



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
UNIVERSIDADE UnB DE PLANALTINA - FUP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS – PPG-CIMA

Fábio Teles Costa

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E O ESTUDO DO EFEITO DE
NANOPARTÍCULAS DE $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ EM BACTÉRIAS
PATOGENICAS.**

Brasília
2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA- UnB
FACULDADE UnB DE PLANALTINA – FUP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS – PPG-CIMA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: *MATERIAIS NANOESTRUTURADOS*

Fábio Teles Costa

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E O ESTUDO DO EFEITO DE
NANOPARTÍCULAS DE $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ EM BACTÉRIAS
PATOGENICAS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Materiais pelo Programa de Pós – Graduação em Ciência de Materiais da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Renata Aquino da Silva de Souza

Brasília
2013

Dissertação de autoria de **Fábio Teles Costa** intitulada “**Síntese, caracterização e o estudo do efeito de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em bactérias patogênicas.**”, apresentada como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência de Materiais da Universidade de Brasília, em 24 de julho de 2013, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Dra. Renata Aquino da Silva de Souza
Universidade de Brasília - UnB
Orientadora

Dr. Reinaldo José de Miranda Filho
Universidade de Brasília - UnB
Examinador Externo

Dr. Alex Fabiano Cortez Campos
Universidade de Brasília -UnB
Examinador Interno

Brasília
2013

*“Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur

AGRADECIMENTO

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, por tudo que vem realizando em minha vida. Há tudo dou glória a Ele.

À minha orientadora, Dra. Renata Aquino de Sousa, pela oportunidade, confiança, orientação e amizade;

Ao amigo e “Eterno Orientador”, Octávio Luiz Franco, pelos ensinamentos científicos, pelas oportunidades profissionais e pessoais, pela atenção, pela disponibilidade, por todo apoio prestado na execução de mais um trabalho;

Ao Dr. Alex Fabiano Cortez Campos, pelos ensinamentos durante esse curso, por ter aceitado o convite para participar da minha banca e pelo apoio prestado na realização deste trabalho;

À minha amada mãe, Virgínia Mônica de Araújo Teles, por ter lutado por minha vida, por acreditar em mim quando poucos acreditavam, por ser exemplo de força e dedicação que me fez ser quem eu sou;

À minha avó, Benedita de Araújo Teles, pelo amor de mãe e pelo apoio familiar;

Às minhas tias, Patrícia de Araújo Teles e Maria Gorete Teles da Cruz, por apoiarem minhas escolhas;

As grandes amigas de caminhada, Danielle Alexandrino e Katiúscia Jardim, por todos os momentos bons desse curso. Lembrem-se: “isso é trivial”;

Ao grande amigo, Daniel Amaro, pelas contribuições científicas e por toda amizade que foi de fundamental importância na realização desse trabalho;

Aos grandes amigos do CAPB aos quais não poderia, de forma alguma, deixar de citar, Renato Goulart e Simone Maria Neto, por grandes momentos nos laboratórios da Universidade Católica de Brasília, bem como, a todos os membros do CAPB, pois se até aqui cheguei muito aprendi com eles;

À amiga, Virgínia Damasceno Alexandre, por ter acreditado em mim, pelo apoio e por tudo que representou e representa até hoje;

À amiga, Amanda Geminiano e sua família (que também é minha), por acreditarem em tudo que eu faço e pelo carinho;

As amigas, Luiza Chaves e Fabíola Oliveira, pelo apoio nos momentos pessoais difíceis, por todo aconselhamento espiritual e pela grande amizade;

Aos amigos de trabalho, Luciano Ribeiro e Viviane Batista, pelo apoio e pelas grandes lições profissionais compartilhadas durante a execução desse trabalho;

As grandes amigas, Lurdimar Cardoso Veras e Andréia Damacena dos Santos, pelos conselhos, pelos ensinamentos, e por todo Amor que sempre tiveram por mim assim como Jesus Cristo as ensinou.

O mais sincero sentimento de gratidão.

RESUMO

A escassez de novas ferramentas para o controle dos agentes microbianos responsáveis por infecções humanas consiste em um grande desafio. Muitas pesquisas têm sido realizadas na busca e caracterização de novas tecnologias que possuam ações antimicrobianas para a criação de modelos promissores de novos fármacos. As Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS), são causadas por uma grande variedade de microrganismos, principalmente, bactérias e em ambientes hospitalares. Entretanto, estas bactérias podem ser encontradas em todos os locais onde há assistência ao paciente, envolvendo sistemas de não internação, como enfermarias, ambulatórios e consultórios, manifestando-se durante a internação ou até mesmo após a alta e podendo se relacionar com a internação ou com procedimentos hospitalares. Neste sentido os nanomateriais constituem um amplo campo de descobertas para novas tecnologias, que possam ser utilizadas como ferramentas para a produção de novos compostos, que possam atuar no controle de infecções hospitalares. Dessa forma, esse trabalho apresenta a síntese de um colóide magnético aquoso ácido (pH=3) à base de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, com diâmetro médio de 9,5 nm, analisado por difração de raios-x e por microscopia eletrônica de transmissão. Esse coloide, também foi utilizado em bioensaios contra bactérias patogênicas e sua atividade antimicrobiana foi avaliada. O colóide, na forma aquosa, não apresentou atividade contra os patógenos *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus*. Diferentemente, o pó de partículas, adquirido após a secagem do colóide, apresentou-se efetivo contra a bactéria patogênica humana *E. coli* e a *S. aureus*. Contudo, os resultados apresentados nesse trabalho mostram o potencial desse material nanoestruturado na produção de uma ferramenta que possa gerar a redução dos danos causados por infecções hospitalares.

Palavras Chave: partículas,colóide, nanomaterial, nanoestruturado, infecções, hospitalares,.

ABSTRACT

The shortage of new tools for the control of microbial agents responsible for human infections consists of a great challenge. Many researches have been conducted in the search and characterization of new technologies that have antimicrobial actions for creating models of promising new drugs. Infections related to Health Assistance (IrHA) are caused by a variety of microorganisms, mainly bacteria in hospital settings. However, these bacteria can be found in all places where there are patient care, involving systems of no hospitalization, as wards, outpatient clinics, manifesting during hospitalization or even after discharge, and may relate to the hospitalization or with hospital procedures. In this sense nanomaterials constitute a wide field for discoveries of new technologies that can be used as tools for the production of new compounds that may act to control nosocomial infections. Thus, this work presents the synthesis of a magnetic colloid aqueous acid (pH = 3) based on nanoparticles $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, with an average diameter of 9.5 nm analyzed by x-ray diffraction and microscopic electron transmission. This colloid was also used in bioassays against pathogenic bacteria and antimicrobial activity was evaluated. The colloid, in liquid form, didn't present activity against the pathogens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Differently, the powder particles, obtained after drying the colloid, was presented as effective against human pathogenic bacteria *E. coli* and *S. aureus*. However, the results presented in this study show the potential of this nanostructured material can generate the possibility of reducing the damage caused by hospital infections.

Keywords: particles, colloid, nanomaterials, nanostructured hospital infections.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	XII
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLO E ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CIÊNCIAS DE MATERIAIS	1
1.2. NANOTECNOLOGIA	4
1.3. MATERIAIS NANOESTRUTURADOS.....	8
1.4. NANOCOLOIDES E FLUIDOS MAGNÉTICOS.....	11
1.5. INFECÇÃO HOSPITALAR.....	13
1.5.1. CONTROLE DA INFECÇÃO HOSPITALAR X RESISTÊNCIA BACTERIANA	17
1.5.2. A RELEVÂNCIA DOS ESTUDOS NESSA PROBLEMÁTICA	20
1.5.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA EM AMBIENTE HOSPITALAR.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

3. NANOPARTÍCULAS E NANOCOÍIDES MAGNÉTICOS À BASE DE FERRITA DE COBALTO - UMA NOVA ESTRATÉIA	28
3.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	28
3.2. SÍNTESE DE FLUIDOS MAGNÉTICOS.....	30
3.3. MODELO CORE-SHELL.....	34
3.4. ESTRUTURA CRISTALINA DAS PARTÍCULAS	35
3.5. ESTUDO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS - X.....	37
3.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	40
3.7. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS FERRITAS E DOS NANOCOÍIDES	41
3.8. FERROFLUIDO O PARAMAGNETISMO GIGANTE	42
4. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	44
4.1. TESTE DISCO – DIFUSÃO.....	44
4.2. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS E NANOCOÍIDES MAGNÉTICOS	46
4.3. BIOENSAIOS E ANÁLISES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Taças de Licurgus em coloração verde (luz refletida) e coloração vermelha (luz transmitida). (http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2008/fd/b800086g).....	1
Figura 2: Imagens obtidas com microscópio eletrônico de alta resolução (HTREM) de nanoparículas de ferro recobertas com carbono. (http://dx.doi.org/10.4321/S0004-06142007000100002).....	7
Figura 3: Imagens de observação microscópica do fenômeno de instabilidade de pico para um Ferrofluido sob a ação de um forte campo magnético aplicado. (http://img265.imageshack.us/img265/7452/3ferrofluido1.jpg)	11
Figura 4 – Composição da composição da membrana em bactérias Gram-negativas.....	12
Figura 5 – Composição da composição da membrana em bactérias Gram-positivas.....	12
Figura 6– Micrografia com comparação esquemática das diferenças entre Gram positiva (A) e Gram – negativa (B).....	14
Figura 7: Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra de bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> utilizada nesse trabalho.....	19
Figura 8: Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra de bactéria <i>Escherichia coli</i> utilizada nesse trabalho.....	23
Figura 9: Diagrama esquemático da síntese de um fluido magnético do tipo EDL-MF.....	28
Figura 10: Representação do modelo Core-Shell: o diâmetro total da partícula (D_{RX}) é fornecido pela soma do diâmetro do núcleo (D_c) mais o dobro da espessura da camada superficial (e).....	30

Figura 11: Estrutura cristalina do tipo Espinélio.....	31
Figura 12: Difratoograma obtido para amostra de ferrita de cobalto.....	34
Figura 13: Microscopia eletrônica da amostra de ferrita de cobalto $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	35
Figura 14: Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.	38
Figura 15a: Ensaio em placa contra <i>Staphylococcus aureus</i> 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Sem medição do halo de inibição.....	40
Figura 15b: Ensaio em placa contra <i>Staphylococcus aureus</i> 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Com medida de halo de inibição.....	40
Figura 16a: Ensaio em placa contra <i>Escherichia coli</i> 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Sem medição do halo de inibição.....	41
Figura 16b: Ensaio em placa contra <i>Escherichia coli</i> 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Com medida de halo de inibição.....	41
Figura 17: Média de tamanho de halo observado para cada amostra contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Este valor representa a média de 5 placas observadas.....	42

Figura 18: Média de tamanho de halo observado para cada amostra contra <i>Escherichia coli</i> Este valor representa a média de 5 placas observadas.....	51
Figura 19: Morfologia celular de <i>Staphylococcus aureus</i> observada usando MEV após 4 horas de incubação sem tratamento	44
Figura 20: Morfologia celular de <i>Escherichia coli</i> observada usando MEV após 4 horas de incubação sem tratamento.....	44
Figura 21: Morfologia celular de <i>Staphylococcus aureus</i> observada usando MEV após 4 horas de incubação com tratamento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	45
Figura 22: Morfologia celular de <i>Escherichia coli</i> observada usando MEV após 4 horas de incubação com tratamento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de categorias de materiais nanoestruturados..... 8

Tabela 2: Principais bactérias causadoras de infecções hospitalares. 14

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURA

a.C.	antes de Cristo
d.C.	depois de Cristo
d	densidade
FF	Ferrofluido
FM	Fluido Magnético
EUA	Estados Unidos da America
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Metilicina
PNSSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Não Susceptível à Penicilina
VRE	Enterococos Resistente à Vancomicina
ESBL	Enterobacteriaceae Produtoras de Beta-Lactamase de Espectro Ampliado
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
EPI's	Equipamento de Proteção Individuais
AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida.
ATCC29213	Linhagem de células bacterianas <i>S. aureus</i>
ATCC8739	Linhagem de células bacterianas <i>E. coli</i>
NASA	National Aeronautics and Space Administration
pH	Potencial de hidrogênio
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão.
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura.
D_c	diâmetro do núcleo no contexto do modelo “Core-Shell”
d_{RX}	diâmetro médio das nanopartículas determinado por difratometria de raios X
β	largura a meia altura do pico de difração mais intenso
λ	comprimento de onda da radiação incidente
K	constante relacionada à geometria das partículas
d_{RX}^{calc}	diâmetro de raios X calculado

1. Introdução

1.1 - Ciências de Materiais:

A Ciência de materiais é o ramo da ciência que realiza investigações nos materiais, bem como, a relação entre as suas propriedades, estruturas, performances, formas de caracterização e processamento. Cada processamento pode modificar a estrutura do material, o que poderá gerar uma alteração de suas propriedades, que por sua vez delimitam o seu desempenho¹.

Considerando os processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem na Natureza, é possível identificar a presença da nanotecnologia em períodos remotos da história da humanidade. Há aproximadamente 4000 anos a.C., os alquimistas egípcios utilizavam o “elixir de ouro” para estimular a mente e restaurar a juventude¹. O famoso “elixir da longa vida”, era constituído na realidade por partículas de ouro em suspensão com tamanho da ordem de 1-100 nm. Os chineses, mesmo sem consciência desse fato, já aplicavam a nanotecnologia, ao empregarem nanopartículas de carvão em solução aquosa para produzir a tinta nanquim¹.

Na Europa, o colorido dos vitrais das igrejas medievais, produzidos pelos artesões, era o resultado da formulação do vidro com nanopartículas de ouro. A famosa “Taça de Licurgus”, do século IV d.C., que exhibe uma cor verde quando a luz é refletida, mas é vermelha sob luz transmitida, é na realidade constituída por nanopartículas de ouro e prata¹(Figura 1).

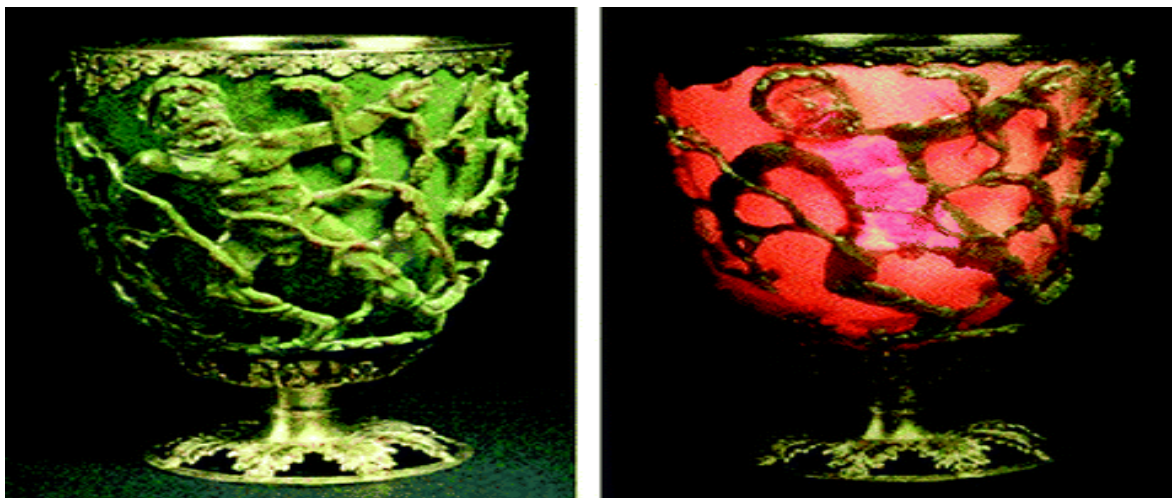


Figura 1- Taças de Licurgus em coloração verde (luz refletida) e coloração vermelha (luz transmitida).

(<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2008/fd/b800086g>)

No século XIX, Michael Faraday demonstrou a relação entre as propriedades e o tamanho de partículas de ouro e observou que o tamanho influenciava na capacidade de absorção de luz. Sendo assim, era possível obter diversas cores em material a base de ouro, dependendo do tamanho das partículas. Na sua forma natural, o ouro possui uma coloração amarelada, contudo, dependendo do tamanho das partículas, ele poderá se mostrar negro, rubi ou arroxeadado².

Logo depois desse período, os tratamentos térmicos e outros processos tiveram grande importância para o estudo dos materiais. Durante o feudalismo no Japão, a fabricação das espadas japonesas, produzidas de maneira manual através de um processo demorado e detalhista, davam a um guerreiro Samurai grande *status* e poder³. Assim também na Europa, onde a produção de armaduras de combate com a técnica correta de temperatura evitava grandes deformações ou a total inutilização da peça em si. O domínio dos metais, através das técnicas do emprego da temperatura possibilitou a fabricação de armas de material bélico que poderiam destruir grandes civilizações, fornecendo então domínio e poder³.

Uma visão atômica dos materiais só se tornou possível quando a Física deixou de ser considerada um conjunto de ciências separadas (ciência mecânica, do calor, do eletromagnetismo, do som, da luz, etc.) e passou a enfatizar as leis da conservação, os conceitos de campos e ondas e ao fazer parcerias fundamentais com a Química, Biologia e Engenharia. Toda essa interação gerou então grandes investigações nessa área criando então esse ramo da ciência conhecido como Ciência de Materiais⁴.

A área de Ciência de Materiais vem apresentando um desempenho notório nos últimos anos. O que pode ser comprovado pela alta taxa de produção científica na área.

Observou-se que a área de Ciência dos Materiais cresceu cerca de 34%, no período entre 2003 à 2009, em produção científica, enquanto o crescimento observado em outras áreas do conhecimento foi inferior a 26%. Na América Latina, por exemplo, a área de Ciência de Materiais cresceu 39% no mesmo período e no Brasil aproximadamente 41%².

Dessa forma, observa-se que a região do mundo que era sempre caracterizada pela produção intensiva de matéria-prima tem, recentemente, progredido, de maneira cientificamente significativa, na compreensão, desenvolvimento e otimização de materiais convencionais e também na produção de novos².

1.2 - Nanotecnologia:

A nanotecnologia teve seu surgimento no final do século XX como uma renovada promessa de obtenção de rápidos avanços que poderiam trazer profundos impactos nas mais diversas áreas da sociedade humana⁵.

Ainda sim, vários outros conceitos surgiram com o passar do tempo e com desenvolvimento de novas ferramentas em nanotecnologia. O físico Richard Feynman, em 1959, trouxe um conceito amplo para a nanotecnologia referindo se a ela como a ciência que envolve a manipulação dos átomos como forma de construir novos materiais, ou seja, a ciência que determina a manipulação da matéria em escala nanométrica, já que nesta escala os átomos revelam características peculiares podendo apresentar novas propriedades como: resistência à temperatura, cores diversificadas, reatividade química, condutividade elétrica dentre outras^{6 7 8 9}.

De fato, a capacidade técnica de manipular a matéria na dimensão de seus átomos e moléculas está revelando, de maneira inovadora, novas propriedades de materiais já conhecidos, e isso permite a construção de novos compostos e dispositivos, onde as aplicações estão ligadas com as mais diferentes áreas do conhecimento e pretendendo incrementar toda a produção tecnológica atual: fármacos, eletrônicos, vestuários, etc⁶.

Do ponto de vista atual sobre este conceito, pode se observar que:

“Os termos nanociências e nanotecnologias se referem, respectivamente, ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros. Nano (do grego “anão”) é um prefixo usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão e, assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro [...] “Nano”, portanto, é uma medida e não um objeto”. (Lêdo, 2006, p. 1)¹⁰.

O papel fundamental adquirido pela nanotecnologia tem sido bastante significativo, o que permitiu o desenvolvimento de novos métodos e técnicas, já com aplicabilidade em diferentes procedimentos industriais - produção de alimentos, cosméticos, fármacos, tecidos, dentre outros de um modo extremamente singular:

“A proposta central da nanotecnologia é assim a de montar, a partir da manipulação individual de átomos e moléculas, dispositivos moleculares milhares de vezes menores que um fio de cabelo, capazes de construir outros dispositivos e máquinas, encaixando moléculas uma a uma, com uma precisão e eficiência impressionantes, e a um custo reduzido já que a matéria-prima - os átomos - afinal existe em abundância na natureza...”(Oliveira, 2002, p. 209)¹¹

O termo nanotecnologia foi descrito e introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala ¹². Entretanto, o significado do termo na atualidade se aproxima mais da formulação de Eric Drexler, que corresponde à metodologia de processamento envolvendo a manipulação átomo a átomo¹².

Sendo resultado da interação das grandes áreas do conhecimento, tais como, a Física Quântica, Biologia Molecular, Eletrônica, Química e Engenharia de Materiais, a nanotecnociência tem como objeto de estudo as propriedades dos materiais quando manipulados em nível atômico e molecular, possibilitando a alteração de como cor, condutividade elétrica, resistência e dureza em relação às amostras macroscópicas.

Tais propriedades são objeto de interesse das mais diversas áreas do conhecimento. Seu uso parece ser ainda mais promissor para os ramos da saúde, nas quais se anuncia a possibilidade de cirurgias menos invasivas e mais eficazes e medicamentos com maior especificidade no tratamento de determinadas doenças.

Por outro lado, a nanociência constitui o estudo do fenômeno e da manipulação de sistemas físicos que gerem informações quanto às diferenças perceptíveis, em uma escala chamada de nano (10^{-9} m= 1 nm) com comprimentos típicos que não excedam 100 nm em pelo menos uma direção.

Portanto, a nanotecnologia foca o projeto, caracterização, produção e aplicação de sistemas e componentes em nanoescala¹².

As pesquisas sobre aspectos técnicos e científicos da nanotecnologia recebem diversos investimentos e uma quantidade grande de produtos já chegam ao mercado com um valor mais acessível em várias áreas como a farmacêutica, têxtil, eletrônica entre outras.

De maneira histórica, com a real promessa de grandes avanços e investimentos que acompanham a nanotecnologia, surgiram uma série de áreas denominadas como “nano”, indicadas pelos termos nanobiotecnologia, nanofísica, nanoquímica, nano-óptica, nanoeletrônica, nanorrobótica e nanomedicina¹³ que se referem a áreas tradicionais de conhecimento, mas incorporam materiais e dispositivos manipulados nanometricamente às suas práticas, com o objetivo de se beneficiar das novas propriedades. Em particular, termos como nanoeconomia, nanodireito e nanoética indicam uma potencial transformação de conhecimentos, práticas, instituições ferramentas normativas, após a incorporação da nanotecnologia em nosso cotidiano¹³.

Entretanto, alguns conceitos, como nanopartículas, nanomateriais, materiais nanoestruturados e materiais nanoengenheirados, merecem atenção especial. As “nanopartículas” são partículas em que ao menos uma das dimensões é nanométrica, ou seja, ao menos uma das dimensões tem um tamanho entre 1nm a 100nm, que corresponde às estruturas atômicas e moleculares. Estas nanopartículas não são necessariamente produtos da ação humana e se encontram naturalmente dispersas no meio ambiente, como por exemplo, partículas de poeira.

Já os chamados “nanomateriais”, “materiais nanoestruturados” ou “materiais nanoengenheirados” são na maioria das vezes sintetizados pelo homem. (Figura 2)

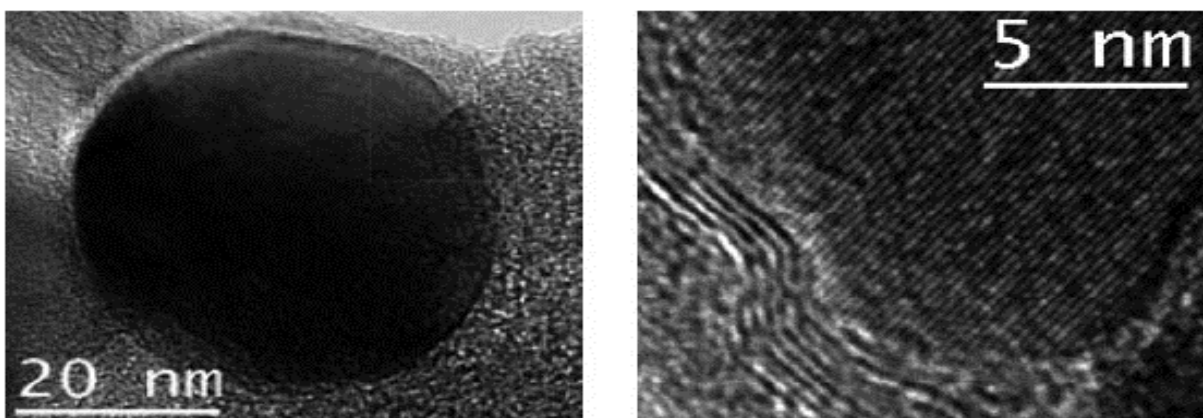


Figura 2 – Imagens obtidas com microscópio eletrônico de alta resolução (HTREM) de nanopartículas de ferro recobertas com carbono.(<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-06142007000100002>)

1.3 - Materiais Nanoestruturados:

Materiais nanoestruturados consistem em blocos microscópicos ou macroscópicos de um material que, durante seu processo de fabricação, sofreu algum tipo de estruturação ou manipulação em nível nanométrico. Eles podem ser utilizados para construir uma diversidade de produtos e dispositivos mais ou menos complexos, conhecidos por sua vez como nanoproductos e nanodispositivos, respectivamente.

Esses materiais apresentam, pelo menos em uma dimensão, o tamanho na ordem de nanômetros, sendo estruturalmente caracterizados por uma grande fração volumétrica de contornos de grãos ou interfaces, as quais podem alterar de forma significativa uma variedade de propriedades físicas e químicas quando comparados aos materiais cristalinos convencionais. Essas variações nas propriedades resultam do tamanho reduzido, forma dos cristalitos, baixa densidade ou número de coordenação nas interfaces entre os elementos estruturais¹⁴.

A Tabela 1 mostra as três categorias nas quais os materiais nanoestruturados podem ser divididos¹⁴.

Tabela 1 - Tipos de categorias de materiais nanoestruturados.

Categorias	Definição	Técnicas de obtenção
1 ^a	Materiais com dimensões reduzidas ou dimensionalmente na forma de nanopartículas, fios, fitas ou filmes finos.	<ul style="list-style-type: none">• Deposição química ou física de vapor;• Condensação de gás inerte;• Micela reversa.
2 ^a	Materiais em que a estrutura é limitada por uma região superficial fina do volume do material.	<ul style="list-style-type: none">• Deposição química ou física de vapor;• Irradiação a laser.
3 ^a	Consiste de sólidos volumétricos com estrutura na escala de nanômetros.	<ul style="list-style-type: none">• Misturas mecânicas;• Deposição química ou física de vapor.

Desde as primeiras utilizações em meados da década de 80 até os dias de hoje, diversas novas técnicas estão sendo desenvolvidas para produção de nanoestruturas, sejam em forma de nanofilmes, nanopartículas (compactas ou dispersas) e sistemas de controle da matéria em nível atômico e molecular, com a finalidade de criar novas propriedades em relação ao material de origem ampliando assim suas aplicações^{15 16}.

A síntese de nanoestruturas pode ser realizada por meio de diversos processos em fase líquida, vapor ou sólida. Contudo, o primeiro passo nessas sínteses é a escolha de um método com grau de produtividade e que possibilite a obtenção de diferentes materiais de maneira controlada¹⁵. Assim, os materiais nanoestruturados utilizados para aplicação industrial são aqueles que podem ser sintetizados em baixas temperaturas e processados em diferentes formas e maneiras dando um bom desempenho.

Dentre as grandes áreas do conhecimento, a utilização de nanoestruturados vem se tornando cada vez mais frequente e trazem um destaque para os seguintes ramos: nanobiotecnologia, nanofármacia e a nanoeletrônica¹⁵. Essas áreas produzem uma grande diversidade de nanomateriais, tais como: derivados do carbono, derivados metálicos e polímeros; suas aplicações são muito amplas, desde a síntese de componentes eletrônicos, até agentes terapêuticos e produtos para tratamento específico do solo¹⁷.

Com intuito de analisar a capacidade tóxica de determinadas nanopartículas, surgiu o campo da nanotoxicologia. Diversas pesquisas nesta área, ainda em seu início, têm demonstrado que a diminuição da dimensão torna os compostos quimicamente mais reativos, o que acelera a disseminação das partículas em solução. Adicionalmente, o tamanho das partículas facilita sua passagem pelas membranas celulares e outras membranas intracelulares, como a nuclear. Já no conteúdo citoplasmático, as partículas podem interagir e, até mesmo, hibridizar com estruturas subcelulares, como microtúbulos e o DNA¹⁷.

Contudo, há indícios de respostas fisiológicas intensificadas e patológicas à presença de determinadas nanopartículas, quando estas são colocadas em comparação com partículas que não sofreram o mesmo processo de síntese e estruturação. Foram relatados efeitos como aumento da resposta inflamatória, fibrose, reações alérgicas, genotoxicidade, efeitos carcinogênicos e, em estudos preliminares em cobaias, foram afetadas as funções do sistema cardiovascular e linfático¹⁷.

O grau de toxicidade de determinadas nanopartículas e dos materiais nanoestruturados depende da interação de diversos fatores, entre eles, o tamanho, a concentração, o tempo de exposição, o estado de saúde e características exclusivas e peculiares de cada organismo que está em contato com esse tipo de material¹⁷.

1.4 – Nanocolóides e Fluidos Magnéticos

Um dos materiais nanoestruturados que vem se destacando dentro do cenário promissor da nanotecnologia são os colóides. O termo colóide é oriundo do grego *kólla*, cola+ *eidós*, forma⁴. Colóides são misturas heterogêneas que apresentam, pelo menos, duas fases distintas. Esse material pode ser, de maneira simplificada, descrito como uma mistura de partículas nanométricas dispersas em um líquido carreador⁴. De maneira descritiva, os colóides são dispersões de partículas (fase dispersa, $1\text{nm} < d < 1\mu\text{m}$) em um solvente (fase de dispersão)⁴.

A utilização dos colóides pela humanidade é datada muito antes da implementação da ciência moderna. Um exemplo clássico é a utilização da tinta Nanquim na China desde o século IV a. C., pois era composta por partículas nanométricas de carvão suspensa em água⁴. Uma categoria de nanoestruturados inteligentes, como os colóides, que vem ganhando importante destaque nas últimas décadas são os Fluidos Magnéticos (FM), também conhecidos como Ferrofluidos (FF)(Figura 3).

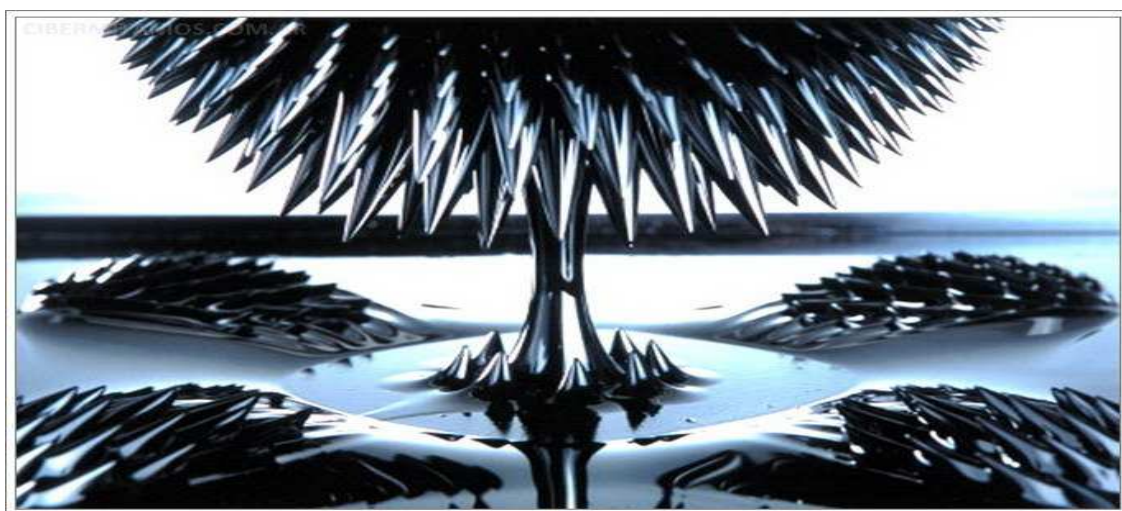


Figura 3 – Imagens de observação microscópica do fenômeno de instabilidade de pico para um Ferrofluido sob a ação de um forte campo magnético aplicado. (<http://img265.imageshack.us/img265/7452/3ferrofluido1.jpg>)

Os FM são dispersões coloidais estáveis de nanopartículas magnéticas (geralmente ferritas) em um líquido carreador¹⁸.

Na natureza não encontramos fluidos homogêneos com propriedades ferromagnéticas. As propriedades magnéticas sempre estiveram relacionadas a certos materiais, como o ferro no estado sólido, por exemplo. A ideia de um líquido magnético não é recente, mas permanece sendo amplamente estudada¹⁹.

Dentre diversas aplicações, podemos citar tintas, selos e juntas magnéticas²⁰, alto-falantes, vetorização de drogas, separação de células, diagnóstico por imagem, tratamento de alguns tipos de câncer por hipertermia²¹, além de diversas outras aplicações na área de ciência e tecnologia: da indústria à medicina²².

Nessa aplicação da área médica, os avanços se mostram ainda mais promissores com a utilização em marcação de células²², vetorização de drogas²³ e na utilização contra microrganismos patogênicos.

1.5- Infecção Hospitalar:

As bactérias são parte integral e inseparável da vida no planeta Terra. Elas são encontradas em vários ecossistemas terrestres e aquáticos, tanto de forma livre quanto associadas a outros seres vivos.

A maior parte das bactérias são inócuas aos seus hospedeiros, enquanto que algumas encontram-se em estado de simbiose, trazendo assim benefícios para seu hospedeiro, fornecendo nutrientes ou proteção contra patógenos, predadores e doenças e, limitando a habilidade de colonização de bactérias nocivas.

A alta taxa de replicação das bactérias, associada à grande quantidade de indivíduos por população e aos mecanismos de transmissão de genes intra e inter espécies, possibilita as bactérias uma grande capacidade de resposta as mudanças ambientais²⁴. Assim, quando certos antibióticos são introduzidos no ambiente, mecanismos de pressão seletiva tendem a favorecer indivíduos com resistência natural, gerando em pouco tempo populações resistentes²⁴.

Aproximadamente, 70 anos se passaram desde a utilização dos primeiros antibióticos, de forma que o desenvolvimento de resistência bacteriana tem se tornado um dos grandes desafios da medicina moderna. Além de causar importantes surtos em ambientes relacionados a serviços de saúde, estas bactérias tem sido encontradas também em ambientes comunitários²⁵. Dessa forma, segundo a Organização Mundial da Saúde, agentes antimicrobianos tornam-se ferramentas essenciais para a saúde e o bem-estar dos seres humanos e isso, de fato, é uma preocupação mundial.

A infecção hospitalar, também conhecida como nosocomial, tem como definição ser uma reação patológica causada por microrganismos provenientes de ambientes hospitalares durante a internação ou após a alta do paciente^{26 27} representa, como descrito acima, um importante problema de saúde pública mundial. A infecção hospitalar pode ser adquirida não apenas por pacientes, que apresentam maior susceptibilidade, mas também, embora menos frequentemente, por visitantes e funcionários do próprio hospital²⁸.

A *Infectious Diseases Society of America* relatou em 2004²⁹ que, nos hospitais americanos, aproximadamente 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias anualmente, e que, aproximadamente 4,5% desses casos levam o paciente a óbito. Uma das principais causas da intensidade dessas infecções é a resistência bacteriana que é crescente tanto países emergentes como nos já desenvolvidos^{35 36 37}.

1.6- Classificação das bactérias – Coloração de Gram:

O bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, realizou estudos e descreveu a técnica para corar bactérias para facilitar a análise de microscopia desses microrganismos, essa técnica recebeu o nome decoloração Gram no ano de 1884. De forma experimental, corou lâminas com esfregaço com violeta de genciana e percebeu que se as bactérias existentes nestes esfregaços uma vez coradas não perdiam a coloração adquirida com álcool, se previamente fossem tratadas com iodo³⁰.

Após o aprimoramento da o metodologia, adicionou ainda outros corantes denominados “contra-corantes”, tais como: safranina e fucsina básica³⁰.

Após essa comprovação científica as bactérias foram também classificadas como Gram-positivas (aproximadamente de cor roxa) ou Gram-negativas (aproximadamente de cor vermelha), isto dependerá da parede celular da bactéria. Se for estruturalmente simples a coloração será positiva, se for estruturalmente complexa a coloração será então negativa³⁰.

Bactérias Gram-negativas são aquelas que apresentam uma membrana em dupla camada, que consiste em uma membrana interna que é rica em fosfolipídios e uma membrana externa que é rica em fosfolipídios e lipopolisacarídeos (LPS). Existe também um espaço chamado de periplasmático que separa essas membranas e contém peptidoglicanos. Vários grupos de proteínas estão associados a essas membranas, como as porinas, associadas à membrana externa, a qual permite a passagem de nutrientes; as lipoproteínas, associadas a também a membrana externa por uma calda lipídica na subunidade N-terminal; as proteínas integrais, que atravessam a membrana externa em várias regiões; as periplasmáticas; e as associadas à membrana interna, envolvidas com ligação a ATPs, transporte de íons e pequenas moléculas²⁹. As bactérias Gram-negativas produzem uma diversidade de polissacarídeos. Entre esses, o LPS bem como os polissacarídeos exo e o capsular- (PSs) são particularmente importantes para sua interação com o sistema imune do hospedeiro. Contudo, esses polissacarídeos são diferenciados quanto à suas localizações na parede celular bacteriana e por suas funções.

Enquanto LPSs estão ancorados na membrana bacteriana externa de Gram-negativas através de sua camada lipídica e atuam como moléculas padrão associadas ao patógeno, estimulando a resposta do hospedeiro, PSs são liberados no meio extra celular e podem formar barreiras físicas (biofilmes e estruturas capsulares), as quais favorecem a evasão da resposta imune do hospedeiro³⁰.

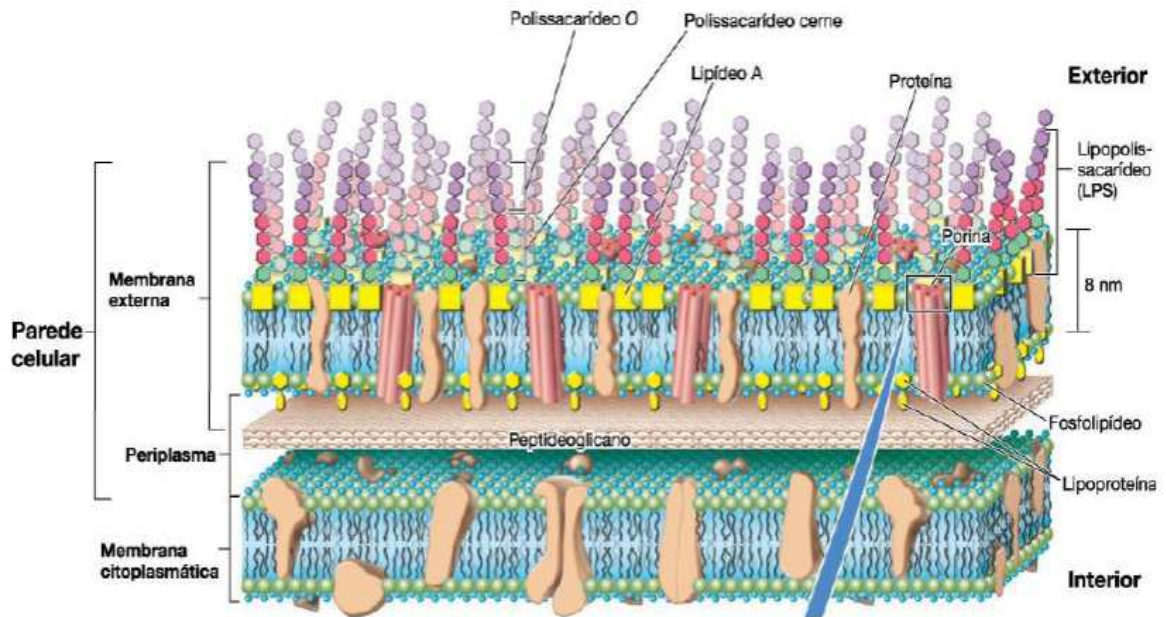


Figura 4 – Composição da composição da membrana em bactérias Gram-negativas.

Bactérias Gram-positivas são aquelas que apresentam uma composição singular em sua parede celular, a qual se baseia em mureína e peptidoglicanos, formando um arcabouço composto por alternância de N-acetil-glicosamina e ácido N-acetilmurâmico^{29 31}, onde se encontra ligado o ácido teicoico. Este ácido pode facilitar a ligação e a regulação de entrada e saída de cátions nas células e regular a atividade das autolisinas durante o processo de divisão celular³².

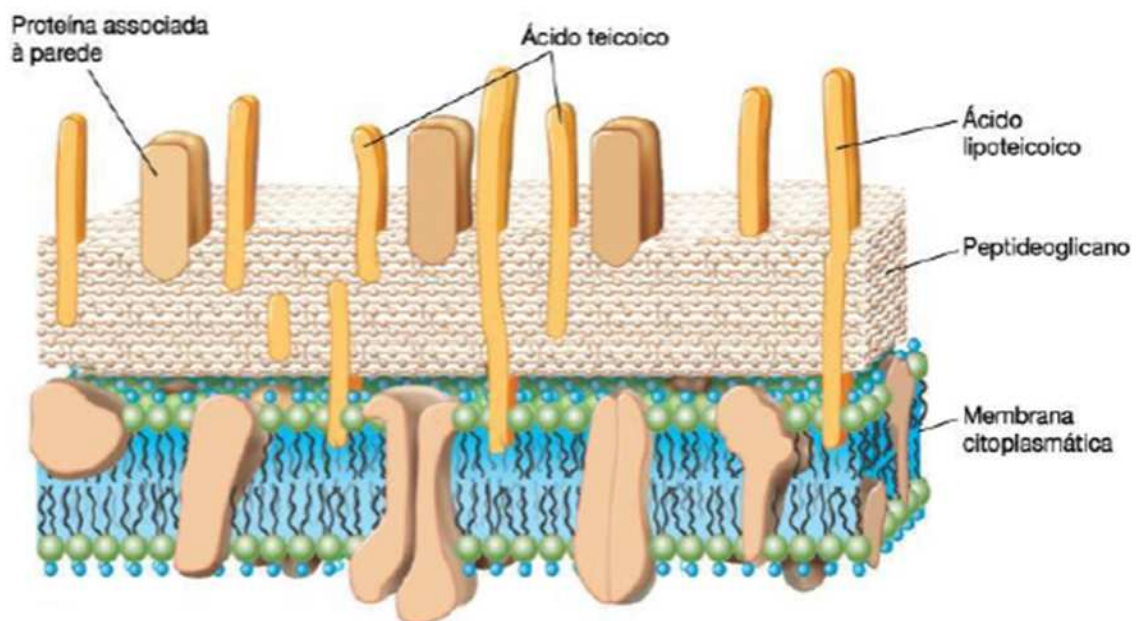


Figura 5 – Composição da composição da membrana em bactérias Gram-positivas.

Estas diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são características determinantes na resistência ou susceptibilidade à entrada de um determinado antibiótico no interior da célula. No século XVIII, começaram os relatos envolvendo LPS, a partir da busca por substâncias produtoras de febre e doenças, as quais estariam associadas a condições anti-higiênicas. LPS foi referido inúmeras vezes como sendo parte de um material pirogênico, veneno pútrido e toxina. Somente em 1892, LPS foi classificado como endotoxina, com sua identificação em *Vibrio cholerae*. LPS tem como caracterização estrutural sua natureza anfipática e forte tendência a formar agregados, o que dificulta a determinação da sua massa molecular. LPS é constituído por três regiões as quais são, em ordem a partir da membrana, um lipídeo (chamado lipídeo A) ligado a uma região central de aproximadamente 10 oligossacarídeos, que por sua vez está ligado a um glicosídeo, constituído de subunidades repetitivas, chamado cadeia-O ou antígeno-O específico.

A estrutura do LPS se dirige para fora da superfície da bactéria, estendendo-se até 10 nanômetros da superfície³². Embora secretadas pelas células, pequenas quantidades de LPS são liberadas no meio sob algumas condições, como divisão celular. Porém, como bactérias Gram-negativas crescem em alta densidade na circulação sanguínea, grandes quantidades de LPS são liberadas rapidamente quando a bactéria é destruída por antibióticos, fagócitos ou pelo tratamento com quelatos de cátions divalentes^{33 34}. No hospedeiro infectado, pequenas quantidades de LPS podem ser protetoras, por estimular o sistema imune, tendo sido usadas, por exemplo, para a diminuição de tumores. Entretanto, grandes quantidades de LPS induzem à resposta exacerbada do sistema inflamatório, à febre elevada, ao aumento da frequência cardíaca, além de conduzir ao choque séptico e à morte pela falha dos pulmões e rins, e coagulação intravenosa³³.

A figura 6 apresenta uma micrografia com comparação esquemática das diferenças entre Gram – negativas e Gram positivas.

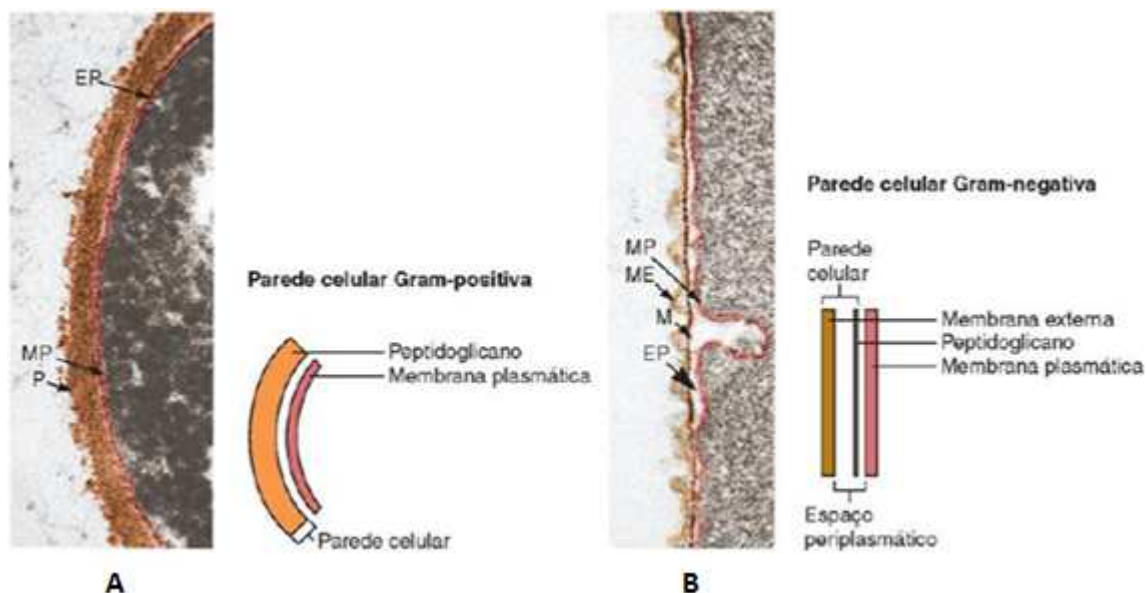


Figura 6–Micrografia com comparação esquemática das diferenças entre Gram positiva (A) e Gram – negativa (B)

O quadro de emergência mundial, referente à infecção hospitalar, é cada vez mais agravado pelo uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos disponíveis, onde se incluem frequentes prescrições inadequadas, dosagens inferiores à necessária e baixa qualidade da formulação terapêutica. A alta parcela de contribuição nesse quadro também é devida à baixa adesão aos programas de tratamento, onde é frequente a ocorrência de abandono do tratamento ou mesmo o uso intensivo e prolongado dos agentes³⁷.

No Brasil, segundo os dados descritos por pesquisas realizadas pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA²⁷, a taxa média de infecção hospitalar é de cerca 15%, ao passo que nos EUA e na Europa é de 10%.

Diferentes microrganismos como bactérias e os fungos, podem ser causadores de infecções hospitalares. Os fungos são responsáveis por, aproximadamente, 8% das infecções hospitalares. Já as bactérias, com grande capacidade mutagênica, são responsáveis por, aproximadamente, 87% dos casos desse tipo de infecção²⁷.

Os patógenos que lideram no ranking das infecções hospitalares estão descritos na Tabela 2(ANVISA, 2004) 27.

Tabela 2 – Principais bactérias causadoras de infecções hospitalares.

Patógeno	Sítios comuns de isolamento do patógeno
Bactérias Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Klebsiella sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus sp.</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Serratia sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
Bactérias Gram-positivas	
<i>Streptococcus sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
Fungi	
<i>Cândida albicans</i>	Trato urinário, sangue
Outros	Trato urinário, sangue, trato respiratório

Por fim, o excesso de produtos antimicrobianos comuns (artigos de limpeza, esponjas, chinelos e até tábuas de carne com produtos antibacterianos) acaba promovendo uma alta pressão seletiva. Conseqüentemente, ocorre uma maior propagação de patógenos multirresistentes em hospitais, em outros centros que realizam cuidado à saúde da população, levando a séria limitação quanto à escolha dos antibióticos adequados para o tratamento, especialmente em pacientes em estado de saúde crítico.

Assim, a resistência a medicamentos é o maior sinal de debilidade no tratamento de doenças infecciosas graves^{35 36 37 38 39}, consistindo em um grande desafio que requer uma ação multidisciplinar e um esforço comum envolvendo todas as unidades de saúde públicas e privadas, bem como os grandes centros de pesquisas nessa área⁴⁰.

A resistência aos antibióticos é como uma consequência natural advinda da capacidade bacteriana de se adaptar. O uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade da bactéria ser exposta aos mesmos. Por meio dos processos de seleção, a aquisição de mecanismos de resistência é facilitada³⁶.

Desta forma, a resistência aos antibióticos é inevitável e irreversível, por ser uma consequência natural da adaptação da célula bacteriana a exposição aos antibióticos. O uso intenso de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais e na agricultura tem causado um aumento na resistência àquelas drogas em todo mundo³⁶.

Na Europa e na América do Norte, *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* Não Susceptível à Penicilina (PNSSP), Enterococos resistente à Vancomicina (VRE) e Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de Espectro Ampliado (ESBL) têm emergido e se espalhado nos hospitais e nas comunidades³¹.

Esta problemática tem intensificado estudos na busca de viabilizar efetivamente, junto aos profissionais de saúde entre eles, médicos e enfermeiros, o uso correto e eficaz das medidas de controle da infecção hospitalar - como a lavagem das mãos - como também conscientizá-los da importância e necessidade do uso prudente de antibióticos como medida para minimizar a emergência de bactérias antibiótico-resistentes no ambiente hospitalar.

1.6.1 - Controle da infecção hospitalar X resistência bacteriana:

A proliferação de bactérias antibiótico-resistentes ocorre tanto no ambiente hospitalar como na comunidade. Hospitais, principalmente, os que possuem centros de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), centros cirúrgicos, unidades de pediatria, berçário neonatal, clínica médica e/o cirúrgica, em que os pacientes são tratados com uma variedade de antibióticos, representam um "habitat" que pode abrigar uma diversidade de bactérias. Estas, de maneira eventual, podem adquirir um certo grau resistência a certas drogas ao qual estão frequentemente expostas⁴⁵.

Alguns fatores que influenciam a seleção de bactérias antibiótico-resistentes incluem o estado imunológico do paciente, o número de bactérias no sítio de infecção, o mecanismo de ação do antibiótico e o nível da droga que atinge a população bacteriana.

Em meados de 1990, as sucessivas implementações da terapia anti-infectiva têm se tornado cada vez mais difícil por causa da disseminação da resistência bacteriana, da emergência de novos patógenos e a decorrência de infecções em pacientes imunodeprimidos, nos quais as drogas antimicrobianas tornaram-se menos efetivas²⁵.

O impacto das bactérias resistentes é mundial e representa uma ameaça para a humanidade. É um grave problema de saúde pública, de grande amplitude médica-social, cujas consequências, já estão sendo vivenciadas em nosso cotidiano e, se não forem contidas, em um futuro bem próximo, poderão ser ainda mais devastadoras para a humanidade.

De forma histórica, a infecção hospitalar é uma problemática muito antiga, que surgiu quando os primeiros estabelecimentos ligados à saúde foram instituídos no século 325 d. C. Estes tinham o objetivo de albergar pessoas doentes e tratá-las. Contudo, mesmo na sociedade antiga, como na atual, esse tipo de infecção sempre causou um grande impacto e preocupações à saúde pública, justamente, por trazer uma diversidade de problemas à saúde humana, bem como também, uma taxa elevada óbitos³⁰.

O desenvolvimento de procedimentos para a melhoria das condições sanitárias e nas práticas de higiene realizadas como procedimentos necessários nos hospitais, ocorridas no final do século XIX, reduziram de maneira eficiente as taxas de infecção hospitalar⁴⁸.

Todas estas medidas utilizadas, introduzidas nos hospitais, naquele século XIX, mostraram que elas eram importantes e muito eficazes na prevenção e controle da infecção hospitalar. Nos anos seguintes, estas técnicas assépticas foram implementadas com outras inovações, como, o uso de luvas, uso do calor (esterilização) para destruir certos microrganismos, e tornar estéreis instrumentos cirúrgicos, aventais, propés, gorros e máscaras⁴⁸.

Todos estes acessórios, chamados de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) mais o conjunto de medidas de assepsia e de antissepsia, deveriam ser utilizados amplamente nos centros cirúrgicos e demais setores de hospitais no intuito de reduzir ao máximo as taxas de infecção.

O atual controle da infecção hospitalar está fundamentado no trabalho de Ignaz Semmelweis, quando, em 1847, demonstrou a importância da lavagem das mãos para o controle da transmissão da infecção nos hospitais. No entanto, por aproximadamente um século, os esforços para controlar a infecção hospitalar foram de qualidade irregular.

Já no início do século XX, uma das mais importantes descobertas científicas, na área médica, que contribuiu para o controle das infecções bacterianas, foi a da penicilina, antibiótico utilizado no período da segunda guerra mundial e, posteriormente, seguido pela descoberta de outros antibióticos⁴⁸.

O que de fato eleva a curiosidade de muitos pesquisadores dessa linha de pesquisa é que em pleno século XXI e, com todo avanço tecnológico, a infecção hospitalar continua sendo ainda causa de altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo⁴⁸.

Contudo, a resistência bacteriana, em consequência ao uso indiscriminado dos antibióticos e outros fatores, é um grave e importante problema nos hospitais. Hoje, pode se relacionar três principais pontos que estão envolvidos, diretamente, nas causas das infecções hospitalares.

O primeiro ponto é o uso excessivo de antimicrobianos nos hospitais. O segundo ponto é que muitos profissionais de saúde falham em não adotar as medidas básicas de controle de infecção hospitalar, tais como a lavagem das mãos e uso correto de medicamentos. O terceiro é constituído por pacientes hospitalizados que têm sistema imunológico deprimido por algum motivo patológico, e que eventualmente passam muito tempo no ambiente hospitalar⁴⁸.

1.6.2– A relevância dos estudos nessa problemática:

A cada ano, aproximadamente, do total de internações, dois milhões resultam em infecção hospitalar³¹.

Pesquisas demonstraram que as infecções atribuídas a bacteriemia adquiridas neste ambiente aumentaram o tempo da permanência do paciente na UTI por um período de 8 dias e, o tempo de hospitalização por 14 dias, sendo que as bacteriemias foram responsáveis por uma taxa de mortalidade de ordem de 35%⁴⁸. Também foi observado que as infecções de feridas cirúrgicas, adquiridas nos hospitais, aumentam a permanência do paciente na instituição hospitalar em média 7 dias, além de também aumentar as chances de óbito⁴⁸.

O grande sucesso da penicilina, no controle das infecções causadas por "bactérias Gram - positivas", levou à falsa concepção de que os antibióticos poderiam controlar e, eventualmente, erradicar todas as doenças infecciosas, porém aparecimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, resistente à penicilina, na metade desse século, levou a uma trágica epidemia hospitalar em nível mundial. Esta bactéria infectava, com frequência, pacientes internados nas unidades cirúrgicas e de tratamento intensivo⁴⁸. Desta forma, todo aquele entusiasmo referente à descoberta da penicilina foi substituído de maneira rápida pelo desencanto diante do número subitamente crescente de amostras bacterianas que, rapidamente, adquiriram resistência aos antibióticos.

Atualmente, entre os patógenos clinicamente importantes, são reencontradas diversas linhagens para diferentes antibióticos comerciais. Este fato é assustador, especialmente no ambiente hospitalar.

Entre 1990 a 1996, nos Estados Unidos, o *S. aureus* foi o mais comum agente causador das infecções hospitalares, conforme relato do Sistema Nacional de Vigilância de Infecção Hospitalar, daquele país, sendo o líder das pneumonias hospitalares e das infecções de feridas cirúrgicas e é considerada a segunda causa de bacteriemias hospitalares.

No Brasil, também, o cenário da resistência bacteriana é preocupante. O crescente surgimento de novas cepas de bactérias resistentes nos hospitais brasileiros vem causando preocupações entre os profissionais dessa área.

A grande problemática envolvendo a resistência do *S. aureus* à meticilina foi descrita pela primeira vez, nos anos 60, tornando-se prevalente desde 1980. Estes microrganismos são endêmicos em muitos hospitais, e mesmo epidêmicos em alguns, geralmente sendo resistentes em 30%, de todas as infecções causadas por *S. aureus* (Figura 4):

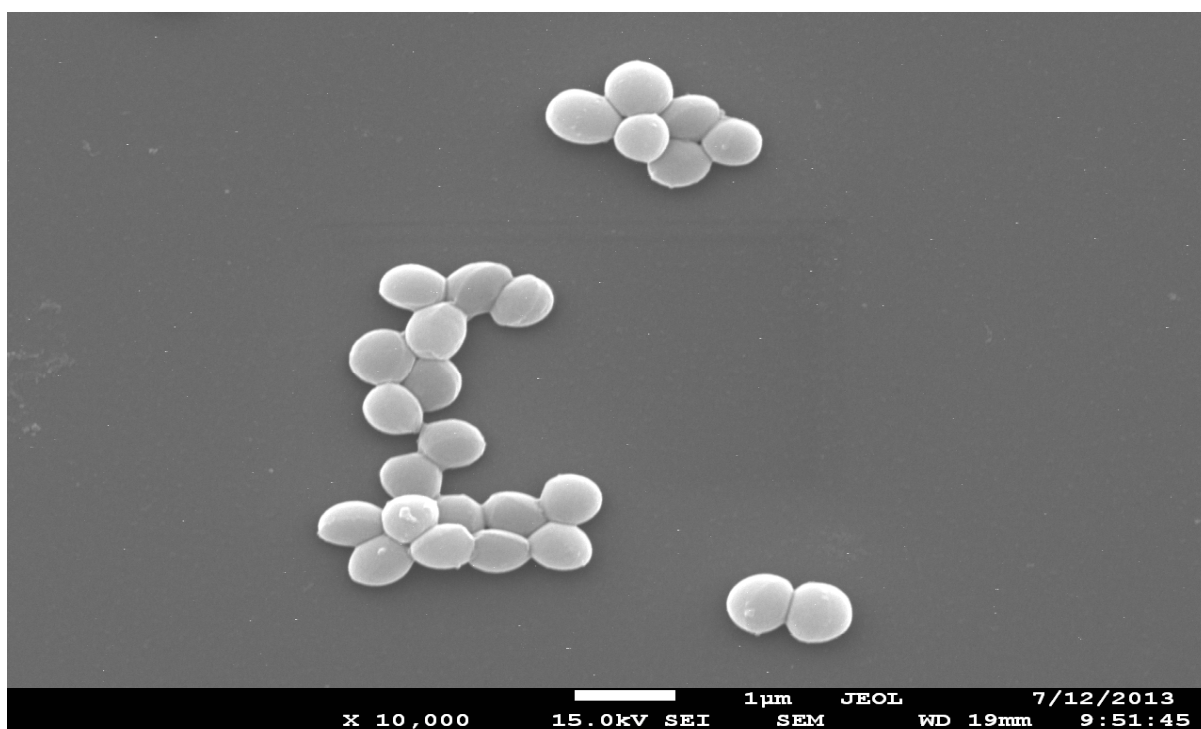


Figura 7–Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra de bactéria *Staphylococcus aureus* utilizada neste trabalho.

Até então, a vancomicina é a droga mais eficaz que pode consistentemente tratar *S. aureus* resistente a meticilina. Infelizmente, em 2000, no Japão já foram isoladas, em um hospital pediátrico, algumas cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina²⁵.

Contudo, desde 1989, hospitais têm relatado um rápido aumento da resistência à vancomicina no gênero *Enterococcus*, uma bactéria Gram - positiva, que também causa infecção hospitalar.

Em vista destes fatos, a infecção hospitalar representa, hoje, um grave e relevante problema de saúde pública mundial, e requer uma vigilância epidemiológica constante e rigorosa, bem como, exige também uma atenção redobrada de todos os profissionais que atuam na área de saúde, da administração e gestão hospitalar, das Comissões de Controle de Infecções e dos órgãos competentes na área de saúde.

1.6.3– O hospital como meio ambiente da resistência bacteriana:

É difícil acreditar que a única influência da hospitalização sobre a doença é diminuir ou parar os seus efeitos. A internação de paciente em um hospital não é o passaporte para a saúde plena. Diferentemente, hospitais constituem uma forte e importante fonte de infecções.

Os hospitais são verdadeiras “fortalezas” de bactérias inclusive das resistentes. O ambiente hospitalar abriga uma grande diversidade de microrganismos patogênicos ou não e em especial as bactérias. Muitos destes organismos bacterianos, embora normalmente não patogênicos, são capazes de agravarem a situação de pacientes, por conta da baixa resistência e por estarem imunodeprimidos causando-lhes doenças infecciosas.

O crescente interesse, em estudar e melhor analisar o problema da infecção hospitalar, está voltado, principalmente, para o fenômeno das bactérias antibiótico-resistentes.

No decorrer dos anos de 60 e 80, um novo espectro de agentes microbianos, das quais se destacam as bactérias Gram negativas, despontou como importantes agentes causadores de infecção hospitalar⁵⁰.

Recentemente, microrganismos Gram-positivos, como os *Enterococcus*, têm assumido um papel relevante na infecção hospitalar. *Enterococcus – Vancomicina-Resistentes (EVR)* foi detectado pela primeira vez na Europa em 1988, e está emergindo como um problema global da saúde pública em todo o mundo⁵⁰.

Ao mesmo tempo, o *marketing* dos antibióticos, promovido principalmente pelas grandes indústrias farmacêuticas, da venda destas drogas como sendo altamente eficazes para combater infecções bacterianas prossegue de maneira acelerada e crescente em todo o mundo.

Assim, nas últimas décadas, novos antibióticos de amplo espectro têm sido introduzidos no ambiente hospitalar e na rotina da medicina clínica em nível mundial⁵⁰.

Até pouco tempo, a prolongada luta contra as doenças infecciosas parecia estar, em parte, praticamente resolvida, pois as vacinas protegiam aproximadamente 8 de 10 crianças do mundo contra doenças mortais (como, varíola, difteria, tétano, tuberculose) e a "droga milagrosa", os antibióticos tratavam eficazmente um grande número de doenças infecciosas³⁰.

Com esse fato, essas medidas criaram em meio à saúde pública, uma falsa sensação de segurança e proteção, assim, os médicos passaram a usar os antibióticos de modo indiscriminado ou inadequado²⁶.

As doenças infecciosas ainda continuam sendo a principal causa de mortalidade no mundo. Atualmente, morrem vitimadas por doenças infecciosas cerca de 17 milhões de pessoas, sendo o número de crianças a maioria. O uso indiscriminado de antibióticos, na área médica, é um fato citado em diversos trabalhos nacionais e internacionais³¹.

Neste contexto, a resistência de microrganismos aos antimicrobianos tem aumentado de maneira espetacular nas últimas décadas, com efeitos devastadores sobre a luta contra doenças, tais como, tuberculose (que recrudescer com o advento da AIDS), cólera, desintéria bacilar, pneumonia e infecções hospitalares.

O mesmo se aplica a *Salmonella sp.*, um dos principais agentes bacterianos causadores de infecções transmitidas por alimentos, e as bactérias enterocócicas que provocam uma multiplicidade de complicações em pacientes hospitalizados.

Assim, longe de estar acabada, a luta contra as doenças infecciosas torna-se, agora, ainda mais severa e difícil, pois o uso indiscriminado de antibióticos tem aumentado consideravelmente o número de diferentes espécies bacterianas, resistentes aos antimicrobianos usados normalmente no comércio.

Algumas infecções, como a causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, estão se tornando praticamente incuráveis ou intratáveis devido à resistência do mesmo aos antimicrobianos.

O meio hospitalar apresenta um ambiente propício para que populações de bactérias resistentes a antibióticos sejam selecionadas. De maneira geral, o paciente internado está imunodeprimido e sujeito a diversas terapias, medicamentosas e/ou invasivas que o torna susceptível a adquirir infecção hospitalar.

Qualquer falha ou negligência, dos profissionais de saúde, em relação às medidas de controle de infecção hospitalar (como a lavagem das mãos), pode potencializar o risco de aquisição desse tipo de infecção.

Contudo, evidencia-se que os pacientes hospitalizados são potencialmente de alto risco para aquisição de uma infecção hospitalar por diferentes fatores predisponentes, ressalta-se que estes possuem uma maior potencialidade por serem mais susceptíveis para a infecção por causa de sua condição de doente, e este risco é aumentado quando eles são expostos a certos procedimentos invasivos realizados em seus tratamentos (cateter venoso, e/ou urinário, endoscopia, traqueostomia.), ou, se o paciente é imunodeprimido (subnutrição, AIDS, câncer, uso de corticóides e antibióticos).

As infecções hospitalares ocorrem, em parte, devido à prevalência de pacientes doentes e à presença de microrganismos patogênicos que são amplamente selecionados, em cepas antibiótico-resistentes no ambiente hospitalar.

A utilização indiscriminada de antibióticos, para o controle das infecções, traz com eles o risco potencial de selecionar organismos resistentes, muitos dos quais poderão não ser mais controlados, se causarem novas infecções.

É o caso da *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias antibiótico-resistentes, que têm aumentado dramaticamente, ao passo que outras consideradas no passado inofensivas, como as bactérias que compõem a nossa flora normal (exemplo: *Staphylococcus epidermidis*), têm sido agora causa de infecções hospitalares nestes recentes anos^{30 31}.

Diversas publicações científicas em termos mundiais referem-se à infecção hospitalar trazendo um alerta para a problemática das bactérias antibióticos-resistentes e o uso indiscriminado destes agentes nos hospitais, quer como profilático ou para controle das infecções.

A situação atual da infecção hospitalar é mais grave, pelo aumento do número de cepas bacterianas resistentes aos tradicionais antibióticos. Além da atenção com as doenças infecciosas já conhecidas (Hantavirose, Ébola, AIDS entre outras), a saúde da população mundial vem sendo ameaçada pelas bactérias que desenvolveram diversos graus de resistências aos tradicionais antibióticos, mais notadamente à multirresistências as essas drogas, como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus ssp.* *Staphylococcus sp.* *Escherichia coli sp.*(Figura 5)^{30 31}.

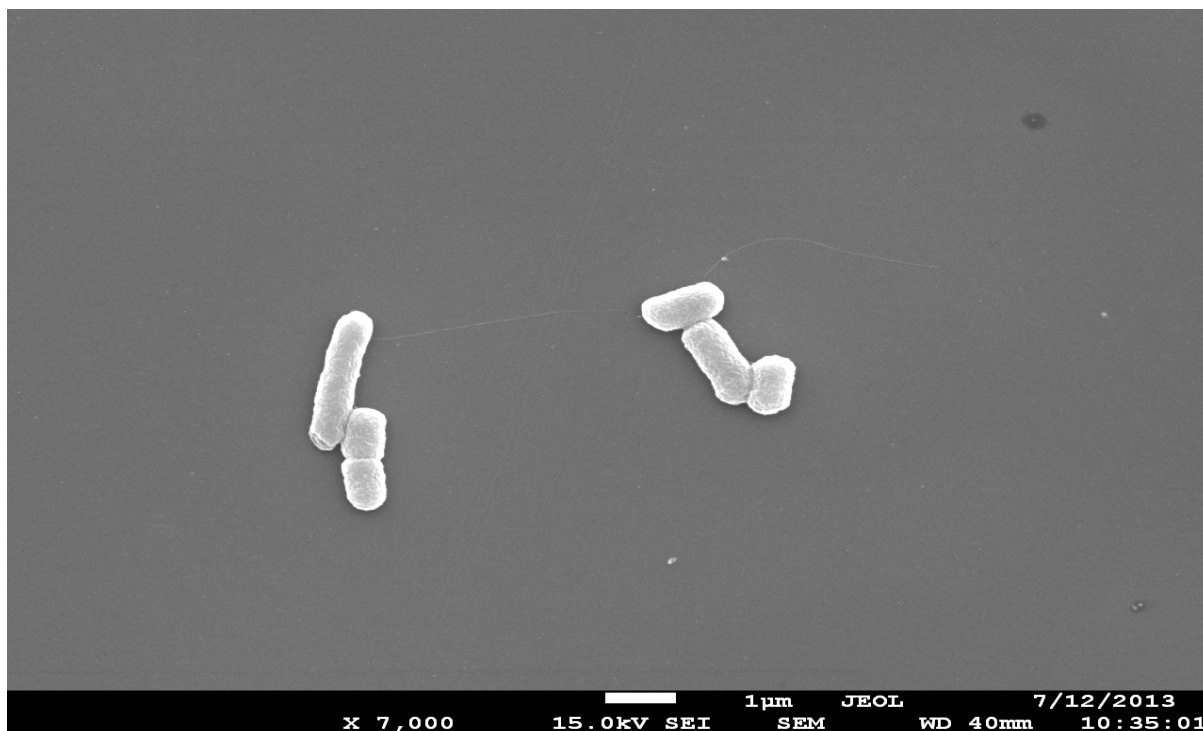


Figura 8- Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra da bactéria *Escherichia coli* utilizada nesse trabalho

A emergência ao se tratar das bacterianas resistentes aos antibióticos tradicionais tem sido agravada também pela demora no desenvolvimento de novas alternativas no combate a esses microrganismos.

O uso indiscriminado desses antibióticos trouxe uma série de impactos à saúde pública onde pode se destacar: a seleção de cepas de bactérias resistentes, implicações ecológicas e epidemiológicas, risco de super infecções, maior incidência de efeitos colaterais, e, o mais importante, o elevado número de óbitos resultantes daquelas infecções.

2-Objetivos:

2.1-Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas magnéticas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (ferritas de cobalto), usadas na elaboração de nanocoloides magnéticos em bactérias Gram – negativa e Gram – positiva, associadas à infecção hospitalar.

2.2 - Objetivos específicos

- Elaborar e caracterizar nanopartículas e nanocoloides magnéticos a base de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (ferritas de cobalto);
- Determinar a existência de atividade antimicrobiana de nanopartículas magnéticas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (ferritas de cobalto);
- Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ contra *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

3- Nanopartículas e Nanocolóides Magnéticos à base de ferrita de cobalto:

3.1 - Nanopartículas Magnéticas:

O magnetismo em materiais é uma área de investigação científica interdisciplinar relativamente nova que pode ser considerada uma evolução da físico-química. As oportunidades nessa área são amplas. Vários pesquisadores de diversas especialidades estão trabalhando cada vez mais em conjunto. A interação entre as diversas áreas do conhecimento faz com que várias técnicas, tais como: sínteses orgânica e inorgânica, de caracterização magnética, de difração de raios-x, eletroquímica, espectroscopias diversas, entre outras, sejam utilizadas para melhor descrição dessas nanopartículas. Um dos principais objetivos é compreender a origem das propriedades magnéticas, sendo uma área que apresenta grandes desafios também para pesquisadores que fazem cálculos, envolvendo desde a simulação de dados experimentais até cálculos mais elaborados de modelagem molecular e energia dos sistemas possibilitando fazer correlações magneto-estruturais. Esta interdisciplinaridade também tem possibilitado a descoberta e o entendimento de novos fenômenos como o tunelamento quântico da magnetização, coerência e emaranhamento quântico, que são fundamentais para aplicações na área de computação quântica. Além disso, outro grande atrativo é que estes materiais moleculares podem apresentar sinergia entre propriedades magnéticas, condutoras e ópticas, o que é interessante para aplicações tecnológicas²³.

Aplicações de nanopartículas magnéticas estão possibilitando diversos avanços nas informações sobre utilizações de materiais e nas tecnologias biológicas, as quais incluem o armazenamento de informações, sensores magnéticos, biomarcadores e desenvolvimento de novos fármacos²⁴.

Isto porque esses materiais apresentam tamanho na extensão de alguns a dezenas de nanômetros, os quais são menores ou comparáveis ao tamanho de uma célula (10 – 100 μm), de um vírus (20 – 450nm), de uma proteína (5 – 50 nm) ou de um gene (2nm de largura e 10 – 100 nm de comprimento) significando que as nanopartículas podem ser empregadas em um sistema biológico.

Também como alternativa esses materiais podem ser revestidos com moléculas biológicas (proteínas, por exemplo) para fazer com que os mesmos interajam com outras espécies biológicas e, dessa forma, possa fornecer um destino específico para essas moléculas no organismo. Além disso, os materiais magnéticos nanoestruturados podem ser manipulados por um campo magnético externo. Ainda, as nanopartículas magnéticas podem responder a uma variação magnética em função do tempo, o que conduz a um efeito de transferência de energia do campo magnético excitante para as nanopartículas. Deste modo, tais partículas podem dissipar calor, o que propiciaria sua utilização como agentes epitérmicos ou agentes quimioterápicos e radioterápicos, conduzindo a uma destruição das células malignas.

3.2 - Síntese de Fluidos Magnéticos:

Na biosfera, não encontramos fluidos homogêneos com propriedades ferromagnéticas. As propriedades magnéticas sempre estiveram relacionadas a certos materiais, sendo exemplo dessa propriedade o ferro no estado sólido.

Meados de 1779, Wilson realizou a primeira tentativa de obtenção de um Fluido Magnético (FM), que consistia em obter partículas micrométricas de ferro, através da moagem de blocos sólidos de ferro, que eram dispersas diretamente em água. Um problema encontrado nesse procedimento era o fato que o coloide obtido não era estável, devido ao tamanho das partículas (estabilidade coloidal) e a oxidação do ferro (estabilidade química)²³.

Aproximadamente em 1930, utilizando o mesmo método de moagem, Bitter e Elmore realizaram a tentativa de preparar em ferrofluido aquoso à base de partículas de magnetita. Contudo esse material não era estável com o tempo, devido ao tamanho ainda muito grande dos grãos.

No conceito histórico, os FM foram desenvolvidos, na década, por Rosensweig, pesquisador da NASA, com objetivo de possibilitar o transporte de combustíveis na ausência de gravidade.

Esses FM foram desenvolvidos pelo método conhecido como *top down* e eram constituídos de partículas de magnetita (Fe_3O_4), obtidas por moagem do material maciço até dimensões coloidais, estabilizadas em líquidos polares através do uso de surfactantes.

Entretanto, esse método era muito lento e dispendioso, além de não produzir fluidos magnéticos estáveis por um longo período.

Nesse caso, os ferrofluidos são chamados de surfactados em referência à presença de surfactantes adsorvidos na superfície das partículas, introduzindo uma repulsão do tipo esférica para contrabalançar as atrações interpartículas⁴⁵.

A produção de partículas magnéticas em tamanhos nanométricos, objetivando a elaboração de fluidos magnéticos, é efetuada utilizando o processo de condensação.

Inicialmente proposto na produção de partículas de magnetita, este método envolve uma reação de precipitação hidrotérmica a partir de solução de íons ferro trivalente e divalente, conduzida em meio alcalino. Este método produz um precipitado de partículas de diâmetros da ordem de alguns nanômetros e apresenta vantagens essenciais em relação ao método de moagem (dispersão) utilizado na década de 60 e início dos anos 70, pois permite produzir fluidos magnéticos com partículas menores, menos polidispersas, e como veremos posteriormente, podendo ser peptizadas em quaisquer líquidos portadores²³.

Já no início dos anos 80, foi então proposto um método de estabilização em meio aquoso que utiliza a criação de uma densidade de carga ajustável na superfície das nanopartículas e a consequente formação de uma dupla camada elétrica (Electric Double Layered Fluids, EDL-MF).

Tendo como início, a base de partículas de magnetita sintética, esses fluidos tinham um tempo de estabilidade limitado devido à oxidação da magnetita em maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Todavia, um processo de oxidação forçado efetuado antes das partículas serem peptizadas permitiu a síntese química dos EDL-MF, resultou na elaboração de ferrofluidos a base de nanopartículas de ferrita de metais do tipo *d-block*²³.

Atualmente, o processo de elaboração de fluido magnético consiste em três etapas (ver Figura 6): obtenção de nanopartículas (etapa 1), acidificação (etapa 2a), tratamento de superfície (etapa 2b) e, finalmente a peptização das nanopartículas (etapa 3) em uma solução coloidal estável⁴⁶.

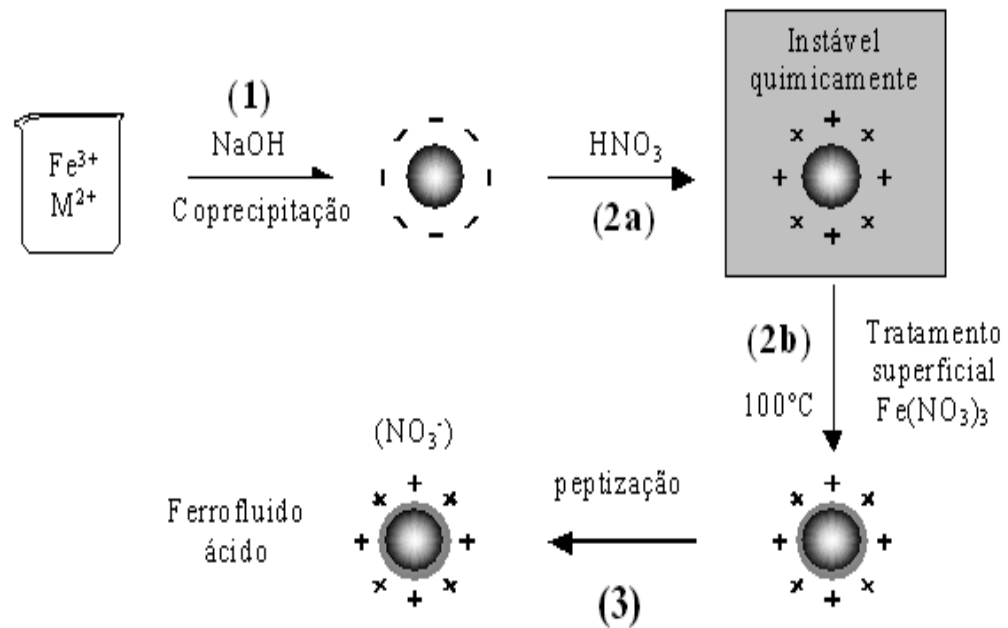
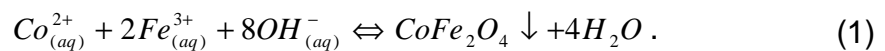


Figura 9 – Diagrama esquemático da síntese de um fluido magnético do tipo EDL-MF.

A obtenção das nanopartículas é conseguida a partir da condensação química de uma mistura de metal divalente Co^{2+} e de Fe^{3+} em meio alcalino, processo chamado de coprecipitação, podem ser obtidas nanopartículas de ferritas, cujo balanço químico é:



A partir de etapas intermediárias de policondensação inorgânica, pode-se controlar a composição do material, seu tamanho e morfologia a partir de parâmetros como pH, concentração, temperatura, etc. A nucleação de partículas é iniciada logo após a supersaturação das espécies iniciais e acaba à medida que a concentração diminui e o fenômeno de crescimento cristalino se torna predominante⁴⁷.

Ao final da etapa anterior, as partículas são obtidas na forma de precipitado – um sólido formado na reação química – e possuem carga superficial negativa⁴⁸.

Para a estabilização dessas partículas, promove-se a lavagem destas com água, acidifica-se o sistema com ácido nítrico HNO_3 e lava-se novamente com água, para a retirada do excesso de ácido, sempre promovendo a redução do volume do sobrenadante entre cada etapa.

Após esses procedimentos, as partículas estão positivamente carregadas, mas ainda não podem ser dispersas em meio ácido, pois se degradam com o tempo nesta forma. Assim, ferrofluidos ácidos não podem ser obtidos diretamente a partir de ferrita de cobalto. Para se contornar esse problema, um tratamento hidrotérmico é feito, no qual a dispersão coloidal magnética é aquecida²⁷ a 100 °C na presença de nitrato férrico $Fe(NO_3)_3$, de modo a se prevenir o ataque ácido e a degradação das nanopartículas, devido à criação de uma “casca” de maguemita $\gamma - Fe_2O_3$ sobre as ferritas⁴⁹.

3.3 - Modelo Core-Shell:

O tratamento de superfície descrito anteriormente é feito visando estabilizar as partículas em meio ácido, contudo, acaba por gerar uma mudança na composição química dessas partículas²¹. Existe um ganho de ferro que conduz a uma redução da fração molar

$\chi_M = \frac{[Co^{2+}]}{[Fe^{3+}] + [Co^{2+}]}$ de seu valor estequiométrico de $\frac{1}{3}$, advindo da fórmula

mínima $CoFe_2O_4$, relacionada à formação de uma camada rica em ferro que protege as partículas de dissolução ácida⁴⁶.

Assim, cada nanopartícula desse sistema pode ser analisada aproximadamente como uma esfera, constituída de um núcleo (ou interior) composto por $CoFe_2O_4$ e uma casca (ou camada externa) composta por $\gamma - Fe_2O_3$ (Figura 7).

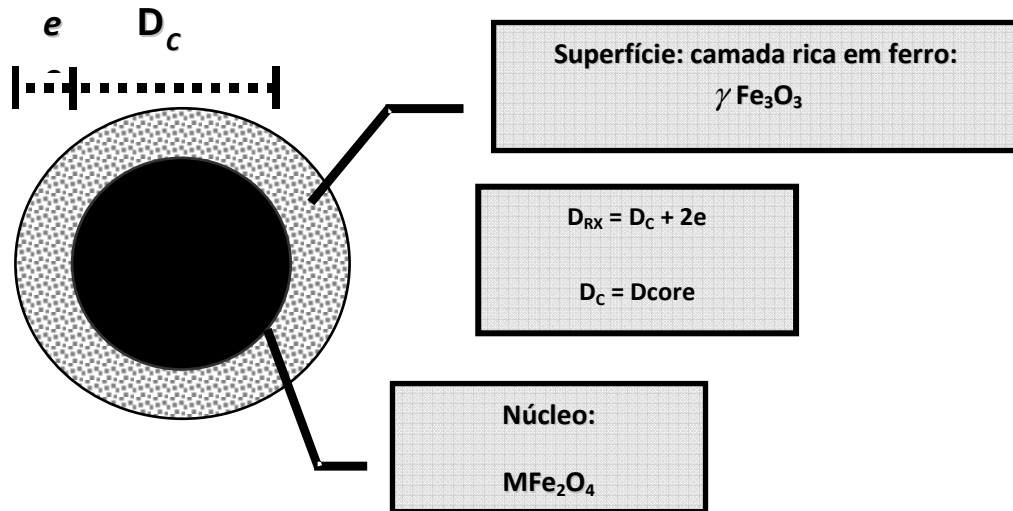


Figura 10 – Representação do modelo Core-Shell: o diâmetro total da partícula (D_{RX}) é fornecido pela soma do diâmetro do núcleo (D_c) mais o dobro da espessura da camada superficial (e).

Contudo, a composição química das amostras utilizadas aqui será representada por $CoFe_2O_4 @ \gamma - Fe_2O_3$. Para as amostras estudadas neste trabalho, a fração molar é de $\chi_M = 0,21$, a razão $\phi_s/\phi_p = 0,39$ e a espessura da camada de maguemitáé de 0,81 nm.

3.4 - Estrutura cristalina das nanopartículas:

As ferritas do tipo espinélio têm fórmula química MFe_2O_4 , onde M é um metal geralmente do período do ferro (por exemplo, Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}). Esse arranjo é constituído por um empacotamento cúbico compacto de 32 átomos de oxigênio, formando 64 interstícios de simetria tetraédrica (sítios A) e 32 interstícios de simetria octaédrica (sítios B). Esses sítios são parcialmente ocupados com 1/8 dos sítios tetraédricos e 1/2 dos sítios octaédricos preenchidos por cátions metálicos (Figura 8).

Os espinélios podem ser classificados como normais, inversos e mistos de acordo com a disposição dos cátions nos interstícios.

Nesse sentido, a distribuição dos cátions nos interstícios é dada através da representação cristalográfica: $[M_{(1-x)}^{2+}Fe_x^{3+}]_A[M_x^{2+}Fe_{(2-x)}^{3+}]_B O_4^{2-}$, onde x é o parâmetro de ocupação dos sítios pelos íons metálicos.

Quando existem somente os íons divalentes M^{2+} nos sítios tetraédricos e os íons Fe^{3+} nos sítios octaédricos ($x=0$), o espinélio é chamado de normal ou direto e sua fórmula pode ser representada por $[M^{2+}]_A[Fe_2^{3+}]_B O_4$. Quando os íons de Fe^{3+} são igualmente distribuídos entre os sítios A e B e os íons de metais divalentes são repartidos nos sítios B restantes ($x = 1$), o espinélio é classificado como inverso, podendo ser representado por $[Fe^{3+}]_A[Fe^{3+}M^{2+}]_B O_4$.

As duas estruturas, normal e inversa representam os casos extremos e quando a distribuição catiônica é intermediária a ferrita é dita mista.

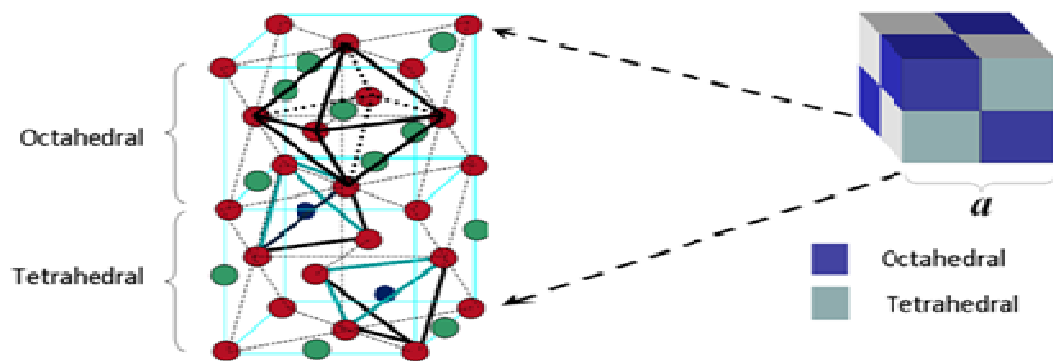


Figura 11 - Estrutura cristalina do tipo Espinélio.

A cristalização em um tipo de estrutura espinélio é governada pela energia de estabilização, que resulta da influência do campo cristalino. Dependendo da configuração eletrônica dos íons o ambiente mais favorável será tetraédrico ou octaédrico. No caso das ferritas estudadas aqui, no estado maciço, o metal trivalente é o ferro, de configuração d^5 , que não tem preferência entre os sítios A e B, e o metal divalente é o Co^{2+} tem uma configuração d^7 , que tem preferência pelo sítio octaédrico levando a estrutura inversa.

Entretanto, devido às condições da síntese hidrotérmica e como efeito de tamanho finito, as nanopartículas de ferrita tem a tendência de à redistribuição dos cátions nos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura espinélio apresentando assim estrutura do tipo mista⁵⁰.

3.5- Estudo por difração de Raios -X:

A difração de raios X é uma técnica baseada na interação da radiação eletromagnética com a estrutura cristalina, cujas dimensões características são comparáveis com os comprimentos de onda da radiação. A periodicidade da rede cristalina induz a existência de um feixe difratado (interferência construtiva) dentro de certas direções do espaço e essas direções são características do edifício cristalino.

A relação entre o ângulo de difração 2θ , o comprimento de onda λ da radiação X e as distâncias interplanares da estrutura d_{hkl} é dada pela Lei de Bragg⁵¹

$$2d_{hkl} \operatorname{sen}\theta = n\lambda \quad (2)$$

onde n é a ordem da interferência.

Uma primeira análise consiste em conhecendo o ângulo de difração e o comprimento de onda calcular as distâncias interplanares por meio da equação (2), avaliar a intensidade relativa dos picos de difração e comparar seus valores àqueles das fichas ASTM (*American Society for Testing Materials*) para cada material. Esse método permite a indexação dos picos característicos associados às famílias de plano (hkl) da estrutura cristalina.

Para estruturas de simetria cúbica como o caso das ferritas do tipo espinélio, à distância inter-reticular está relacionada de maneira simples com os índices de Miller,

$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}$, equação que permite deduzir, uma vez o difratograma indexado, o parâmetro de malha cúbico a e comparar seu valor aos valores de referência dados pelas fichas ASTM.

Um cristal perfeito é constituído pela repetição infinita e periódica de uma base utilizando-se as operações de simetria pontual e translação. Nesse caso, a intensidade difratada corresponde a uma linha infinitamente fina (pico de Dirac).

A redução da extensão do cristal conduz a um alargamento do pico de difração, como observado primeiramente por Scherrer, em 1918. O tamanho cristalino é relacionado com a largura à meia altura do pico de difração mais intenso, pela chamada “fórmula de Scherrer”⁵²

$$D_{RX} = \frac{K\lambda}{\{\beta \cos \theta\}} \quad (3)$$

onde K é o fator de correção ($0,7 \leq K \leq 1,7$) que depende da forma da partícula, dos índices (hkl) dos planos refletos, da definição particular usada para a largura do feixe assim como daquela relativa à dimensão da partícula. No caso das nanopartículas estudadas como elas são aproximadamente esféricas, o valor usado da constante é $0,9$. β é a largura a meia altura do pico de Bragg (2θ em radianos).

A técnica de difração de raios X para a caracterização de fases cristalinas apresenta algumas vantagens como a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos, visto que o perfil de difração obtido é característico de cada fase cristalina, além da possibilidade de se analisar os materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa de cada fase obtida durante as sínteses.

A figura 9 apresenta o difratograma obtido para a amostra estudada neste trabalho, utilizando-se a radiação K do Cu ($= 1,54 \text{ \AA}$), onde a intensidade difratada varia em função do ângulo de difração. As linhas indexadas são características de estrutura cúbica do tipo espinélio. Por outro lado, o alargamento das linhas de difração é essencialmente devido ao tamanho nanométrico das partículas. Portanto, utilizando a fórmula de Scherrer. Ao utilizarmos a largura à meia altura do pico, devemos descontar a largura intrínseca, introduzida pelo tipo de difratômetro utilizado e pelos erros de instrumentação.

Esta pode ser obtida a partir da largura a meia altura do pico observado, utilizando-se um monocristal padrão (no caso de nosso experimento, o quartzo). Para a amostra da Figura 12 o valor do diâmetro calculado desta maneira é $d_{RX} = 9,5$ nm.

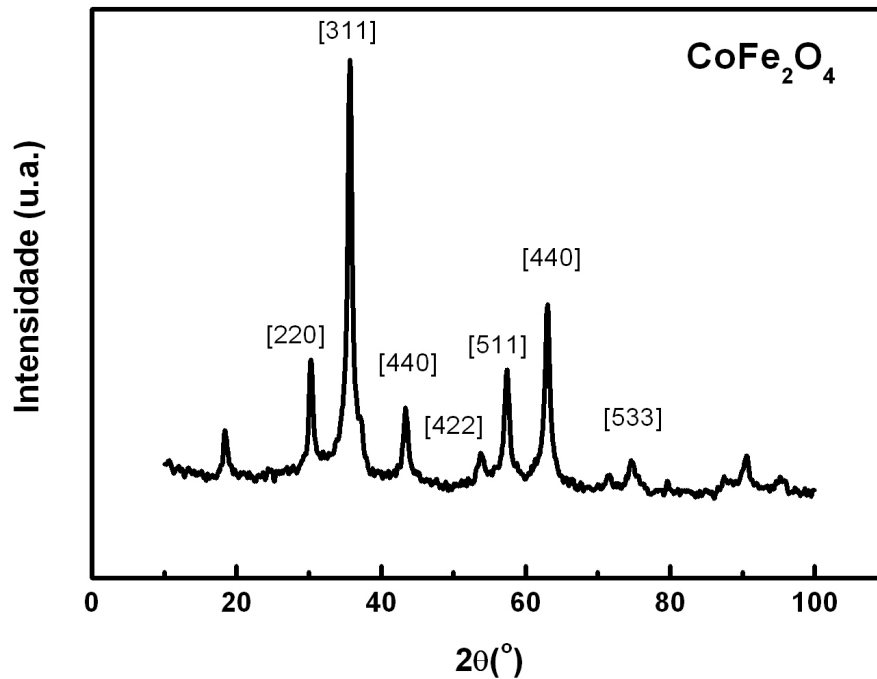


Figura 12 - Difratoograma obtido para amostra de ferrita de cobalto ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

3.6 – Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET:

A microscopia eletrônica permite obter uma imagem direta das partículas. As micrografias foram obtidas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, com a utilização de um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100 CX2. Para obter uma micrografia, uma gota diluída de fluido magnético foi depositada e dispersa por ultra-som sobre uma tela recoberta com uma rede de carbono e logo após a água é evaporada sob vácuo. Os aumentos utilizados foram de $\times 160000$ e $\times 190000$.

Apresentamos aqui uma micrografia típica obtida para nanopartículas à base de ferrita cobalto (Figura 10). Onde podemos ver que as partículas são aproximadamente esféricas e que estas apresentam uma certa distribuição em tamanho.

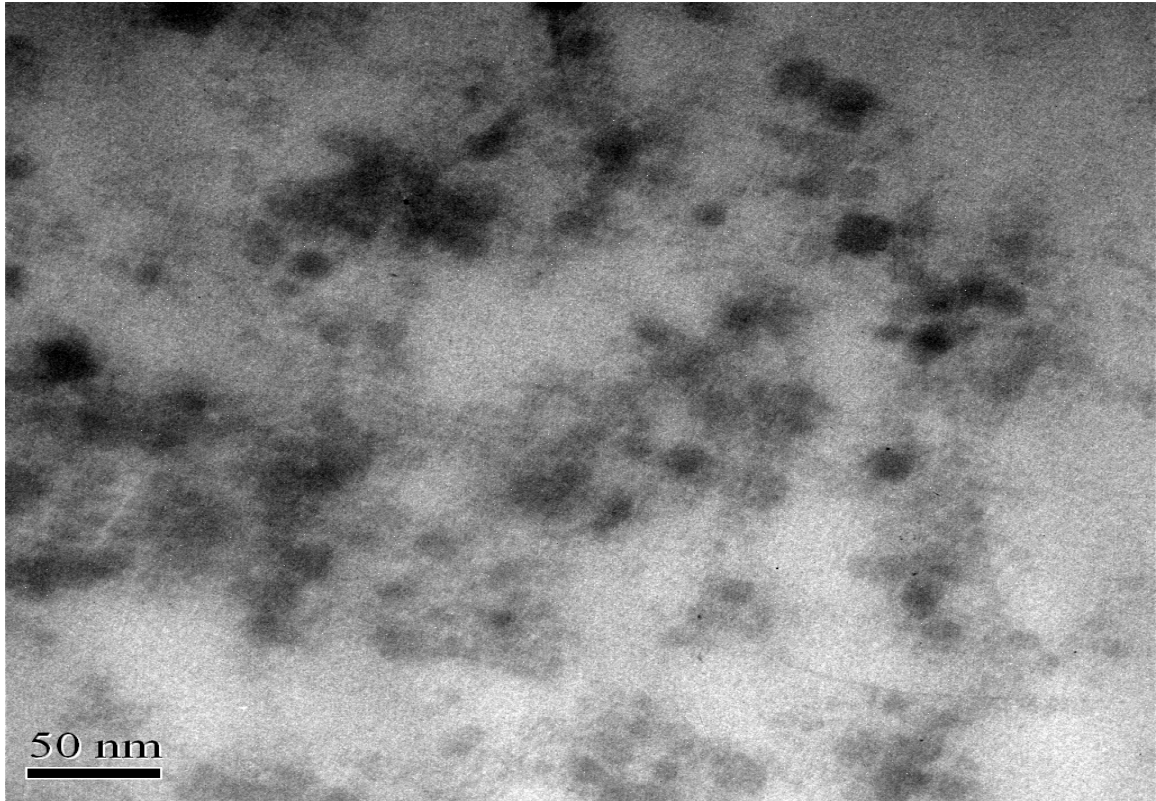


Figura 13 - Microscopia eletrônica da amostra de ferrita de cobalto ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) utilizada nesse trabalho.

3.7 - Propriedades magnéticas das ferritas e dos Nanocolóides

Magnéticos:

As propriedades magnéticas dos materiais dependem dos spins eletrônicos dos metais e de suas interações. Dentro de um sólido metálico, as interações de troca entre os átomos situados dentro de sítios adjacentes induzem alinhamento paralelo ou antiparalelo dos spins eletrônicos. Entretanto, nos óxidos espinélicos, os cátions não estão em contato direto, pois eles têm sempre um átomo de oxigênio como vizinho.

Dessa maneira, as interações de troca dentro desses materiais só podem ser possíveis pelo intermédio dos elétrons do oxigênio e são chamadas de interações de super-troca⁵³.

Os íons dos sítios A, assim como os íons dos sítios B, ocupam os nós de duas sub-redes de spins com ordenamento ferro ou antiferromagnético. As interações de super-troca entre estas duas sub-redes favorecem o alinhamento antiparalelo dos spins conduzindo a uma ordem antiferromagnética.

Entretanto, devido à diferença entre o número de sítios A e B, o comportamento global é ferrimagnético⁵³. Conhecendo então a distribuição dos cátions metálicos nos sítios intersticiais e o momento magnético de cada íon é possível calcular a magnetização de saturação de cada ferrita, a partir da soma dos momentos magnéticos por unidade de volume. A diferença entre os momentos magnéticos associados a cada sub-rede permite escrever a magnetização de saturação, em kA/m, somando as contribuições de todos os sítios A e B:

$$m_s(0) = \frac{Nd}{M_M} \left[\sum_B n_{B,B} - \sum_A n_{B,A} \right] \mu_B \quad (4)$$

onde n_{Bi} é o número de magnétons de Bohr μ_B associado ao sítio i por malha elementar, M_M a massa molar da ferrita, d a densidade e N é a constante de Avogadro.

3.8 - Ferrofluidos – O paramagnetismo gigante:

Devido às suas dimensões serem inferiores à parede de Bloch²², as partículas de um FM são monodomínios magnéticos, e a cada partícula associa-se um momento magnético da ordem de $10^4 \mu_B$. Esse momento também pode ser expresso em função da magnetização à saturação⁵³ m_s do material maciço e do volume V da partícula segundo a relação $\mu = m_s V$.

No interior de um monodomínio magnético (partícula) isolado, o momento magnético está orientado, segundo a direção definida pelo eixo de fácil magnetização do cristal. Esta direção é determinada pela existência de uma barreira de energia de anisotropia E_a .

Devido ao tamanho das partículas, E_a é pequena e pode ser tornar comparável à energia térmica. Neste caso, a probabilidade de passagem de uma direção de fácil magnetização a outra não é mais nula e o sistema de spins pode relaxar com um certo período τ entre as direções de fácil magnetização

De fato existem dois processos de relaxação do momento magnético em ferrofluidos. No equilíbrio termodinâmico, o momento magnético é orientado paralelamente à direção de fácil magnetização devido à barreira de anisotropia. A energia que bloqueia o momento nessa direção é dada por KV , onde K é a constante de anisotropia e V o volume da partícula monodomínio²⁷. O mecanismo de relaxação do momento é um processo termicamente ativado caracterizado por um tempo de relaxação⁴⁷: $\tau_N = \tau_0 \exp(KV/k_B T)$ onde τ_0 é o tempo de relaxação de spin²⁸, da ordem de 10^{-9} s.

Por outro lado, em soluções coloidais magnéticas, os graus suplementares de liberdade associados à rotação mecânica da partícula dentro do líquido, conduzem a um segundo mecanismo de rotação do momento magnético: a rotação Browniana caracterizada por um tempo de relaxação, que depende da viscosidade η do líquido portador $\tau_B = 3\eta V_H / k_B T$ onde V_H é o volume hidrodinâmico da partícula.

Como τ_B e τ_N dependem do tamanho e que os sistemas investigados são sempre polidispersos, os dois mecanismos de flutuação do momento coexistem. Quando $\tau_B \ll \tau_N$, é a relaxação de Néel que domina, quando $\tau_B \gg \tau_N$, o processo dominante é a relaxação browniana. Variando os parâmetros, podemos mudar de regime e abaixando a temperatura, podemos encontrar as temperaturas de bloqueio dos dois mecanismos.

4.1 – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos:

4.1.1 - Teste disco difusão

O ensaio realizado neste trabalho é descrito como teste de disco-difusão em meio sólido de ágar e foi descrito em 1966, por Bauer e Kirby. Este teste fornece resultados que são de caráter qualitativo. Este é um dos mais rotineiros métodos de suscetibilidade, sendo bastante confiável e utilizado por vários trabalhos em análises microbiológicas. Possui como princípio básico a difusão do antimicrobiano na superfície do meio ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano.

Esse teste pode ser realizado dispensando os discos de papel-filtro (impregnados com antimicrobianos) sendo essa amostra colocada sobre o meio de ágar diretamente.

Para garantir a confiabilidade do teste e evitar determinadas interferências que possam dificultar a leitura e interpretação dos halos após a incubação, está padronizado que ao utilizar uma placa de 150 mm, devem ser colocados no máximo 12 discos e, ao utilizar uma placa de 90 mm, no máximo 5 discos. Dependendo do tipo de microrganismos as placas são incubadas por 18 a 24 horas em ar ambiente ou a 5 a 7% de CO₂ a 35°C, antes serem determinados os resultados.

Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento ao redor de cada disco são mensurados em milímetros e relacionados à: sensibilidade da amostra bacteriana; e velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar (Figura 11).

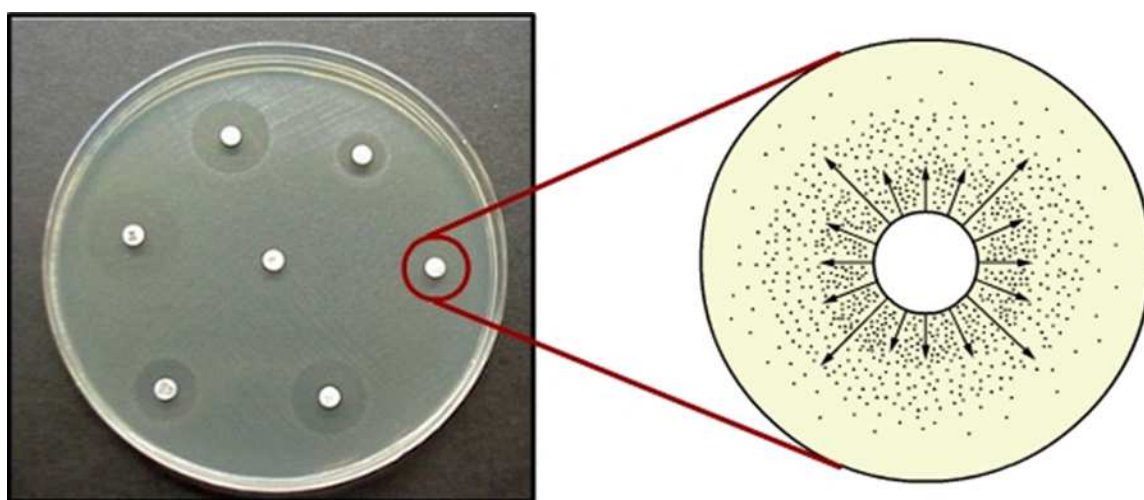


Figura 11

Figura 14 - Princípio do teste de susceptibilidade pela metodologia do disco-difusão.

4.2 - Experimentos envolvendo a atividade antibactericida de nanopartículas e nanocolóides magnéticos:

Nos ensaios de atividade *in vitro* foram utilizadas neste trabalho as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. As células bacterianas foram previamente replicadas em meio Luria Bertani (LB) líquido (50% bactotripton, 25% extrato de levedura: 35% NaCl, diluídos em água destilada), sob agitação durante 2-3 horas a 37° C. A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de disco-difusão de acordo com o manual M2-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)*, com adaptações.

Previamente a curva de crescimento da cultura original foi estabelecida por monitoramento do crescimento bacteriano através da observação da densidade ótica a 595 nm, a cada meia hora. Dessa forma, foi possível determinar o tempo ótimo em que o inóculo alcançou o meio da fase exponencial.

Para determinar a relação entre Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e densidade ótica, foi aplicada a técnica de micro gotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, onde uma alíquota foi coletada durante as leituras de meia hora, submetida a diluições de 1:10 e micro gotas das suspensões foram semeadas em meio LB acrescido de ágar (15 g.L⁻¹). Os testes contra as bactérias foram realizados em placas de petri contendo LB-ágar, a partir da cultura original, onde foi espalhado com alça de *Drygalski* um inóculo de 50 µl, diluído para aproximadamente 5 x 10⁴ UFC.mL⁻¹. Em seguida, foram colocados quatro discos de papel filtro esterilizados, um para 20 µl água destilada estéril, como controle negativo; um para 20 µl de cloranfenicol (80 µg.mL⁻¹), como controle positivo; e dois para amostra, sendo um para 20 µl de amostra do FM de CoFe₂O₄@γ-Fe₂O₃ (forma líquida) e um para 0,2 g da amostra de partículas desidratadas por aquecimento a 100 °C, aplicada diretamente sobre o meio ágar na placa de petri, ocupando área semelhante ao tamanho dos discos (Figuras 15^a, 15b e 16a, 16b).

Foram feitas adaptações ao protocolo descrito pelo manual M2-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)* para atender a forma física da amostra (líquida e sólida). Aproximadamente 135 placas foram produzidas a fim de estabelecer um protocolo ideal para análise do potencial das nanopartículas de CoFe₂O₄@γ-Fe₂O₃.

Após o processo de otimização de protocolo, 5 placas para cada tipo de bactéria, foram então incubadas a 37° C durante 12 horas. A formação e tamanho do halo de inibição das amostras foram comparados com o diâmetro do halo ao redor do controle positivo para cada uma das 5 réplicas e o valor médio foi colocado em gráfico com o desvio padrão (Figuras 17 e 18).

Resultado semelhante foi descrito com pó de partículas de CoFe₂O₄ tratadas com ácido cítrico ou polivinil álcool. Essa amostra apresentou resultado de inibição maior para *E. coli* do que para *S. aureus*. A literatura descreve que, provavelmente, o pó de partículas fixa-se à membrana das células dos microrganismos prolongando o atraso no ciclo de crescimento. Isto acarreta um tempo menor para que a divisão celular seja realizada de maneira completa⁵⁵.



Figura 15a -Ensaio em placa contra *Staphylococcus aureus* 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Sem medição do halo de inibição.

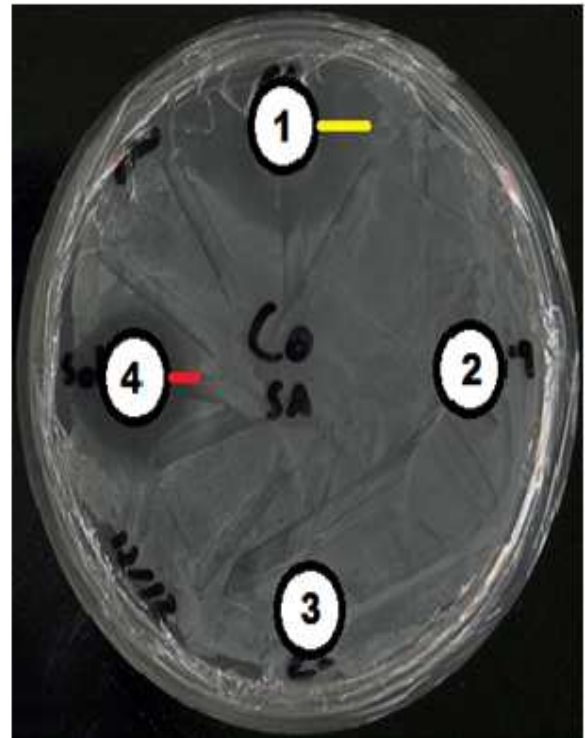


Figura 15b - Ensaio em placa contra *Staphylococcus aureus* 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). O traço amarelo representa o tamanho do halo do controle positivo e o traço vermelho representa o tamanho do halo causado pela partícula.

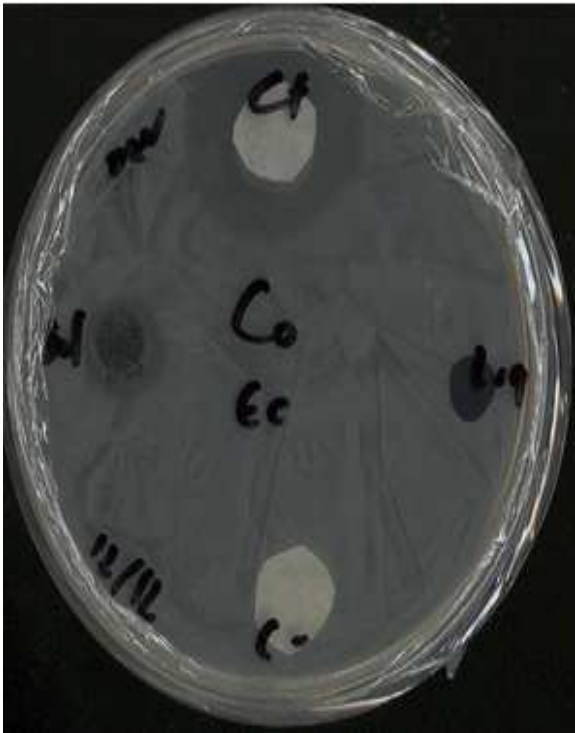


Figura 16a -Ensaio em placa contra *Escherichia coli*. 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). Sem medição do halo de inibição.

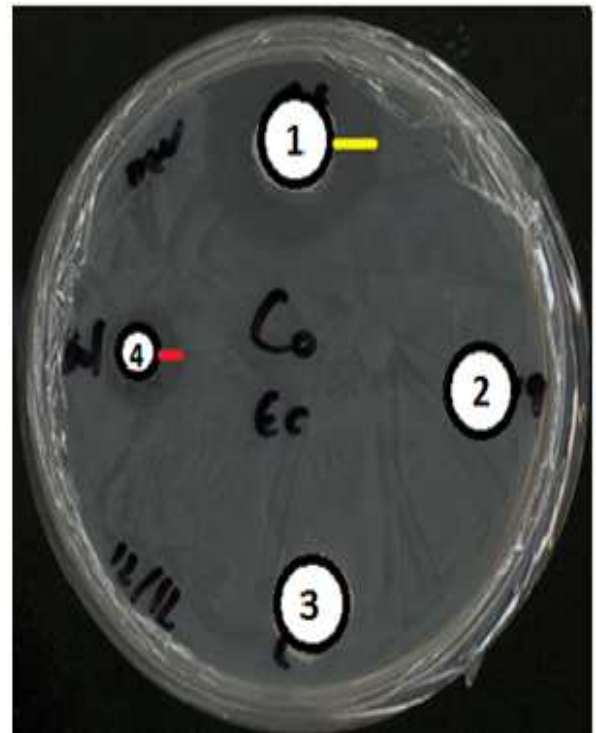


Figura 16b - Ensaio em placa contra *Escherichia coli* 1- Controle positivo (Cloranfenicol 80 ug.mL-1); 2- Colóide de FM 3%; 3- Controle negativo (água destilada autoclavada); 4- Partícula (0,2g). O traço amarelo representa o tamanho do halo do controle positivo e o traço vermelho representa o tamanho do halo causado pela partícula.

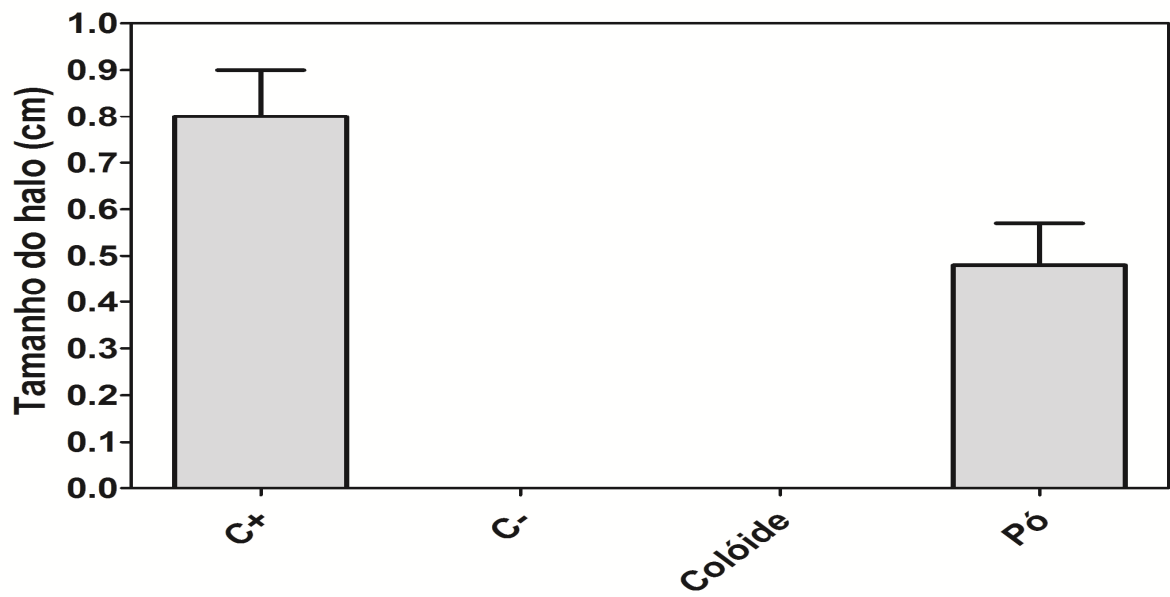


Figura 17 - Média de tamanho de halo observado para cada amostra contra *Staphylococcus aureus*. A barra representa a média de 5 placas observadas.

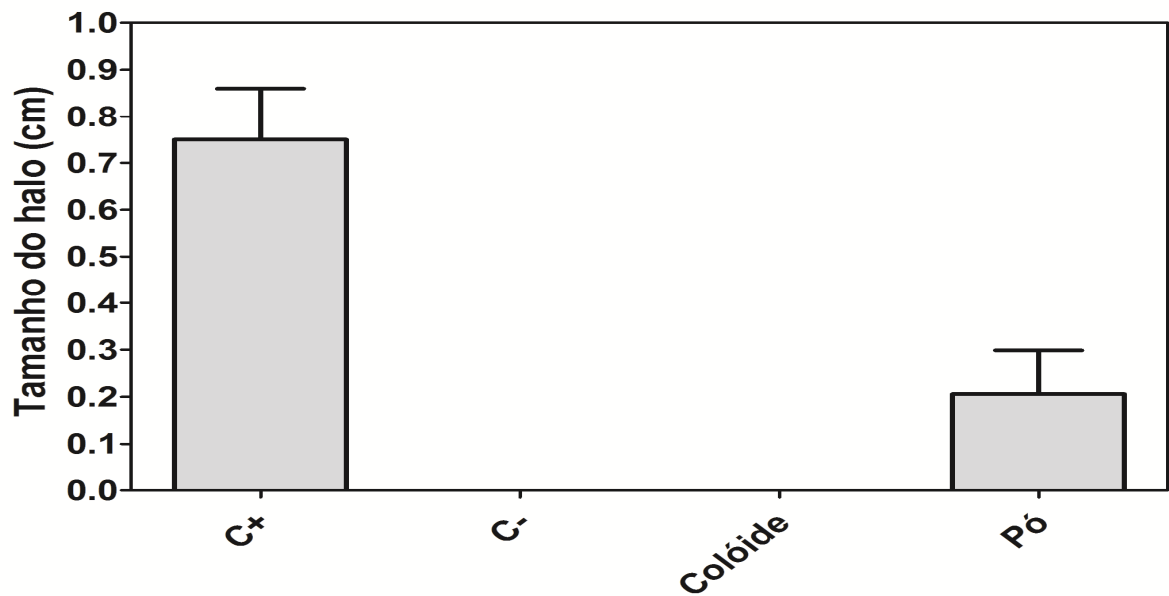


Figura 18 - Média de tamanho de halo observado para cada amostra contra *Escherichia coli* a barra representa a média de 5 placas observadas.

4.3 – Bioensaios e Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV:

Uma vez observado o efeito antibacteriano, especialmente mais pronunciado sobre *S. aureus*, nos ensaios em meio sólido, buscou-se investigar esse efeito a nível microscópico. Para isso, 5×10^4 UFC.mL⁻¹ das bactérias (*S. aureus* e *E. coli*), foram incubadas, por 4 horas, em 500 µl de meio LB + 500 µl do pó de partículas diluído em água destilada até a concentração de 0,15%. Após esse período as bactérias foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com tampão PBS, para retirada do meio de cultura. Em seguida foi adicionada 1mL da solução fixadora de glutaraldeído 2%, permanecendo assim por 12 horas. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado, e em seguida aplicadas em lamínulas cobertas com 1 gota de poli-L-lysine 0,1%. Foi então adicionada 1 gota de tetróxido de ósmio 2%, seguida de incubação 30 min e em seguida lavada 2 vezes com água destilada.

As amostras foram desidratadas por banhos sucessivos em acetona (50, 70, 90, 100%) e secas em ponto crítico de CO₂ a 37°C. Por fim, as amostras foram metalizadas com ouro por 2 min e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV. As micrografias das bactérias incubadas na ausência das partículas magnéticas (Figura 19 e 21) demonstraram que as bactérias permaneceram estruturalmente intactas após o processo de fixação para análise de microscopia. Já na amostra de *S. aureus* tratadas com as partículas magnéticas, foi observada tanto uma perda da integridade estrutural da membrana como uma grande presença de partículas em contato com a membrana (Figura 20), enquanto que na amostra de *E.coli* tratada foi observada uma menor quantidade de partículas em torno da membrana, assim como uma menor perda de integridade estrutural, quando comparada com *S. aureus* (Figura 22).

Esses resultados corroboram com os resultados dos bioensaios observados em meio sólido, onde as partículas mostraram-se muito mais ativas contra *S. aureus* do que contra *E.coli*.

A literatura disponível sugere dois mecanismos de ação distintos para nanopartículas, sendo eles: 1 - dano a estrutura da membrana⁴⁶ e/ou 2 - interação com íons e co-fatores diminuindo a viabilidade celular⁴⁶.

O presente trabalho indica que as nanopartículas de CoFe₂O₄@γ-Fe₂O₃ causam danos estruturais à membrana celular, principalmente no microrganismo Gram – positivo testado.

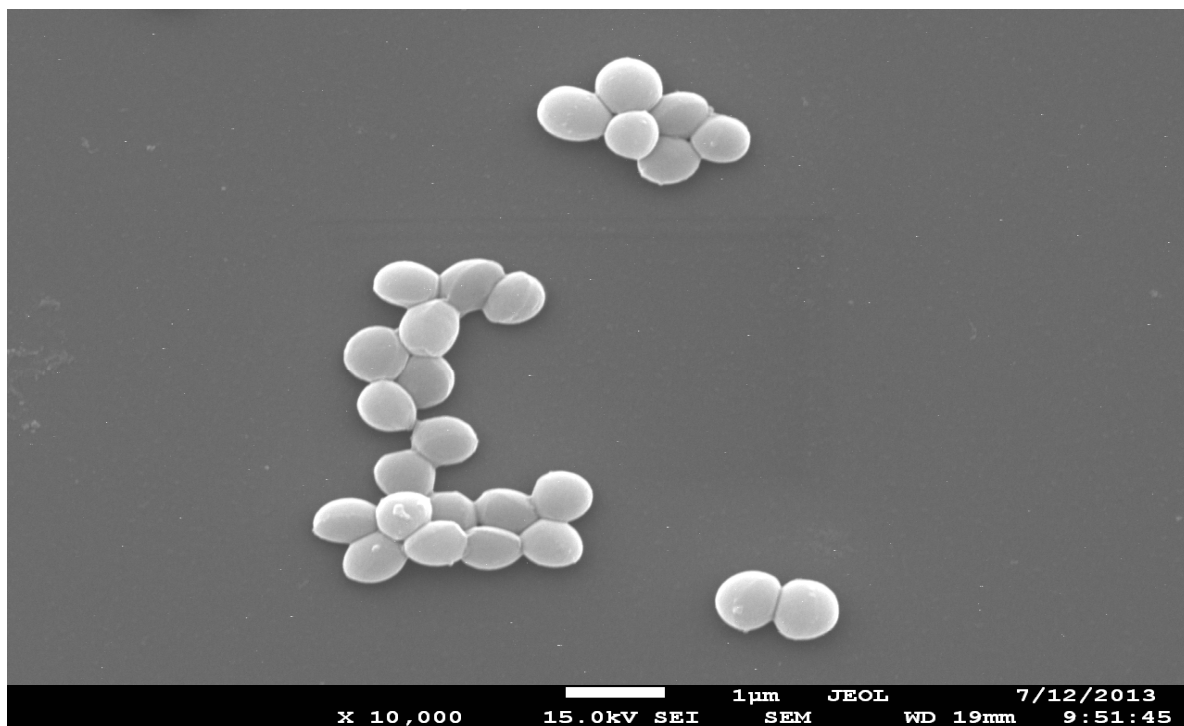


Figura 19 - Morfologia celular de *Staphylococcus aureus* observada usando MEV após 4 horas de incubação sem tratamento.

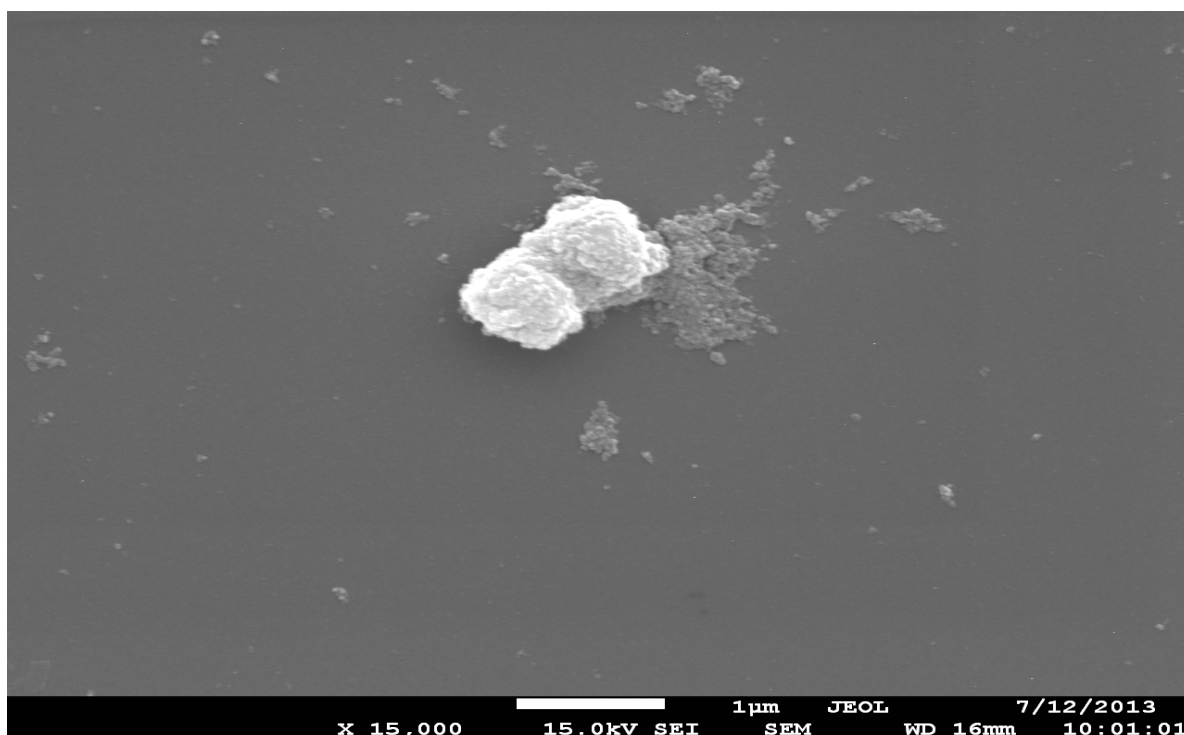


Figura 20 - Morfologia celular de *Staphylococcus aureus* observada usando MEV após 4 horas de incubação com tratamento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

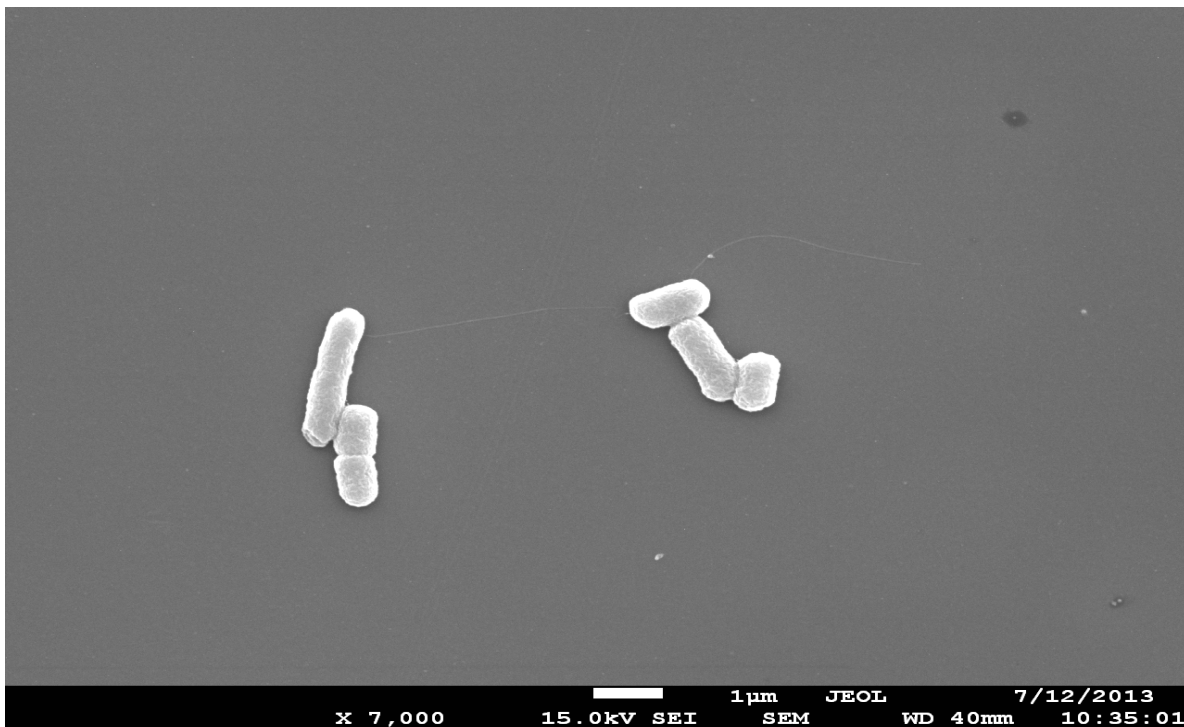


Figura 21 - Morfologia celular de *Escherichia coli* observada usando MEV após 4 horas de incubação sem tratamento.

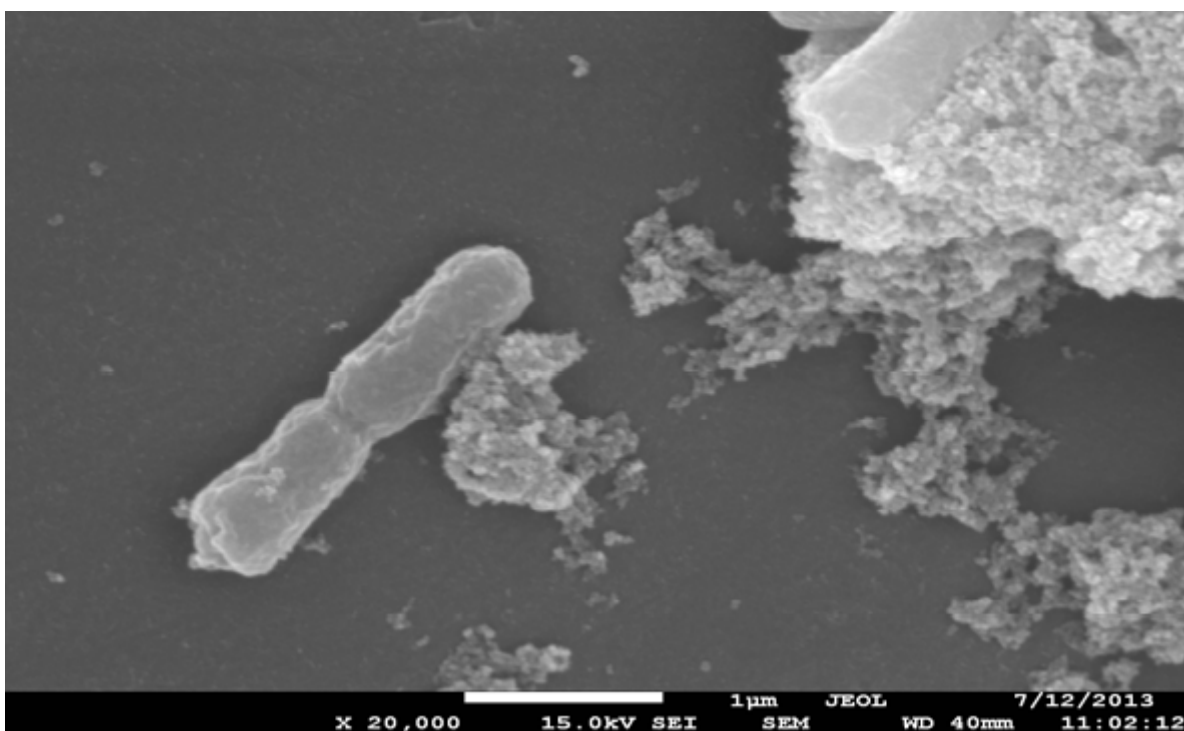


Figura 22 - Morfologia celular de *Escherichia coli* observada usando MEV após 4 horas de incubação com tratamento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

5 - Considerações finais

De forma conclusiva, os resultados apresentados aqui, nos bioensaios em meio sólido, sugerem que a amostra na forma de colóide magnético aquoso ácido (pH=3) à base de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, com diâmetro médio de $d_{rx}=9,5$ nm, descrita pelos experimentos de difração de raios-x e de microscopia eletrônica de transmissão, não exerceu inibição no crescimento do patógeno humano *E. coli* e também em *S. aureus*. (Figuras 16 e 17). Provavelmente, sendo o colóide um material líquido, e o protocolo do bioensaio requerendo que a amostra seja aplicada sobre papel o filtro, as nanopartículas podem ter ficado imobilizadas nos poros do papel não realizando a dispersão no meio cultura, esse fato pode ter impossibilitado a atividade das partículas contra as bactérias, justificando o resultado negativo de inibição obtido.

Diferentemente, o pó de partículas, obtido após a secagem do colóide, apresentou um potencial inibitório ao crescimento dos patógenos humanos *E. coli* e *S. aureus*. (Figuras 15 e 16). Nesse caso, a amostra foi diretamente colocada sobre o meio de cultura, podendo então facilitar a difusão das nanopartículas sobre o mesmo.

Observou-se que o tratamento realizado para análise em microscopia eletrônica de varredura, não teve interferência nos resultados obtidos verificados nas imagens, quanto à atividade das nanopartículas contra os patógenos. De forma destacada, verificamos deformações na membrana de *S. aureus* e *E.coli*, bem como, uma maior interação com as nanopartículas em *S. aureus* quando comparada com *E. coli*, o que está de bom acordo com os resultados de inibição maiores para *S. aureus* apresentados nos bioensaios em meio sólido.

Um resultado semelhante foi observado em nanopartículas de $\text{c-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2@ \text{TiO}_2\text{-Ag}$ que possuem a capacidade de se fixarem na membrana da bactéria, causando alterações estruturais ou danos funcionais. Tal fato é explicado por ter a membrana bacteriana um grupo diverso de proteínas contendo sulfurados que podem atuar como grupo preferenciais de adsorção de nanopartículas de $\text{c-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2@ \text{TiO}_2\text{-Ag}$.

Outra descrição para esse tipo de resultado deve-se pelo fato de alguns metais, como a prata, serem fortes ligantes com ácidos nucleicos, ocorrendo então à formação de um complexo com o DNA ou RNA, isso poderia levar à condensação do DNA e a perda da habilidade de replicação das bactérias⁵⁴.

Dessa forma, ficou evidente a capacidade de aplicação da amostra de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, que poderá vir a ser utilizada, eficientemente, para fins de produção de determinados nanomaterias que poderão auxiliar no combate de determinados microrganismos, como as bactérias descritas nesse trabalho, que são causadores de infecções em ambientes hospitalares.

Sendo assim, esse trabalho vem demonstrar que as nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ podem corroborar no desenvolvimento de nanomaterias como certos tipos de ceras (para aplicação no piso de ambientes hospitalares) e, até mesmo, de tintas de parede, que possam de fato minimizar o problema mundial da infecção hospitalar, sendo esse tipo de mecanismo de ação alternativa, portanto, uma nova estratégia no combate a esse tipo infecção.

6 – Referências Bibliográficas:

- 1- ALVES, O. L.; **Parcerias Estratégicas**, no18, 23, 2004.
- 2- TOMA, H. E., **O mundo Nanométrico: a dimensão do novo século**, Ed. Oficina de Textos; USP, 2004.
- 3- Disponível em: <<http://nano-magnetism.blogspot.com/2009/05/small-wonders-world-of-nanoscience.html>>, acessado em 25/06/2013
- 4- M. J. JUNIOR, L. C. VARANDA, ; **Química Nova na Escola**. 9, 1999.
- 5- JONES RAL. **What has nanotechnology taught us about contemporary technoscience? In: Zulsdorf T, Coenen C, et. Al**; Quantum engagements: social reflections of nanoscience and technologies. Amsterdam: IOS Pres; p.13-26; 2011.
- 6- PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G. DE; BARBASTEFANO, R. G. **Nanotecnologia e Nanobiotecnologia? Estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos**. Revista Gestão Industrial;02:02: 115-125; 2006.
- 7- HAYASHI, M. C. P. I.; FURNIVAL, A. C. M.; HAYASHI, M. R. M.; SILVA, M. R.; LIMA, M. Y. **Em direção à construção de indicadores regionais de nanociência e nanotecnologia**. Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional.;2:3:85-127;2006.
- 8- HOLAND, W.; RHEINBERGER, V; APEL, E.; RITZBERGER, C.; ROTHBRUSTT, F.; KAPPERT, H.; KRUMEICH, F.; NESPER, R. **Future perspectives of biomaterials for dental restoration**. J. Eur. Ceram. Soc.;29:1291-1297;2009.

- 9- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. **Biopolymeric nanoparticles**. Sci. Technol. Adv. Mater.;11:014104-13;2010.
- 10- LÊDO, J. C. S. **Questões bioéticas suscitadas pela nanotecnologia**.120f. Dissertação (Mestrado em Bioética) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2006.
- 11- OLIVEIRA, L. A. **Valores deslizantes: esboço de um ensaio sobre técnica e poder**. In: NOVAES, A. (Org.). O avesso da liberdade. São Paulo:Companhia das Letras, p. 507-519, 2002.
- 12- USKOKOVIĆ, V.; **Technology in Society**29, 43, 2007.
- 13- BUZEA C, BLANDINO IIP, ROBBIE K. **Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity**. Biointerphases ;2:MR17-172, 2007.
- 14- MACIEL, A. P. M.; LONGO, E.; LEITE, E. R. **Dióxido de estanho nanoestruturado: Síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas**. Quim. Nova, 26:6:855-862; 2003.
- 15- PONZIO, E. A. **Nanocompósitos de blendas poliméricas condutoras e óxidos de metais de transição**.199 f. Tese (Doutorado) – Química. Instituto de química da Universidade de São Paulo, 2006.
- 16- FERRERIA, H. S.; RANGEL, M. DO C. **Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise**. Quim. Nova;32:7:1860-1870, 2009.
- 17- FREIBERG, S.; ZHU, X., **Polymer microspheres for controlled drug release**. International Journal of Pharmaceutics;282:1-2:1-18, 2004.
- 18- ROSENSWEIG, R. **Ferrohydrodynamics**, Cambridge university Press, 1995.

- 19- WOLHFARTH, E. P., **Ferromagnetic Materials**, Vol III, Nort-Holland Publishing Company: Amsterdam, 1982.
- 20- IMPÉRIALI. CNRS International Magazine. 2, 19 2006.
- 21- Disponível em: <<http://www.liquidsresearch.com>>, acessado em 25/07/2011
- 22- OVERBYE, K M, BARRETT, J. F.,**Drug Discov.** Today. 10-45, 2005.
- 23- QUINA, F. H.**Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos.** Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.
- 24- ALANIS, A. J.**RESISTANCE TO ANTIBIOTICS: ARE WE IN THE POST-ANTIBIOTIC ERA?****Archives of Medical Research**, 36:697-705, 2005.
- 25- ELLENBERG, E.**Nosocomial infection: a terminological clarification.**Infectious Diseases, 4:721, 2009.
- 26- ANVISA Ministério da Saúde. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- 27- LIPSITCH, M, BERGSTROM, C. T. E LEVIN, B. R.**The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions.** Proceeding Nature Academy of Sciences USA, 97:1938-1943, 2000.
- 28- Infectious Diseases Society of America. **BAD BUGS, NO DRUGS: As Antibiotic Discovery Stagnates.** A Public Health Crisis Breaws, In: http://www.idsociety.org/pa/IDSA_paper4_final_web.pdf, acesso em 20/05/2013.

- 29- SIMONSEN, G. S. **The antimicrobial resistance containment and surveillance approach - a public health tool.** Bulletin of the World Health Organization, 82:928-934, 2011.
- 30- KOLLEF, M. H., FRASER, V. J. **Antibiotic resistance in the intensive care unit.** Annals of Internal Medicine, 134:298-314, 2001.
- 31- BYARUGABA, D. K. **A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors.** International Journal of Antimicrobial Agents, 24:105-110; 2004.
- 32- FRESER, V., HO, B., DING, J. L. **De novo design of potent antimicrobial peptides.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48:3349-3357; 2004.
- 33- BARRETT, J. F. **Can biotech deliver new antibiotics?** Current Opinion in Microbiology, 8:498-503, 2010.
- 34- Organização Mundial da Saúde, jornal, 2005.
- 35- MOGHINI SM, HUNTER AC E MURRAY JC. **Nanomedicine: current status and future prospects.** FASEB, 19:311-330, 2005.
- 36- FIGUEIREDO, L. T. M. **Historic evolution of infection concept.** Medicina Intensiva, 28:866 -872, 1995.
- 37- B. M. BERVOVSKY, V. F. MENVEDEV, M. S. KRAKOV, **Magnetic Fluids: Engineering Applications.** Oxford University Press, 1993.
- 38- GOMES, J. A.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; AQUINO, R.; SILVA, G. J.; DEPEYROT, J.; DUBBOIS, E.; PERZYNSKI, R.; **J. Phys. Chem. C.**, 112, 6220. 2008.

- 39- R. AQUINO, F. A. TOURINHO, R. ITRI, M. C. F. E LARA, J. DEPEYROT, **Size control of MnFe₂O₄ nanoparticles in electric double layered magnetic fluids synthesis**, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 252, 23, 2002.
- 40- A.F.C. CAMPOS, F.A. TOURINHO, G.J. DA SILVA, M.C.F.L. LARA AND J. DEPEYROT. **Nanoparticles superficial density of charge in electric double layered magnetic fluid: a conductimetric and potentiometric approach**. The European Physical Journal E, v. 6, p. 29, 2001.
- 41- F. TOURINHO, R. FRANCK, R. MASSART, R. PERZYNSKI. **Synthesis and magnetic properties of manganese and cobalt ferrite ferriteferrofluids**. Progr. Colloid Polym. Sci. 79, 128-134 1989.
- 42- HAMMOND, **The basics of crystallography and diffraction**, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- 43- SCHERRER, P.; NACHR. GES. WISS. GÖTTINGEN, 26, 98, 1918.
- 44- CULLITY, B.D.; GRAHAM, C.D. **Introduction to Magnetic Materials**. John Wiley & Sons. ISBN 0-201-01218-9, 2010.
- 45- L. NÉEL, **Ann. Geophys.** 5, 99 (1949); C. R. Acad. Sci. 228, 664, 1949.
- 46- DAS SK, DAS AR, GUNHA AK, **Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management**, Langmuir 23: 8129-8199, 2010.
- 47- AUFFAN M, ACHOUAK W, ROSE J, RONCATO MA, CHANAC C, WAITE DT, MASION A, WOICIK JC, WEISNER MR, BOTTERO JY. **Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli***. Environ Sci Technol 42:6730-6735, 2008.

- 48- BARON, S. **Medical Microbiology**. ed. 4, Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996.
- 49- CAROFF, M., KARIBIAN, D., **Structure of bacterial lipopolysaccharides**. Carbohydrate Research, 338:2431-2447, 2003
- 50- CORDWELL, S. J. **Technologies for bacterial surface proteomics**. Current Opinion in Microbiology, 9:320-329, 2006.
- 51- HERASIMENKA, Y., BENINCASA, M., MATTIUZZO, M., CESCUTTI, P., GENNARO, R., RIZZO, R. **Interaction of peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens**. Peptides, 26:1127-1132, 2005.
- 52- LODISH, H., BERK, A; ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P. B. D., DARNELL, J. E.,. **Molecular Cell Biology**. ed. 4, New York: W.H. Freeman & Co., 2000.
- 53- MUNFORD, R. S., VARLEY, A. W., **Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to Gram-negative bacteria**. PLoS Pathogens, 2:467-471. 2010.
- 54- BIN CUI , HONGXIA PENG, HAIQING XIA, XIAOHUI GUO, HUILIN GUO, **Magnetically recoverable core-shell nanocomposites c-Fe₂O₃@SiO₂@TiO₂-Ag with enhanced photocatalytic activity and antibacterial activity**, Separation and Purification Technology, 103: 251-257, 2012.
- 55- NOPPAKUN SANPO, JAMES WANG AND CHRISTOPHER C. BERNDT, **Influence of Chelating Agents on the Microstructure and Antibacterial Property of Cobalt Ferrite Nanopowders**, Journal of the Australian Ceramic Society Volume 49: 84-91 2013.