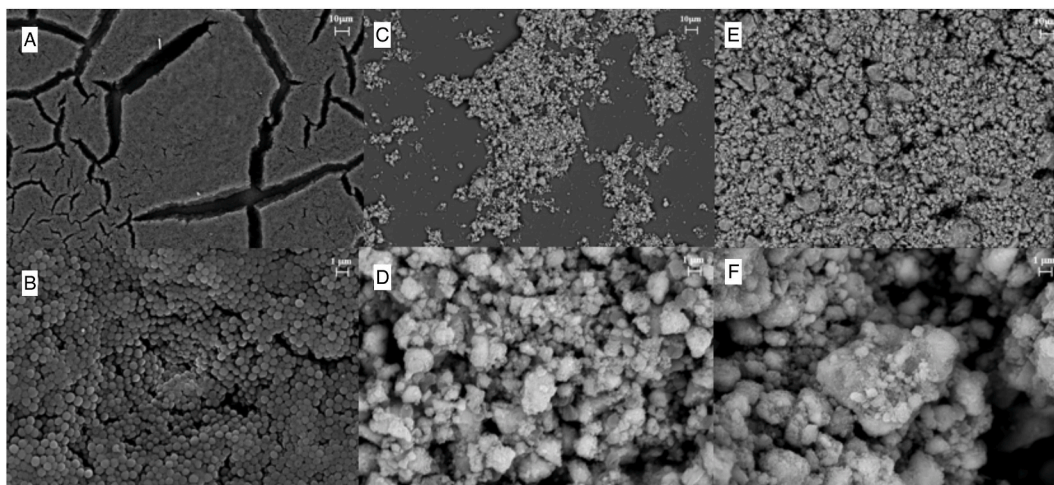


Fig. 8. SEM images of *S. aureus* biofilms characterized by different groups: (A) and (B) *S. aureus* treated with MIONs-APTES at 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, taken as control (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively). (C) and (D) CIPRO-MIONs at 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (143,18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ciprofloxacin) (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively). (E) and (F) *S. aureus* cells treated with CIPRO-MIONs@APTES at 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (132,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ciprofloxacin) (magnification of 1000 and 10,000 X, respectively).

already widely demonstrated in many works previously published, in which existing a consensus of the involvement of reactive oxygen species (ROS) and bacterial death, through cell membrane damage and the nanoparticle's internalization. However, how iron oxide nanoparticles cause damage in the bacterial membrane and become internalized are questions that must be still answered [22,50–52]. In this regard, the present work confirms the antibiofilm properties of the MIONs and MIONs@APTES samples. From our knowledge, the present work has demonstrated, for the first time, the antibiofilm activity of ciprofloxacin loaded in MIONs. However, other detailed tests certainly will amplify the comprehension regarding the antibiotic activity of the produced nanoparticles.

4. Conclusion

The set of experimental procedures conducted in this work allowed to obtain two different systems characterized by particles that in aqueous medium display nanometric size distribution, low dispersity index, and high superficial area constituted by a mesoporous matrix. This work aimed was to study the capacity of mesoporous iron oxide nanoparticles and its silanized matrix, still poorly explored in biomedical applications, to incorporate significant amounts of the ciprofloxacin antibiotic drug. The found results revealed that CIPRO-MIONs and CIPRO-MIONs@APTES samples gathered a set of characteristics that includes a significant ciprofloxacin incorporation rate, associated with a slow-release profile. Even in high concentrations (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the produced nanoparticles do not reveal an important cytotoxic profile to

normal human cells. Furthermore, the systems revealed relevant anti-biofilm activity against the *S. aureus* strain. Other tests with different bacterial strains, preclinical investigations, and toxicological evaluations must integrate other experiments aiming to amplify the comprehension of the antibiotic activity of produced nanoparticles. In this regard, the produced nanosystems can be considered a potential system to be applied in bacterial infection treatment.

CRedit authorship contribution statement

Wivyan Castro Lage: Methodology, Conceptualization. **Daniela Sachs:** Validation, Conceptualization. **Tainara Aparecida Nunes Ribeiro:** Formal analysis. **Marli Luiza Tebaldi:** Investigation, Writing – review & editing. **Yanka dos Reis Soares de Moura:** Methodology, Conceptualization. **Stephanie Calazans Domingues:** Methodology, Conceptualization. **Daniel Cristian Ferreira Soares:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (PPM-00125-18), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their financial support. Also, We would like to thank the technician Jonas Mendes (Structural Characterization Laboratory - LCE) for technical assistance.

References

[1] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kiehl, D. V. Colombara, K.S. Ikuta, N. Kissoun, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F. R. Machado, K.K. Reinhart, K. Rowan, C.W. Seymour, R.S. Watson, T.E. West, F. Marinho, S.I. Hay, R. Lozano, A.D. Lopez, D.C. Angus, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study, *Lancet* 395 (2020) 200–211, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).

[2] S. Hussain, J. Joo, J. Kang, B. Kim, G.B. Braun, Z.-G. She, D. Kim, A.P. Mann, T. Mölder, T. Teesalu, S. Carnazza, S. Guglielmino, M.J. Sailor, E. Ruoslahti, Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy, *Nat. Biomed. Eng.* 2 (2018) 95–103, <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0187-5>.

[3] R.C. Moellering, MRSA: the first half century, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 4–11, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr437>.

[4] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 711–745, <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.

[5] R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, V. Tiwari, Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action, *Virulence* 9 (2018) 522–554, <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>.

[6] H. Ceri, M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, A. Buret, The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1771–1776, <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999>.

[7] S.T. Chancy, D. Zähler, D.S. Stephens, Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria, *Future Microbiol.* 7 (2012) 959–978, <https://doi.org/10.2217/fmb.12.63>.

[8] W. C. Reygaert, An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria, *AIMS Microbiol.* 4 (2018) 482–501, <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.

[9] A. Kumar, H. Schweizer, Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1486–1513, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.

[10] J.M. Blair, G.E. Richmond, L.J. Piddock, Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance, *Future Microbiol.* 9 (2014) 1165–1177, <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>.

[11] E.Y. Klein, W. Jiang, N. Mojica, K.K. Tseng, R. McNeill, S.E. Cosgrove, T.M. Perl, National costs associated with methicillin-susceptible and methicillin-resistant

Staphylococcus aureus hospitalizations in the United States, 2010–2014, *Clin. Infect. Dis.* (2018), <https://doi.org/10.1093/cid/ciy399>.

[12] K.T. Kavanagh, Control of MRSA and MRSA in the United States: protocols, policies, risk adjustment and excuses, *Antimicrob. Resist. Infect. Contr.* 8 (2019) 103, <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0550-2>.

[13] K.T. Kavanagh, S. Abusalem, L.E. Calderon, The incidence of MRSA infections in the United States: is a more comprehensive tracking system needed? *Antimicrob. Resist. Infect. Contr.* 6 (2017) 34, <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0193-0>.

[14] S. Tang, J. Zheng, Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) 1701503, <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>.

[15] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 12 (2016) 789–799, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.

[16] Y.-G. Yuan, Q.-L. Peng, S. Gurunathan, Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 569, <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>.

[17] C. Tao, Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress, challenges and prospects, *Lett. Appl. Microbiol.* 67 (2018) 537–543, <https://doi.org/10.1111/lam.13082>.

[18] M.M. Mohamed, S.A. Fouad, H.A. Elshoky, G.M. Mohammed, T.A. Salaheldin, Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Int. J. Vet. Sci. Med.* 5 (2017) 23–29, <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.003>.

[19] S. Meghana, P. Kabra, S. Chakraborty, N. Padmavathy, Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles, *RSC Adv.* 5 (2015) 12293–12299, <https://doi.org/10.1039/C4RA12163E>.

[20] Happy Agarwal, Soumya Menon, S. Venkat Kumar, S. Rajeshkumar, Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route, *Chem. Biol. Interact.* 286 (2018) 60–70, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.008>.

[21] M. Azizi-Lalabadi, A. Ehsani, B. Divband, M. Alizadeh-Sani, Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic, *Sci. Rep.* 9 (2019) 17439, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54025-0>.

[22] M. Arakha, S. Pal, D. Samantarai, T.K. Panigrahi, B.C. Mallick, K. Pramanik, B. Mallick, S. Jha, Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14813, <https://doi.org/10.1038/srep14813>.

[23] S. Philip, S. Kuriakose, Studies on the antibacterial activity of water-soluble iron oxide nanoparticle- β -cyclodextrin aggregates against selected human pathogenic bacteria, *Nano-Struct. Nano-Objects* 16 (2018) 347–353, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.09.008>.

[24] A.B. Djurišić, Y.H. Leung, A.M.C. Ng, X.Y. Xu, P.K.H. Lee, N. Degger, R.S.S. Wu, Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts, *Small* 11 (2015) 26–44, <https://doi.org/10.1002/sml.201303947>.

[25] R.S. Santos, C. Figueiredo, N.F. Azevedo, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: towards advanced delivery of antibiotics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 136–137 (2018) 28–48, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.010>.

[26] N.D.T. Tram, P.L.R. Ee, Macromolecular conjugate and biological carrier approaches for the targeted delivery of antibiotics, *Antibiotics* 6 (2017), <https://doi.org/10.3390/antibiotics6030014>.

[27] P. Deol, G.K. Khuller, K. Joshi, Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1211–1214, <https://doi.org/10.1128/AAC.41.6.1211>.

[28] R.S. Kalhapure, D.R. Sikwal, S. Rambharose, C. Mocktar, S. Singh, L. Bester, J. K. Oh, J. Renukuntla, T. Govender, Enhancing targeted antibiotic therapy via pH responsive solid lipid nanoparticles from an acid cleavable lipid, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 13 (2017) 2067–2077, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.010>.

[29] M. Zhu, W. Liu, H. Liu, Y. Liao, J. Wei, X. Zhou, D. Xing, Construction of Fe₃O₄/vancomycin/PEG magnetic nanocarrier for highly efficient pathogen enrichment and gene sensing, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 12873–12881, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02374>.

[30] D. Westmeier, G. Posselt, A. Hahlbrock, S. Bartfeld, C. Vallet, C. Abfalter, D. Docter, S.K. Knauer, S. Wessler, R.H. Stauber, Nanoparticle binding attenuates the pathobiology of gastric cancer-associated *Helicobacter pylori*, *Nanoscale* 10 (2018) 1453–1463, <https://doi.org/10.1039/C7NR06573F>.

[31] C. Wang, K. Zhang, Z. Zhou, Q. Li, L. Shao, R.Z. Hao, R. Xiao, S. Wang, Vancomycin-modified Fe₃O₄@SiO₂@Ag microflowers as effective antimicrobial agents, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 3077–3094, <https://doi.org/10.2147/IJN.S132570>.

[32] T.S. Machado, F.R. Pinheiro, L.S.P. Andre, R.F.A. Pereira, R.F. Correa, G.C. de Mello, T.A.N. Ribeiro, B. Penna, D. Sachs, F. Aguiar-Alves, Virulence factors found in nasal colonization and infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and their ability to form a biofilm, *Toxins (Basel)* 13 (2020) 14, <https://doi.org/10.3390/toxins13010014>.

[33] Z. Durmus, H. Kavas, M.S. Toprak, A. Baykal, T.G. Altınçekiç, A. Aslan, A. Bozkurt, S. Coşgun, l-lysine coated iron oxide nanoparticles: synthesis, structural and conductivity characterization, *J. Alloys Compd.* 484 (2009) 371–376, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.04.103>.

- [34] F. Galeotti, F. Bertini, G. Scavia, A. Bolognesi, A controlled approach to iron oxide nanoparticles functionalization for magnetic polymer brushes, *J. Colloid Interface Sci.* 360 (2011) 540–547, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.076>.
- [35] J. Sosa-Acosta, J.A. Silva, L. Fernández-Izquierdo, S. Díaz-Castañón, M. Ortiz, J. C. Zuaznabar-Gardona, A.M. Díaz-García, Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 545 (2018) 167–178, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.02.062>.
- [36] S. Sundar, R. Mariappan, S. Piraman, Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug, *Powder Technol.* 266 (2014) 321–328, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.06.033>.
- [37] F. Jiao, J.-C. Jumas, M. Womes, A.V. Chadwick, A. Harrison, P.G. Bruce, Synthesis of ordered mesoporous Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ with crystalline walls using post-template reduction/oxidation, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 12905–12909, <https://doi.org/10.1021/ja063662i>.
- [38] K. El-Boubbou, R. Ali, H. Al-Zahrani, T. Trivilegio, A.H. Alanazi, A.L. Khan, M. Boudjelal, A. AlKushi, Preparation of iron oxide mesoporous magnetic microparticles as novel multidrug carriers for synergistic anticancer therapy and deep tumor penetration, *Sci. Rep.* 9 (2019) 9481, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46007-z>.
- [39] M. Naghiloo, M. Yousefpour, M.S. Nourbakhsh, Z. Taherian, Functionalization of SBA-16 silica particles for ibuprofen delivery, *J. Sol. Gel Sci. Technol.* 74 (2015) 537–543, <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3631-6>.
- [40] J. Goscińska, A. Olejnik, I. Nowak, APTES-functionalized mesoporous silica as a vehicle for antipyrine – adsorption and release studies, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 533 (2017) 187–196, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.043>.
- [41] L. Pasqua, A. Procopio, M. Oliverio, R. Paonessa, R. Prete, M. Nardi, M.F. Casula, F. Testa, J.B. Nagy, Hybrid MCM-41 grafted by a general microwave-assisted procedure: a characterization study, *J. Porous Mater.* 20 (2013) 865–873, <https://doi.org/10.1007/s10934-012-9663-1>.
- [42] L. Pasqua, M. Morra, Immobilization of mesoporous silica particles on stainless steel plates, *J. Nanoparticle Res.* 19 (2017) 94, <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3773-2>.
- [43] T.T. Sibov, P. Severino, L.C. Marti, L.F. Pavon, D.M. Oliveira, P.R. Tobo, A. H. Campos, A.T. Paes, E. Amaro, L. F. Gamarra, C.A. Moreira-Filho, Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation, *Cytotechnology* 64 (2012) 511–521, <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9428-3>.
- [44] T.T. Sibov, L.A.M. Miyaki, J.B. Mamani, L.C. Marti, L.R. Sardinha, L.F. Pavon, D. M. de Oliveira, W.H. Cardenas, L.F. Gamarra, Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cell labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with Poly-L-lysine, *Einstein (Sao Paulo)*. 10 (2012) 180–188, <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000200011>.
- [45] L.H.A. Silva, J.R. da Silva, G.A. Ferreira, R.C. Silva, E.C.D. Lima, R.B. Azevedo, D. M. Oliveira, Labeling mesenchymal cells with DMSA-coated gold and iron oxide nanoparticles: assessment of biocompatibility and potential applications, *J. Nanobiotechnol.* 14 (2016) 59, <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0213-x>.
- [46] M.T. Kashef, N.M. Saleh, N.H. Assar, M.A. Ramadan, The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, *Infect. Drug Resist.* 13 (2020) 1619–1629, <https://doi.org/10.2147/IDR.S249628>.
- [47] A. Grumezescu, M. Gestal, A. Holban, V. Grumezescu, B. Vasile, L. Mogoantă, F. Iordache, C. Bleotu, G. Mogoşanu, Biocompatible Fe₃O₄ increases the efficacy of amoxicillin delivery against gram-positive and gram-negative bacteria, *Molecules* 19 (2014) 5013–5027, <https://doi.org/10.3390/molecules19045013>.
- [48] R. Olar, M. Badea, C. Maxim, A.M. Grumezescu, C. Bleotu, L. Măruţescu, M. C. Chifiriuc, Anti-biofilm Fe₃O₄@C18-[1,3,4]thiadiazolo[3,2-a]pyrimidin-4-ium-2-thiolate derivative core-shell nanocoatings, *Materials (Basel)* 13 (2020) 4640, <https://doi.org/10.3390/ma13204640>.
- [49] W. Li, W. Wei, X. Wu, Y. Zhao, H. Dai, The antibacterial and antibiofilm activities of mesoporous hollow Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating magnetic field, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 4492–4507, <https://doi.org/10.1039/D0BM00673D>.
- [50] L. Shkodenko, I. Kassirov, E. Koshel, Metal oxide nanoparticles against bacterial biofilms: perspectives and limitations, *Microorganisms* 8 (2020) 1545, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101545>.
- [51] D.M.S.A. Salem, M.M. Ismail, H.R.Z. Tadros, Evaluation of the antibiofilm activity of three seaweed species and their biosynthesized iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄-NPs), *Egypt. J. Aquat. Res.* 46 (2020) 333–339, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.09.001>.
- [52] Y. Li, D. Yang, S. Wang, C. Li, B. Xue, L. Yang, Z. Shen, M. Jin, J. Wang, Z. Qiu, The detailed bactericidal process of ferric oxide nanoparticles on *E. coli*, *Molecules* 23 (2018) 606, <https://doi.org/10.3390/molecules23030606>.

ANEXO 2



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 000077 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIFEI - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21040001000130

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida BPS, nº1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: Brasil

Telefone: (35) 3622-6702

Fax:

Email: nit@unifei.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM ÓXIDOS DE FERRO E CIPROFLOXACINO CONTRA BACTÉRIAS

Resumo: Tendo conhecimento que os tratamentos para doenças infecciosas multirresistentes são de difícil manejo clínico e que muitos pacientes em todo o mundo diariamente seguem para o óbito, esta invenção descreve um material cerâmico baseado em óxidos de ferro contendo em suas matrizes moléculas do fármaco ciprofloxacino. O material cerâmico modificado com agente silanizador permite a liberação controlada de ciprofloxacino para o tratamento de doenças infecciosas. Os dados obtidos demonstraram que o sistema ciprofloxacino e nanopartículas de óxido de ferro produz boa atividade antibiofilme bacteriana e a interação entre o componente cerâmico e medicamentoso foi apenas física. Por fim, os resultados sugerem também que a matriz porosa é capaz de permitir a liberação controlada do fármaco do ciprofloxacino.

Figura a publicar: 6

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: DANIEL CRÍSTIAN FERREIRA SOARES

CPF: 01194115632

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida BPS 1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: soares@unifei.edu.br

Inventor 2 de 5

Nome: DANIELA SACHS

CPF: 54992524168

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida BPS 1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: danisachs@gmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: WIVYAN CASTRO LAGE

CPF: 12668183677

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida BPS 1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: wivyan.lage@vale.com

Inventor 4 de 5

Nome: MARLI LUIZA TEBALDI

CPF: 27371263049

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida BPS 1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marlitebaldi@unifei.edu.br

Inventor 5 de 5

Nome: STEPHANIE CALAZANS DOMINGUES

CPF: 10990389600

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida BPS 1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: stephanie_calazans@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Gru paga nanoparticulas.pdf
Desenho	Figuras - Nanoparticulas ok.pdf
Reivindicação	Reinvindicações - Nanoparticulas de oxido OK.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio descritivo - NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM ÓXIDOS ok.pdf
Resumo	Resumo - NANOPARTÍCULAS BASEADAS ok.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

___ SIAFI2021-DOCUMENTO-CONSULTA-CONNS (NOTA LANCAMENTO DE SISTEMA) _____
23/12/21 11:47 NS USUARIO : HEBERT
DATA EMISSAO : 22Dez21 VALORIZACAO : 22Dez21 NUMERO : 2021NS005997
UG/GESTAO EMITENTE: 153030 / 15249 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
FAVORECIDO : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUS
TITULO DE CREDITO : 2021NP001373 DATA VENCIMENTO : 19Jan22

OBSERVACAO

FATURA 158/DEZ/2021 NIT - PROTOCOLO 23088.038156-2021-89 - NOSSO N° 294091619
44403425 - SERVIÇO: 200 PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO DE UTILIDADE, CERT
IFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO E ENTRADA NA FASE NACIONAL DO PCT.

CONTINUA...

LANCADO POR : 47917334600 - ASSIS UG : 153030 22Dez21 16:40
PF1-AJUDA PF3=SAI PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

23/12/21 11:47 NS USUARIO : HEBERT
DATA EMISSAO : 22Dez21 VALORIZACAO : 22Dez21 NUMERO : 2021NS005997
UG/GESTAO EMITENTE: 153030 / 15249 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
FAVORECIDO : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUS
TITULO DE CREDITO : 2021NP001373 DATA VENCIMENTO : 19Jan22

L	EVENTO	INSCRICAO	CLAS.CONT	CLAS.ORC	V A L O R
01	521214	2021NE000110	213120400	33913904	70,00
02	401002	2021NE000110		33913904	70,00
03	511005	2021NE000110	332321100	33913904	70,00

LANCADO POR : 47917334600 - ASSIS UG : 153030 22Dez21 16:40
PF1-AJUDA PF3=SAI PF4=ESPELHO PF5=EVENTO/CONTA PF12=RETORNA

___ SIAFI2021-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
23/12/21 11:47 USUARIO : HEBERT
DATA EMISSAO : 23Dez21 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2021GR800155
UG/GESTAO EMITENTE : 153030 / 15249 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153030 GESTAO : 15249
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: DEZ21 VENCIMENTO: 19Jan22
DOC. ORIGEM: 153030 / 15249 / 2021NP001373 PROCESSO : 23088.036759/2020
RECURSO : 1
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161944403425
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
FATURA 158/DEZ/2021 NIT - PROTOCOLO 23088.038156/2021-89 - NOSSO N° 2940916194
4403425 - SERVIÇO: 200 PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO DE UTILIDADE, CERTI
LANCADO POR : 09766325600 - HEBERT UG : 153030 23Dez2021 11:00
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



Emitido em 23/12/2021

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 11133/2021 - CFI (11.38.05.01)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/12/2021 11:55)

HEBERT WESLEY PEREIRA ZARONI

COORDENADOR - TITULAR

CFI (11.38.05.01)

Matrícula: 2120136

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.unifei.edu.br/documentos/> informando seu número: **11133**, ano: **2021**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **23/12/2021** e o código de verificação: **408dc570a6**

FIGURAS

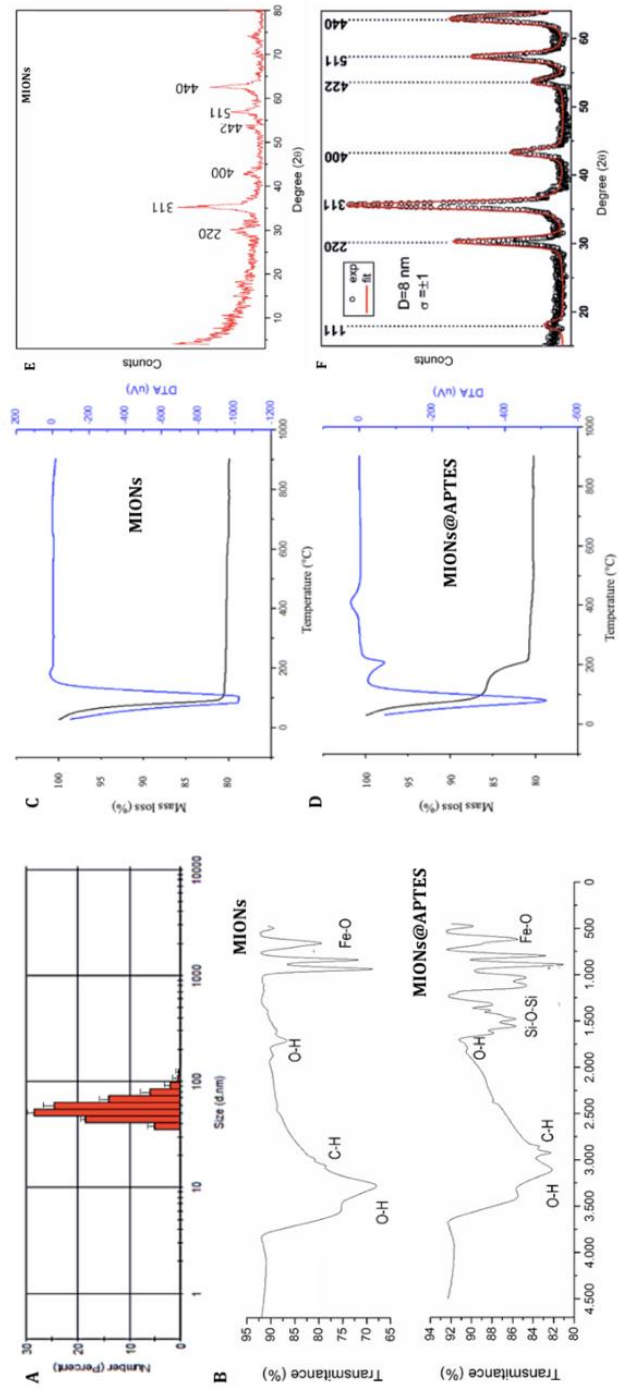


Figura 1

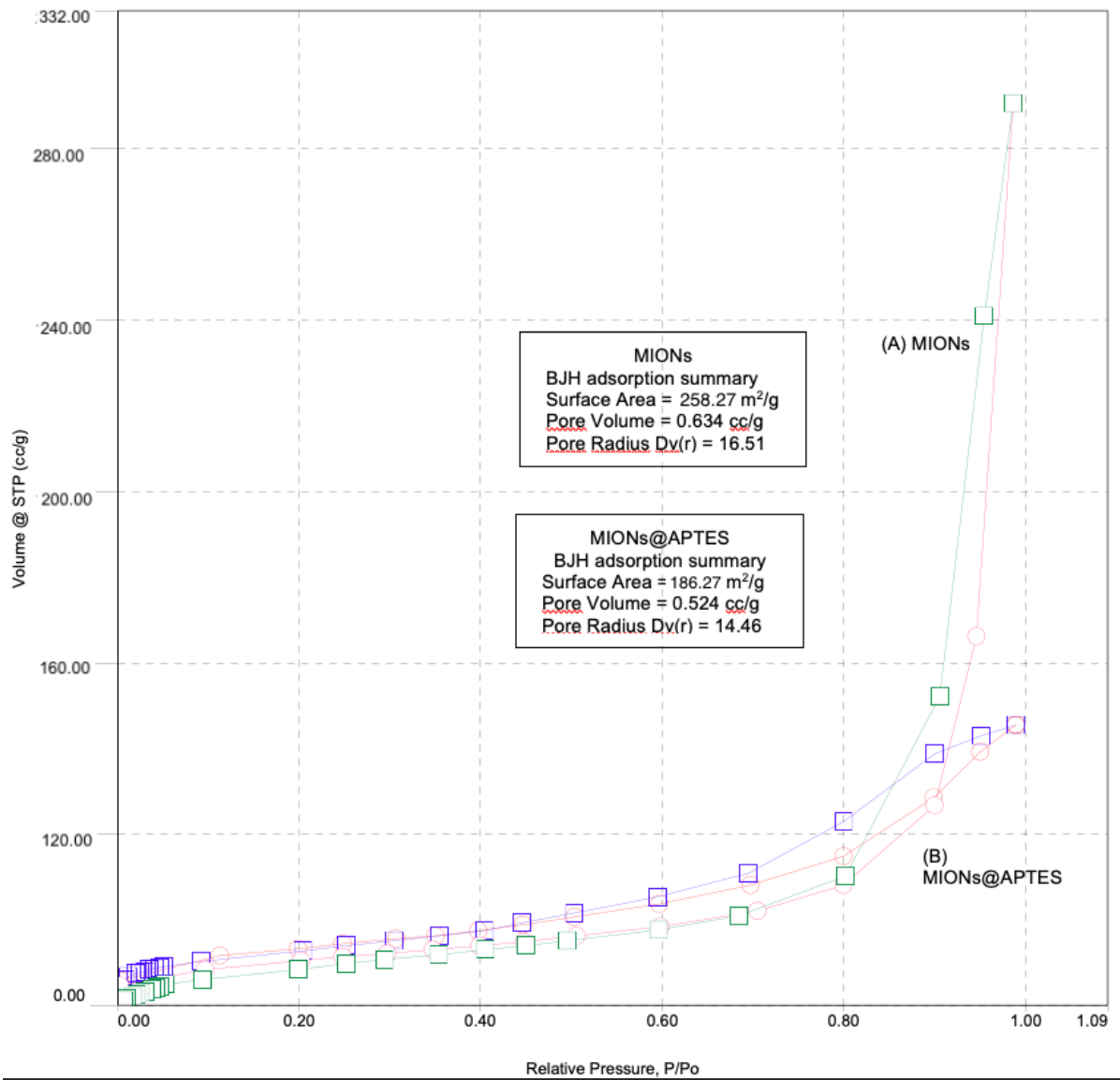


Figura 2

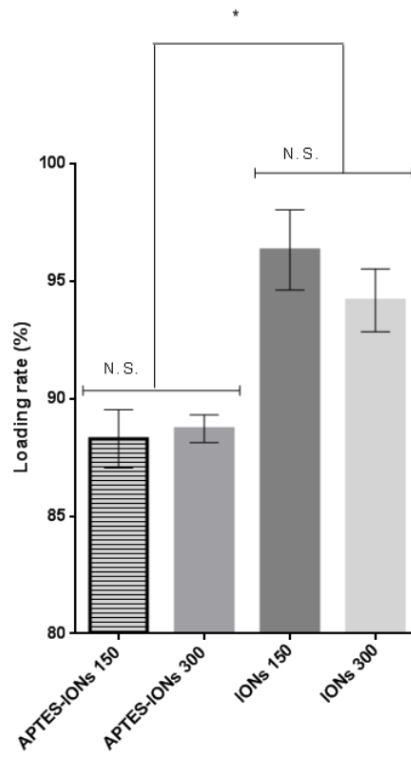


Figura 3

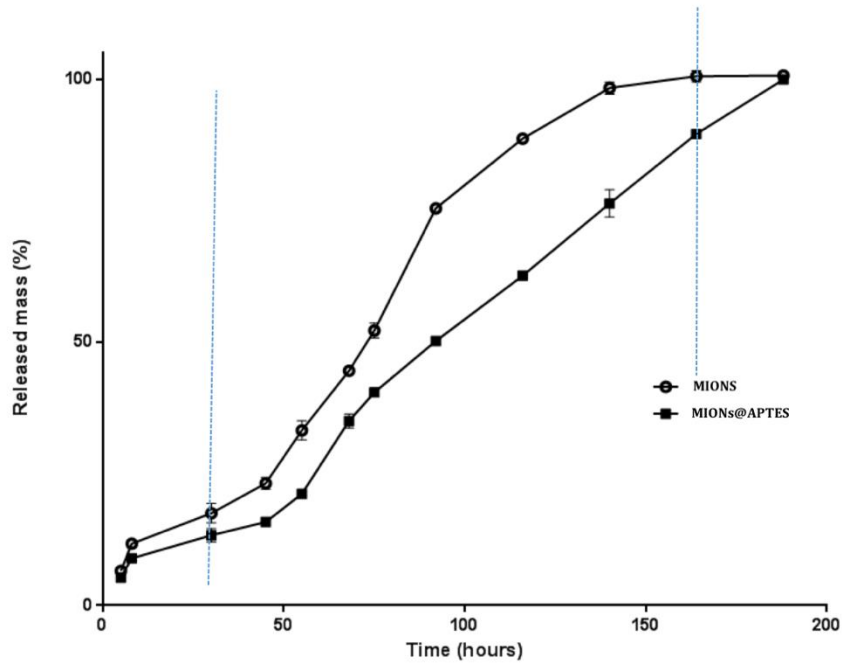


Figura 4

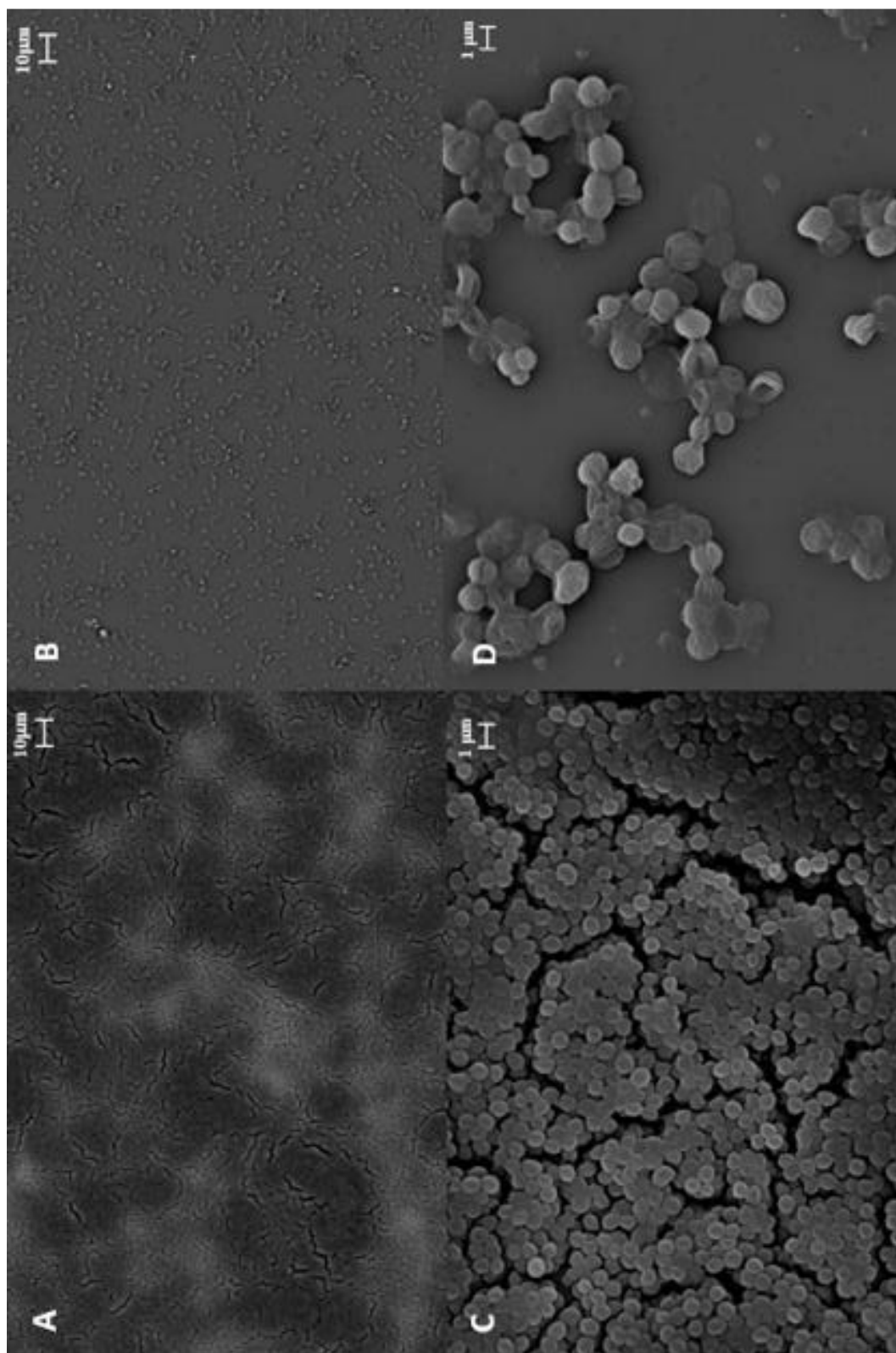


Figura 5

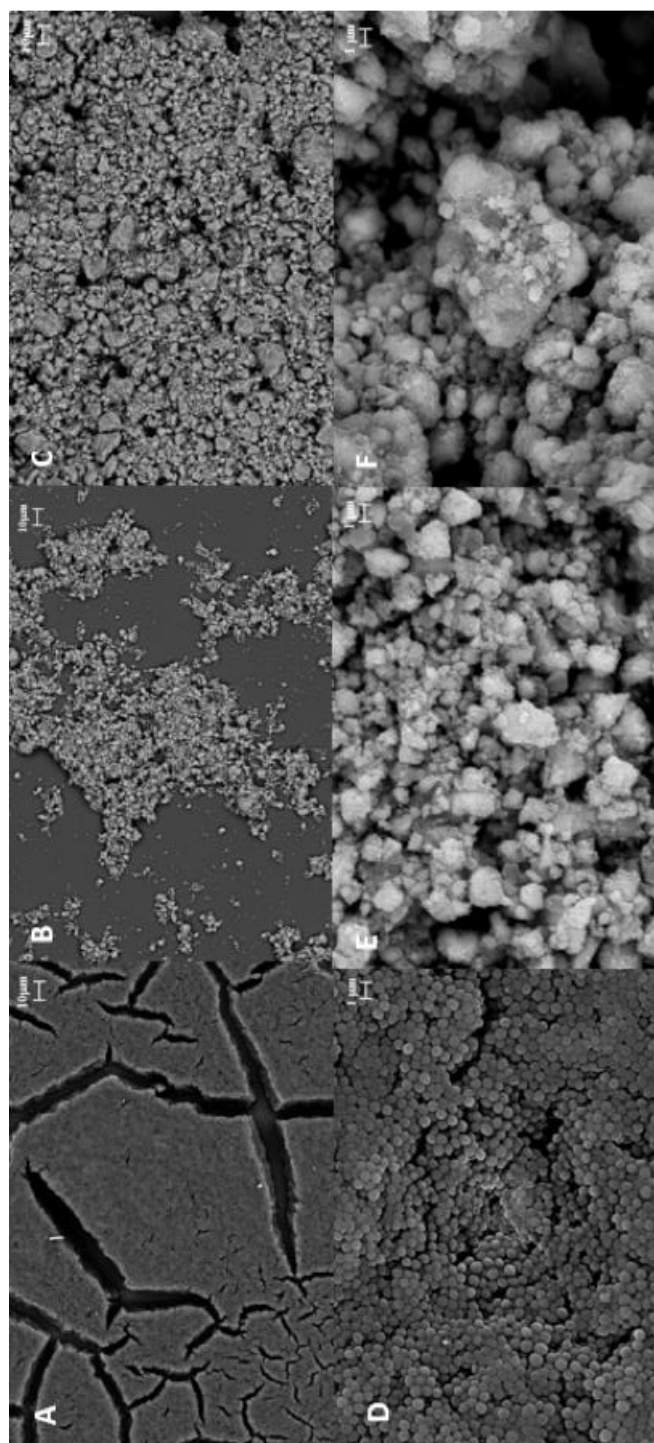


Figura 6

REININDICAÇÕES

- 1) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MESOPOROSO **caracterizadas por** conter o em seus poros o fármaco ciprofloxacino.
- 2) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MESOPOROSO contendo ciprofloxacino de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** serem aplicadas ao tratamento de doenças infecciosas com base bacteriana.
- 3) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MESOPOROSO contendo ciprofloxacino **caracterizadas pelo** processo de preparação conforme:
 - a) Preparar nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas por precipitação em fase aquosa;
 - b) Funcionalizar as nanopartículas com 3-aminopropil-trietoxissilano;
 - c) Incorporar o fármaco ciprofloxacino nos poros das nanopartículas;
- 4) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pela** etapa “a”, possuir tamanho médio de partícula entre 20 e 500 nm e compreender os seguintes tipos de óxidos de ferro: óxido de ferro II e óxido de ferro III, preferencialmente Hematita, Maghemita e a Magnetita.
- 5) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4, etapa “a”, **caracterizadas por**

serem constituídas de matriz porosa, ordenada ou não, com área superficial maior que $20 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

- 6) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4, **caracterizadas pela** etapa “b” possuir agentes silanizantes como compostos de origem alcoxisilanos, de variado tamanho de cadeia de carbono, em quaisquer grau de silanização ou qualquer agente capaz de modificar as características químicas superficiais do material em quantidades que sejam diferentes de concentrações traço ($< 1\%$).
- 7) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pela** etapa “c” adicionar o fármaco ciprofloxacino após a preparação das nanopartículas ou adição durante a síntese, concentrado ou diluído para incorporação em matriz porosa, que alcance a faixa de taxa de incorporação que varie de 2 a 100 %, independentemente da concentração de fármaco empregado.
- 8) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4, **caracterizadas pela** etapa “d” apresentar um perfil de liberação (dessorção) lenta do fármaco ciprofloxacino, que obedeça a uma cinética de liberação de ordem zero, um ou dois.
- 9) NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO CONTENDO CIPROFLOXACINO de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada pela**, etapa “e”, apresentar atividade antibiofilme contra diferentes cepas de bactérias em concentração maiores que $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM ÓXIDOS DE FERRO E CIPROFLOXACINO CONTRA BACTÉRIAS

CAMPO DA INVENÇÃO:

[001] A presente invenção situa-se na área da Engenharia Química e Engenharia de materiais

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO / TÉCNICA RELACIONADA

[002] Atualmente as doenças infecciosas ainda representam um grande desafio para a saúde humana, sendo uma das principais causas de mortalidade mundial. O uso de antibióticos tem sido o principal método utilizado na prática clínica, em função de sua eficácia e resultados de custo-efetividade. No entanto, devido ao desenvolvimento de resistência por várias cepas de bactérias resistente à meticilina (MRSA), por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, a busca por alternativas terapêuticas tem sido o foco de diversas pesquisas nas áreas biomédicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), até o ano de 2050 a resistência bacteriana poderá ser a principal causa de mortes em todo o mundo, o que se deve principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos. No Brasil, desde 2010 só é possível comprar antibióticos mediante a apresentação de receita, todavia ainda se observa o crescimento da venda de antibióticos no país. Nesse sentido, é urgente o desenvolvimento de outras terapias capazes de atuar contra os mecanismos de resistência ao mesmo tempo que pode alcançar alta seletividade e baixos efeitos colaterais.

[003] Buscando novas alternativas terapêuticas, nanossistemas têm sido alvo de pesquisas e desenvolvimento tecnológico para o combate à multirresistência em microrganismos. Dentre os sistemas propostos, as nanopartículas metálicas, como ouro, prata e ferro integraram este

novo arsenal contra muitas cepas bacterianas, devido à elevada atividade antibacteriana de amplo espectro, alta seletividade e contorno das ações de resistência dos microrganismos.

[004] O encapsulamento de fármacos antimicrobianos em sistemas carreadores nanoestruturados é outra abordagem que surgiu como uma alternativa importante para o combate ao MRSA, sendo possível melhorar o quadro terapêutico com eficácia enquanto uma redução importante nos efeitos colaterais pode ser observada. Os lipossomas se apresentaram como um sistema inovador de entrega de drogas antibacterianas décadas atrás (DEOL, 1997). No entanto, devido à sua instabilidade física e química relevante, alguns pesquisadores têm investigado outros nano carreadores alternativos, como nanopartículas de lipídicas sólidas e vetores inorgânicos, à base de sílica, polímero e sistemas híbridos de nanopartículas de óxido de ferro, as quais exibem alta estabilidade e relevante perfil de biodegradabilidade. Seguindo na mesma direção, a presente invenção objetiva tratar infecções bacterianas baseadas em biofilme por meio da utilização de nanopartículas de óxido de ferro mesoporoso modificados com aminopropiltriétoxisilano (MIONs@APTES), carregadas com o fármaco ciprofloxacino.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

[005] Figura 1- Caracterização físico-química de nanopartículas de óxido de ferro. (A) Distribuição de tamanho de partículas (espalhamento dinâmico de luz) de amostra de óxidos de ferro. (B) Espectro na região do infravermelho de amostra de nanopartículas de óxido de ferro (MIONs, do inglês *mesoporous iron oxide nanoparticles*) e nanopartículas de óxido de ferro com superfície modificada com aminopropiltriétoxisilano (MIONs@APTES, do inglês *mesoporous iron oxide nanoparticles@aminopropyltriethoxysilane*). (C) e (D)

Termogramas de amostras constituídas por MIONs e MIONs@APTES, respectivamente. (E) Difratoograma de amostra constituída por MIONs e (D) Padrão comparativo de XRD obtido e comparado com Cartão N. 65.3167 relativo ao Padrão do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) para magnetita.

[006] Figura 2- Curvas isotérmicas obtidas por adsorção e dessorção de nitrogênio em amostras (A) MIONs e (B) MIONs@APTES. O método BJH foi empregado para determinar a área de superfície, o volume e o raio dos poros das nanopartículas.

[007] Figura 3- Taxas de incorporação de ciprofloxacino a 150 e 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ nas matrizes MIONs e MIONs@APTES; N.S = diferenças estatísticas não significativas; (*) diferença estatística ao nível de $p < 0,5$.

[008] Figura 4- Perfil de liberação de ciprofloxacino das matrizes MIONs e MIONs @ APTES até após 166 horas. Diferenças significativas entre as curvas podem ser observadas na área entre as linhas pontilhadas no nível de pelo menos $p < 0,5$.

[009] Figura 5- Imagens de MEV de biofilmes de *S. aureus* caracterizados por diferentes grupos: (A) e (B) *S aureus* tratados com MIONs-APTES a $50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, tomados como controle (aumento de 1.000 e 10.000 X, respectivamente). (C) e (D) CIPRO-MIONs a $50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($143,18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ciprofloxacino) (ampliação de 1.000 e 10.000 X, respectivamente). Células (E) e (F) *S aureus* tratadas com CIPRO-MIONs@APTES a $50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($132,50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ciprofloxacino) (aumento de 1.000 e 10.000 X, respectivamente).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[010] A presente invenção aplica-se ao tratamento de processos infecciosos relacionados à contaminação com bactérias sensíveis aos óxidos de ferro nanoestruturados e/ou modificados com 3-aminopropil-

trietoxissilano contendo incorporado em sua matriz o fármaco ciprofloxacino. O invento é caracterizado por ser um sistema nanoestruturado liofilizado em pó, de administração interna após disperso em água ultrapura estéril, constituído de nanopartículas de óxido de ferro modificados com 3-aminopropil-trietoxissilano, contendo o antibiótico ciprofloxacino, com elevado grau de pureza.

[011] Até o momento, muito já foi estudado e compreendido sobre a formação de biofilmes de bactérias, porém sua resistência aos tratamentos existentes ainda representam um grande desafio na medicina. Algumas das estratégias usadas atualmente para o tratamento de biofilmes são o uso de antibióticos, que deve ser selecionado com base na sensibilidade, e bem como na capacidade de penetrar adequadamente na matriz do biofilme. Exemplos dessa nova abordagem são a aplicação de nanopartículas de óxidos metálicos, terapia fotodinâmica, uso de moléculas antibiofilme.

[012] Dentre os mecanismos que provocam a morte de bactérias por exposição a óxidos de ferro, o mais difundido é o da geração de espécie relativa de oxigênio, que são caracterizados como compostos químicos oriundos do processo de ativação ou redução do oxigênio molecular. São moléculas instáveis e extremamente reativas, capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem mediado por estresse oxidativo com peroxidação lipídica da membrana bacteriana, o que provoca danos à membrana plasmática da célula, prejudica a função do DNA e leva à destruição da bactéria por apoptose, com vazamento do citoplasma

[013] O fármaco ciprofloxacino pertence a segunda geração de fluoroquinolonas, que são moléculas capazes de bloquear uma enzima bacteriana denominada de DNA girase, que tem papel vital dentro do contexto do metabolismo e reprodução de células bacterianas. O fármaco é bem absorvido no trato gastrointestinal superior, alcançando

mais de 50% de biodisponibilidade. O pico da concentração sérica é geralmente alcançado após 1 a 3 horas após a administração de uma dose padrão de 500 mg.

[014] A administração de uma preparação terapêutica pela via oral é o tratamento mais utilizado em casos de infecções bacterianas que incluem o trato respiratório, tecidos moles, ossos e pele. O ciprofloxacino tem sido utilizado como alternativa à vancomicina para o tratamento do *Staphylococcus aureus* resistente assim como o seu encapsulamento e sistemas nanoestruturados como niossomas tem sido alvo de pesquisas com relevantes resultados por permitir a liberação controlada do antibiótico.

[015] Os termos liberação prolongada, lenta ou sustentada são aplicados às formas farmacêuticas desenvolvidas para liberarem o fármaco gradualmente, mantendo a concentração no local de ação dentro de níveis terapêuticos, por período de tempo prolongado. Essas formas farmacêuticas requerem administrações menos frequentes se comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento.

[016] Sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis, principalmente, os derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, embora apresentem uma taxa de liberação relativamente constante, precisam, geralmente, ser removidos posteriormente, o que requer processos cirúrgicos. Já os biodegradáveis podem apresentar vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de uma remoção posterior, o que proporciona melhor aceitação e adesão do paciente ao tratamento.

[017] O desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para o ciprofloxacino, tem o intuito de maximizar os efeitos antibiofilme e antibacteriano constituem o princípio terapêutico da presente invenção.

[018] A patente WO 2,008,054,042 A1 de 01 de novembro de 2006 relata o uso do ciprofloxacino associado a nanopartículas de polímero PLGA para liberação controlada do fármaco. Não foi encontrada qualquer menção ao uso do ciprofloxacino associado a nanopartículas de óxido de ferro.

[019] A patente US 8,409,463 B1 de 02 de abril de 2013 relata a preparação de nanopartículas de óxido de ferro. Nesta patente, os autores relatam um método inovador, utilizando meio aquoso para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro com propriedades superparamagnéticas. Ainda sobre a referida patente, não foi encontrada qualquer menção ao uso do ciprofloxacino associado a nanopartículas de óxido de ferro.

[020] Diferentemente dos documentos supracitados, a matéria tratada no presente documento apresenta um novo produto baseado em um sistema nanoestruturado baseado em ferro, contendo em seus poros moléculas de ciprofloxacino fisicamente adsorvida que permite a liberação controlada de do fármaco, contra o crescimento de biofilmes de bactérias, que atua como uma alternativa as terapias convencionais de tratamento de infecções bacterianas. A matéria tratada pode ser mais bem compreendida a partir dos seguintes exemplos, não limitantes.

[021] EXEMPLO 1 - PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO FERRO:

[022] Inicialmente, as nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas (MIONs) foram preparadas e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 1, onde estão disponíveis os resultados da caracterização físico-química. Os dados foram obtidos diretamente dos equipamentos empregados nas análises e revelaram o tamanho nanométrico das nanoestruturas obtidas, avaliado por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz). O método de síntese proposto

permitiu a obtenção de um sistema monodisperso ($PDI = 0,23$), no qual foi determinado um tamanho médio de $78,34 \pm 1,83$ nm (Figura 1).

[023] A composição química das amostras foi estudada pelas técnicas de difratometria de Raios-X, e que foi comparado Padrão do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) para magnetita. Espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria diferencial de varredura (TGA/DTA). A investigação da fase cristalina das amostras obtidas foi realizada por difração de raios-X (DRX) usando radiação $Cu-K\alpha$. O espectro obtido para amostra constituída por MIONs está disponível na Figura 5A e revelaram picos estreitos compatíveis com a fase cristalina da magnetita, Fe_3O_4 , composta por um total de seis picos, observados nas direções (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2) (5 1 1) e (4 4 0) que foram comparados com o cartão padrão do Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó (JCPDS) para magnetita (JCPDS N. 65.3167). O tamanho médio do cristalito foi calculado usando a equação de Scherrer e o *software* Match! (versão 3.10.169, licença estudantil). Para o cálculo foi considerada a largura a meia altura dos picos (FWHM), das direções (3 1 1), (4 4 0) e (2 2 0). Os dados obtidos revelaram um tamanho médio de cristalito de $8,01 \pm 0,09$ nm. A presença de óxido de ferro pode ser evidenciada pelas fortes bandas de absorção em torno de 580cm^{-1} que foram atribuídas ao estiramento da ligação Ferro-oxigênio (DURMUS et al., 2009). A banda observada em 1050cm^{-1} para amostras de MIONs-APTES, foi atribuída a vibrações de Si-O, Si-O e Fe-O-Si, atestando a formação de camada de sílica que envolve as nanopartículas (GALEOTTI et al., 2011). Uma banda larga em cerca de 3380cm^{-1} e outra fraca a 1618cm^{-1} foram observadas e foi atribuída ao estiramento de ligações O-H que pode ser atribuído à presença de água fisicamente adsorvida na superfície das nanopartículas. Os dados de calorimetria diferencial de varredura (TGA/DTA) obtidos a partir de amostras MIONs revelaram uma perda de

massa inicial de cerca de 21%, observado até 150° C, o que foi atribuído a moléculas de água que provavelmente estavam fisicamente adsorvidas pelos poros da matriz. Por outro lado, as amostras MIONs@APTES revelaram um pico variando de 200 a 290° C, que foi atribuído à decomposição térmica de moléculas de APTES.

[024] As nanopartículas de óxido de ferro mesoporosas foram funcionalizadas com 3-aminopropil-trietoxissilano (MIONs@APTES). Os dados obtidos para estas nanopartículas também estão disponíveis na Figura 1.

[025] EXEMPLO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO:

[026] Na Figura 2 estão disponíveis isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio que foram obtidas para as amostras (A) MIONs (óxido de ferro não funcionalizado) e (B) MIONs@APTES (óxido de ferro funcionalizado com 3-aminopropiltriétoxissilano). O método BJH foi empregado para determinar a área de superfície, o volume e o raio dos poros das nanopartículas. A região onde há o principal consumidor de nitrogênio está localizada entre $P/P_0 > 0,6$ para MIONs@APTES e $P/P_0 > 0,85$ para amostras MIONs, revelando a presença de quantidade relevante de mesoporos grandes na matriz não silanizada (MIONs), quando comparada às amostras MION@APTES. A curva isotérmica apresentou correlação de 0,9945, e o método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) foi empregado para determinar o volume médio e o diâmetro dos poros. As amostras constituídas por MIONs revelaram uma área superficial de $258,27 \pm 7,51 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e um diâmetro médio dos poros de 33,02nm. Por outro lado, as amostras MIONS @ APTES apresentaram $186,27 \pm 6,68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e diâmetro médio dos poros de 28,92 nm.

[027] EXEMPLO 3 - INCORPORAÇÃO DE CIPROFLOXACINO NAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

[028] A incorporação de ciprofloxacino foi conduzido em nanopartículas MIONs e MIONs@APTES (50 mg mL^{-1}), nas quais as amostras foram incubadas e agitadas (190 RPM) com diferentes soluções aquosas de ciprofloxacino ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras foram determinadas como CIPRO-MIONs e CIPRO-MIONs@APTES. A técnica de CLAE foi empregada para determinar quantitativamente a quantidade de droga carregada nas nanopartículas. Os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 3, e os dados revelaram uma taxa de incorporação do fármaco para ambas as matrizes testadas, atingindo valores de $95,45 \pm 4,17\%$ para a matriz CIPRO-MIONs e $88,23 \pm 3,87\%$ para as amostras CIPRO-MIONs@APTES.

[029] EXEMPLO 4 - AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CIPROFLOXACINO DAS NANOPARTÍCULAS:

[030] Para o estudo da cinética de liberação, a técnica de HPLC foi empregada com o objetivo de determinar as quantidades de ciprofloxacino liberadas no meio SBF, a partir das matrizes CIPRO-MIONs ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CIPRO-MIONs@APTES ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após 4, 8, 30, 45, 55, 68, 75, 92, 116, 140, 164 e 188 h (7,8 dias), amostras de $100 \mu\text{l}$ do sobrenadante foram coletadas, sem reposição do volume coletado, e analisadas por HPLC. A massa liberada de ciprofloxacino (%) foi plotada em função do tempo e os resultados estão disponíveis na Figura 4. Os dados obtidos revelaram que ambos os sistemas permitiram uma liberação controlada do fármaco, com comportamento cinético distinto em que a matriz de CIPRO-MIONs@APTES apresentou um ritmo lento em relação à matriz não silanizada. Até 8 h, ambos os sistemas revelaram comportamento de liberação semelhante, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em um nível de $p > 0,5$. Porém, entre 30 e 160 h, notou-se diferença significativa entre as matrizes, em que o fármaco foi liberado lentamente da matriz CIPRO-MIONs@APTES ($p < 0,5$). Análises matemáticas individuais da

cinética de liberação de ciprofloxacino das matrizes CIPRO-MIONS@APTES e MIONS resultados revelaram que uma matriz CIPRO-MIONS@APTES, forneceu um comportamento de liberação de ciprofloxacino que segue uma cinética de primeira ordem ($R^2=0,9848$). Por outro lado, os da matriz de MIONS revelou um comportamento diferente onde uma ciprofloxacino foi liberada seguindo uma ordem de 2° cinética ($R^2 = 0,9935$).

[031] EXEMPLO 5 - ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR ANÁLISE DE BIOFILME:

[032] Na Figura 5 estão disponíveis os resultados obtidos para *S aureus*, tratados com os nanossistemas preparados. Nas imagens 5A e 5B estão disponíveis imagens SEM de *S. aureus* tratado com 50 mg.mL⁻¹ de CIPRO-MIONS@APTES (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente). A partir da concentração empregada, os dados obtidos revelaram que a presença das nanopartículas fabricadas não altera a formação do biofilme, apresentando propriedades antibiofilme desprezíveis. Resultados semelhantes foram encontrados para *S aureus* tratados com amostras não silanizadas (CIPOR-MIONS), também a 50 mg.mL⁻¹, onde nenhuma atividade relevante foi observada (dados não mostrados). Por outro lado, quando cepas de bactérias foram tratadas com nanopartículas carregadas com ciprofloxacino, um cenário diferente foi observado. As imagens dos grupos tratados com amostras CIPRO-MIONS@APTES, a 50 mg.mL⁻¹ (143,18 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacino) estão disponíveis na Figura 5C e 5D (ampliação de 1000 e 10.000 X, respectivamente) Os dados obtidos revelaram células dispersas e perda completa da arquitetura do biofilme, formando agregados densos de nanopartículas, sem presença significativa de células bacterianas. Um padrão semelhante também pode ser observado nas Figura 5E e 5F, onde as células de *S aureus* foram tratadas com 50 mg.mL⁻¹ de CIPRO-MIONS@APTES (132,50 µg.mL⁻¹ de ciprofloxacino) (ampliação de 1.000 e

10.000 X, respectivamente). As imagens de MEV revelaram agregados de nanopartículas sem estrutura de biofilme.

*RESUMO**NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM ÓXIDOS DE FERRO E CIPROFLOXACINO
CONTRA BACTÉRIAS*

Tendo conhecimento que os tratamentos para doenças infecciosas multirresistentes são de difícil manejo clínico e que muitos pacientes em todo o mundo diariamente seguem para o óbito, esta invenção descreve um material cerâmico baseado em óxidos de ferro contendo em suas matrizes moléculas do fármaco ciprofloxacino. O material cerâmico modificado com agente silanizador permite a liberação controlada de ciprofloxacino para o tratamento de doenças infecciosas. Os dados obtidos demonstraram que o sistema ciprofloxacino e nanopartículas de óxido de ferro produz boa atividade antibiofilme bacteriana e a interação entre o componente cerâmico e medicamentoso foi apenas física. Por fim, os resultados sugerem também que a matriz porosa é capaz de permitir a liberação controlada do fármaco do ciprofloxacino.