

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIOGRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITO DE ANTIBIÓTICO VETORIZADO COM NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS PARA TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR *Staphylococcus  
aureus* MULTIRRESISTENTE.**

**JULIANA FERNANDES DE CARVALHO**

**Natal/RN**

**2018**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Carvalho, Juliana Fernandes de.

Efeito de antibiótico vetorizado com nanopartículas magnéticas para tratamento da infecção por *Staphylococcus aureus* multirresistente / Juliana Fernandes de Carvalho. - 2018.  
96f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Natal, RN, 2018.

Orientador: Artur da Silva Carriço.

Coorientador: Aldo da Cunha Medeiros.

1. *Staphylococcus aureus* - Tese. 2. Magnetita - Tese. 3. MRSA -Tese. 4. Ratos - Tese. I. Carriço, Artur da Silva. II. Medeiros, Aldo da Cunha. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 579.852

**JULIANA FERNANDES DE CARVALHO**

**EFEITO DE ANTIBIÓTICO VETORIZADO COM NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS PARA TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR *Staphylococcus  
aureus* MULTIRRESISTENTE.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PpGCSA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Doutor na área de Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Artur da Silva Carriço  
Coorientador: Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros

Natal/RN

2018

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIOGRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em ciências da Saúde:  
Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

**JULIANA FERNANDES DE CARVALHO**

**EFEITO DE ANTIBIÓTICO VETORIZADO COM  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA TRATAMENTO DA  
INFECÇÃO POR *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTE.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Artur da Silva Carriço**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Presidente/Orientador

---

**Prof. Maiza Rocha Abrantes**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Examinador

---

**Dra. Michelle de Medeiros Aires**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Examinador

---

**Prof. Leonardo Linhares de Oliveira**

Universidade Estadual do Rio Grande do Norte  
Examinador externo

---

**Dra. Fabrícia Lima Fontes-Dantas**

UNIRIO  
Examinador externo

**Dedico esse trabalho a todos aqueles que acreditam e apoiam a pesquisa no Brasil. Para que possamos fazê-la cada dia mais forte e expressiva.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, que, nos momentos de desânimo das replicatas, dos ajustes de experimento, do retrabalho; sempre colocava “anjos” no meu caminho que não me deixaram fraquejar.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) que forneceu o auxílio financeiro necessário para que eu pudesse me dedicar à pesquisa, à FAPERN e CNPQ que subsidiaram a compra de materiais de laboratório e reagentes e ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) que avaliou e aprovou o estudo *in vivo*.

Obrigada à minha família - meus primeiros anjos - que sempre investiu nos meus estudos desde a mais tenra idade, mostrando-me a importância dos conhecimentos e fazendo-me provar o sabor do saber. Venho também me desculpar pelos estresses, o mau humor, a falta de paciência e tempo... pois os que estão mais perto acabam sendo aqueles colocados em último lugar na divisão do tempo e os que sofrem mais com as nossas variações emocionais. Sei que é difícil entender como uma pessoa sai pra universidade de manhã cedo e só volta de noite, e o tempo que está em casa passa quase 90% na frente do computador: “que tanto ela lê que não tem fim?”, “por que quando eu chamo é sempre – ‘Já-já.’?”, “pra quê esse monte de abas abertas no computador?”, “por que ela pega meu computador também?”. Mas pra mim também é difícil me concentrar - tanto para ler em outra língua, mas principalmente para escrever - com alguém de vez em quando fazendo perguntas; escutando rádio, vídeo-aulas ou TV nas alturas, como se o resto da casa precisasse ouvir também; chamando pra comer justo naquela hora que você conseguiu dar andamento ao raciocínio... Desculpem a chatice.

Agradeço ao Grupo de Magnetismo, em particular e em especial a seu idealizador e meu orientador, prof. Artur Carriço, por ter me acolhido, por seu ânimo na pesquisa e pelo dom de encantar e motivar seus estudantes. Nesse grupo tão diverso aprendi coisas que, certamente não veria num grupo só biomédico.

Agradeço muito à “chefinha” Amanda, a primeira a me encantar com o mundo da pesquisa e suas possibilidades; que com seu jeito meigo e delicado veio mostrar que a academia é lugar de mulher sim! Que há como conciliar a

maternidade, a família, e a pesquisa. E que se você for persistente e estudar bastante, o mundo não colocará barreiras no seu caminho e sim degraus. Admiro muito essa profissional, mãe e estudante-curiosa incansável.

Agradeço também aos “parceirinhos de aventura”: Érica, Thales, Kátia, Rafael e Ítalo, que estiveram sempre ao meu lado no início dessa jornada e me ensinaram muito sobre os diferentes tipos de amizade na área da pesquisa. Agradeço em particular a Thales, pelo alto-astrol e irreverência, mesmo nos momentos de crise. Uma pena que isso foi se perdendo com o tempo...

Agradeço ao setor físico do GM que acolheu a “estranha no ninho” quando os planos de continuar na farmácia foram interrompidos, e uma nova parceria com a física, medicina e a biologia se delineou. Obrigada a Gracinha, Gustavo, Rafa, Léo, Jadson, Sérgio e Claudivam pelas conversas, os almoços, as pizzas, pelo esclarecimento de dúvidas de física, pelo auxílio com informática e com programas de processamento de dados, e pela companhia até altas horas na faculdade. Obrigada a Silas, meu parceiro de bancada, por me aguentar invadindo seu espaço; pelas dicas de concursos e notícias; pelas conversas científicas e sugestões de livros, filmes e sites; pelo humor ácido e as brincadeiras com fundo de verdade. Obrigada a Thiago pelo coffee time, os conselhos e as conversas. Obrigada a Bira e Neymar, meus ajudantes da física na parte experimental: pelo auxílio ao uso correto dos equipamentos dos laboratórios do departamento, pelas discussões de resultados e experimentos, e pelo compartilhamento da descoberta de novos equipamentos no campus. Obrigada a todos pela amizade e pelas dicas de amenidades.

Agradeço grandemente também a meu coorientador, Dr. Aldo, pela pessoa maravilhosa, acessível e que, do alto de seu conhecimento e de suas muitas ocupações, não se intimida em “descer” e “colocar a mão na massa” para ajudar nos experimentos e fazer a pesquisa acontecer.

Aos professores que me receberam de braços abertos em seus laboratórios, com pessoal, materiais e equipamentos, agradeço bastante: aos professores João Maria, Marco Morales e Rodolfo pelo acompanhamento no laboratório de física da UERN, para os experimentos de caracterização; ao professor Ademir e seu aluno Artur, pelas análises feitas no Departamento de Química; ao professor Hugo Alexandre pela abertura do Biopol e da sala de cultura de células no Departamento de Bioquímica da UFRN; ao professor Aldo



Medeiros, Amélia, Ítalo e Chiquinha pela disponibilidade e abertura do Laboratório de Cirurgia Experimental da Medicina (UFRN); ao Instituto de Radiologia de Natal, na pessoa de Dr. Robson e Rafael pelo auxílio nos experimentos de imagem; à Dra. Liane que solicitou os testes das dosagens bioquímicas dos ratinhos; à professora Vânia Souza, responsável pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências da UFRN, pela parceria, mesmo que temporária, e abertura de seu laboratório; à professora Maiza Rocha, Elizabeth e Janaína, do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia (UFRN), pela abertura de seu laboratório e suporte na realização dos experimentos, pela disponibilidade à discussão dos experimentos e pelos conselhos; ao professor Sócrates do Egito pela abertura de seu laboratório, e especialmente a sua equipe (alunos) sempre solícita e agradável; ao professor Matheus Pedroza, pela disponibilidade de uso dos equipamentos de Laboratório Multidisciplinar da Faculdade de Farmácia (UFRN); e aos amigos Marcelo Vitor e Fabrícia Lima que sempre “quebravam um galho” arranjando algum reagente que me faltasse.

Não poderia deixar de citar os amigos recentes: Michelle, Fernanda, Thais, Sunamita e Déborah que me reaproximaram do “mundo” biomédico, em particular, do departamento e da graduação de Farmácia; e minhas grandes amigas de longa data: Larissa Bandeira, que mesmo longe nunca deixou de torcer por mim e me incentivar, e Fabrícia Fontes, que, além ser a amiga mais próxima e presente nesse percurso, com sua paixão pela pesquisa e pela ciência, nunca me deixou esmorecer (mesmo nos momentos mais difíceis), foi minha orientadora da especialização e hoje é minha colega e parceira de revisões.

Nesse caminho, não posso deixar de agradecer àqueles que me lembravam de que a vida não é só trabalho: meus pais e seus “vamos à praia?”; minhas Marias, exemplos de tias, mães, mulheres, guerreiras, família e amor; ao meu namorado maravilhoso, que está tendo paciência com as minhas loucuras desde a graduação: obrigada pelo carinho e compreensão, pelos dias dos namorados nunca comemorados no dia, pelas combinações de longo prazo que só posso dar a resposta de última hora, pelo computador em duas telas, e por estar sempre ao meu lado, me apoiando no que faço, me

incentivando a seguir em frente e me ajudando nas apresentações (te amo, gordinho!); às minhas queridas primas “Goiabas”, as mais difíceis de conseguir alinhar as agendas, mas aquelas dos encontros mais divertidos e tresloucados; às minhas amadas “Queridinhas”, amigas-irmãs de tanto tempo, que me ensinaram e me ensinam diariamente o valor das verdadeiras amizades; ao “Povo Legal”, sempre “atenado” nas “novidades farmacêuticas” e “de saúde”, disponíveis para tirar dúvidas na área, dar dicas de cursos e concursos, focar, lembrar bons momentos e “tomar umas” por aí; às “Fofquinhas”, pela companhia nas saídas dos “Putões” manobrados e/ou não; às “Musas dos OKKs”, pela companhia nas saídas dos “OKKs”; ao pessoal da terapia, amizades que se moldaram e fortaleceram para solucionar problemas comuns e que me trouxeram novo ânimo nos momentos de transição e aparente solidão; às “Meninas” e ao pessoal do Segue-me São Pedro, EJAC Santa Terezinha e Pastoral Santa Maria, que ajudaram e ajudam a renovar minha fé no que faço e no mundo, e a ter tranquilidade e esperança, uma verdadeira “recarga nas baterias” quando achava que minhas forças iam esgotar.

Para finalizar, venho citar meu avô: “no corre-corre de nossas vidas diárias, muitas vezes esquecemo-nos de agradecer, agradecer não somente a quem lembramos, pois nos fizeram bem ou os temos em ‘alta conta’, mas àqueles que nem conhecemos, que nos ajudaram ou mesmo prejudicaram, pois tudo o que passamos contribuiu para o que somos hoje”. Obrigada a todos que cruzaram meu caminho, que me fizeram crescer e ser mais gente.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

**(Marcel Proust)**

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* são historicamente reconhecidos como importantes patógenos humanos. São bactérias esféricas e Gram positivas constituintes da microbiota normal da pele e mucosa de grande parte dos mamíferos, incluindo os seres humanos. Fatores orgânicos como imunidade do hospedeiro e integridade da barreira cutânea, bem como fatores inatos ao microrganismo como virulência, contribuem para que a condição de simbiose inicial se torne uma relação patogênica, resultando desde afecções cutâneas e subcutâneas simples até as infecções sistêmicas graves. Não obstante sua intrínseca de virulência, desde o emprego na prática clínica da Penicilina na década de 1940, estas bactérias começaram a desenvolver resistência. A ascensão de cepas de MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) insensíveis à múltiplos antibióticos empregados na prática clínica é um fenômeno preocupante, pois, além reduzir as opções terapêuticas contribuiu para a disseminação mundial dessa agente, ameaçando a saúde pública na medida em que aumenta a mortalidade, morbidade e custos do tratamento. Neste sentido, novas estratégias clínicas são necessárias e urgentes, e dentre elas, a vetorização de antibióticos através de campo magnético tem se mostrado uma técnica promissora. O direcionamento magnético permite, além da entrega seletiva do fármaco no local da infecção, a ampliação local de campo magnético altíssimo, alterando o microambiente bacteriano. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar a ação do antibiótico, Oxacilina, vetorizado com nanopartículas magnéticas no tratamento de infecção de pele e subcutâneo de rato, provocada por *Staphylococcus aureus* multirresistente. As partículas magnéticas sintetizadas, ligadas ao fármaco e caracterizadas foram testadas *in vivo* frente à modelos de infecção com cepa MRSA CCBH 4395 (Fiocruz - RJ) e os resultados indicaram alta concentração do fármaco radiomarcado no local da infecção e revelaram redução significativa no crescimento de UFC em amostras dos animais tratados com o sistema de fármaco magnético, e mesmo daqueles tratados unicamente com o vetor magnético. Esses resultados promissores apontam, talvez, para um novo paradigma de tratamento antibiótico sem moléculas químicas, mas pela ação do campo magnético.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, magnetita, MRSA, ratos.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* are historically recognized as important human pathogens. They are spherical and Gram positive bacteria constituting the normal microbiota of the skin and mucosa of most mammals, including humans. Organic factors such as host immunity and integrity of the skin barrier, as well as factors innate to the microorganism as virulence, contribute to the initial symbiosis condition becoming a pathogenic relationship, resulting from simple cutaneous and subcutaneous conditions to severe systemic infections. Despite its intrinsic virulence, since the use in the clinical practice of Penicillin in the 1940s, these bacteria began to develop resistance. The increase of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) insensitive to the multiple antibiotics employed in clinical practice is a worrying phenomenon, since, in addition to reducing the therapeutic options, it has contributed to the worldwide dissemination of this agent, threatening public health as it increases mortality, morbidity and treatment costs. In this sense, new clinical strategies are necessary and urgent, and among them, the vectorization of antibiotics through magnetic field has been shown to be a promising technique. Magnetic targeting allows, in addition to the selective delivery of the drug at the site of infection, the local magnification of a very high magnetic field, altering the bacterial microenvironment. In this sense, the present study aimed to study the action of the antibiotic, Oxacillin, vectorized with magnetic nanoparticles in the treatment of skin and subcutaneous rat infections caused by multiresistant *Staphylococcus aureus*. The synthesized, drug bound and characterized magnetic particles were tested *in vivo* against models of infection with MRSA strain CCBH 4395 (Fiocruz - RJ) and the results indicated high concentration of the radiolabeled drug at the site of infection and revealed a significant reduction in the growth of CFU in samples from animals treated with the magnetic drug system, and even from those treated solely with the magnetic vector. These promising results point, perhaps, to a new paradigm of antibiotic treatment without chemical molecules, but through the action of the magnetic field.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, magnetite, MRSA, rats.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

**Figura 1** - Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas com as 3 concentrações de magnetita padrão: a) e e) 10 mg/ml; b) e f) 20 mg/mL; c) e g) 30 mg/mL. A primeira linha contém as placas teste inoculadas com o microrganismo (a), b), c)) e a segunda linha contém os controles negativos de crescimento, sem inóculo (e), f), g)).

**Figura 2** - Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas contendo magnetita@Oxacilina: a) placa teste inoculadas com o microrganismo e b) controle negativo de crescimento, sem inóculo.

**Figura 3** - Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas: a) controle de crescimento e b) controle positivo (inóculo + Cefoxitina - de acordo com a padronização / CLSI para confirmar a resistência da *S. aureus* MRSA).

**Gráfico 1** – Porcentagem de redução de MTT por células 3T3 em concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/mL em culturas de 24, 48 e 72 horas. Controle de células sem adição de amostra (magnetita@Oxacilina).

**Gráfico 2** – Porcentagem de redução de MTT por células 3T3 em concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/mL em culturas de 24, 48 e 72 horas. Controle de células sem adição de amostra (magnetita).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Descrição das amostras avaliadas nos experimentos com cepa de MRSA CCBH 4395.

**Tabela 2** – Desenho experimental da quantidade de animais utilizados e para qual finalidade.

**Tabela 3** – Dosagens a serem realizadas nas amostras de sangue coletadas das cobaias.

**Tabela 4** - Sumarização dos resultados obtidos com cultivo de MRSA 4395 CCBH.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>3T3</b>	<b>Células fibroblásticas de camundongo</b>
<b>6APA</b>	<b>Ácido 6aminopenicilânico</b>
<b>ALT</b>	<b>Alanina –aminotransferase (ou TGP)</b>
<b>AST</b>	<b>Aspartato-aminotransferase (ou TGO)</b>
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>ATI</b>	<b>Radioatividade incorporada</b>
<b>BIOPOL</b>	<b>Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais</b>
<b>CB</b>	<b>Centro de Biociências</b>
<b>CCBH</b>	<b>Coleção de Cultura de Bactéria de Origem Hospitalar</b>
<b>CCD</b>	<b>Cromatografia de Camada Delgada</b>
<b>CCS</b>	<b>Centro de Ciências da Saúde</b>
<b>CIM</b>	<b>Concentração Inibitória Mínima</b>
<b>CLSI</b>	<b>Clinical and Laboratory Standards Institute</b>
<b>CONCEA</b>	<b>Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>DPAT/CCS</b>	<b>Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde</b>
<b>DRX</b>	<b>Difração de Raios-X</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilenodiamino tetraacético</b>
<b>Fc</b>	<b>Fragmento cristalizável</b>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>Magnetita</b>
<b>FTIR</b>	<b>Fourier Transform Infrared</b>
<b>g</b>	<b>Gramas</b>
<b>GM</b>	<b>Grupo de Magnetismo</b>
<b>HEK 293</b>	<b>Células epitelial renal humana</b>
<b>IgG</b>	<b>Imunoglobulina G</b>
<b>IPTM</b>	<b>Infecções de pele e tecidos moles</b>
<b>IV</b>	<b>Intravenoso</b>
<b>kg</b>	<b>Quilograma</b>
<b>LEIAC</b>	<b>Laboratório de Ensaio Imunológicos, Antimicrobianos e de Citotoxicidade</b>
<b>MTT</b>	<b>Brometo de [3(4,5dimetiltiazol2yl)2,5difeníl tetrazolium,</b>



	<b>ensaio para verificação de citotoxicidade celular</b>
<b>MRSA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes</b>
<b>MRSA-CA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina associados a infecções comunitárias</b>
<b>MRSA-HA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina associados a infecções hospitalares</b>
<b>mBq</b>	<b>Milibecquerel</b>
<b>mg</b>	<b>Miligrama</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>mT</b>	<b>Militesla</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloreto de Sódio</b>
<b>nm</b>	<b>Nanômetro</b>
<b>PBP's</b>	<b>Proteína Ligadora de Penicilina</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido Ribonucléico</b>
<b>ROS</b>	<b>(Reactive Oxygen Species) Espécies reativas do oxigênio</b>
<b>SFB</b>	<b>Soro fetal bovino</b>
<b>TSB</b>	<b>(Trypticase soy broth) Caldo Soja Trypticaseína</b>
<b>TGO</b>	<b>Transaminase Glutâmico Oxalacética (ou AST)</b>
<b>TGP</b>	<b>Transaminase Glutâmico Pirúvica (ou ALT)</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades Formadoras de Colônias</b>
<b>UFRN</b>	<b>Universidade Federal do Rio Grande do Norte</b>
<b>UTI</b>	<b>Unidade de Tratamento intensivo</b>
<b>VSM</b>	<b>Magnetização de Amostra Vibrante</b>
<b>µg</b>	<b>Micrograma (mcg)</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>µm</b>	<b>Micrometro</b>

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	v
AGRADECIMENTOS .....	vi
EPÍGRAFE.....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS .....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. JUSTIFICATIVA .....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 - Objetivo geral.....	25
3.2 – Objetivos específicos.....	25
4. MÉTODOS .....	26
4.1 - Síntese de Magnetita padrão .....	26
4.2 - Complexação magnetita@Oxacilina.....	26
4.3 – Ensaios <i>in vitro</i> .....	26
4.3.1 – Ensaios com bactérias .....	26
4.3.2 – Ensaios com células eucarióticas.....	29
4.4 – Ensaios <i>in vivo</i> .....	30
4.4.1 – Estudo de Biodistribuição .....	31
4.4.2 – Estudo da atividade antimicrobiana .....	32
4.4.3 – Dosagens bioquímicas .....	33
4.4.3 – Estudo histopatológico .....	34
4.5 – Análise estatística.....	34
5 - ARTIGOS PRODUZIDOS .....	36
6 - COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES.....	77
6.1 – Projeto original .....	77
6.2 - Multidisciplinaridade.....	82
6.3 - Evolução intelectual .....	82
6.4 - Metas atingidas e perspectivas.....	83
6.5 – Produção Intelectual .....	84
6.6 – Considerações finais.....	88
7 - REFERÊNCIAS.....	89

8 – ANEXO .....	96
8.1 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato sobre bactérias piogênicas, organizadas em aglomerados de cocos, que poderiam causar doenças no homem é de 1880, do cirurgião escocês Sir Alexander Ogston. Além de denomina-las “*staphylococcus*”, cacho de uvas do grego *staphyle*, o médico fez experimentos cuidadosos observando sua proliferação e os sintomas da doença que causavam (1).

Atualmente, sabe-se que *Staphylococcus aureus* são bactérias gram-positivas esféricas, de aproximadamente 1 µm de diâmetro, que devido separação celular incompleta ficam com o aspecto de cacho de uvas descrito por Ogston (2). Essas são identificadas frente a testes bioquímicos positivos para catalase e coagulase, crescem em meio contendo até 10 % de cloreto de sódio e temperatura ótima entre 35 e 40°C (1, 3).

O gênero *Staphylococci* é encontrado colonizando animais de sangue quente, e, em associação com outras bactérias gram-positivas exercem papel importante de metabolismo de produtos da pele e glândulas que poderiam servir de substrato para microrganismos patogênicos (1). Várias espécies desse gênero são constituintes da microbiota do humano saudável (4-6). Entretanto, o *S. aureus* é frequentemente relacionado como um dos mais importantes patógeno oportunista, hábil em colonizar, invadir e causar dano ao hospedeiro provocando inúmeras infecções e manifestando-se, inclusive, na ausência de fatores predisponentes do hospedeiro (7-9). Vale ressaltar que estudos recentes tem demonstrado que alguns indivíduos são geneticamente mais susceptíveis a desenvolver infecções por *S. aureus*, inclusive infecções de repetição (10-12).

A resposta imune do organismo estabelece gargalos de sobrevivência para a população bacteriana, limitando sua capacidade de crescimento e reduzindo sua diversidade. Essa têm os neutrófilos e macrófagos como primeira linha de defesa. Contudo, o *S. aureus* possui inúmeros mecanismos de escape para sobreviver à investida do sistema imunológico (2, 7, 13, 14), como ancoradores de superfície que aderem ao tecido ou matriz extracelular,

impedindo o *clearance* da bactéria (15); síntese de moléculas que impedem a ação do sistema imune por bloqueio da cascata de identificação e opsonização do complemento (16); liberação de inibidores da quimiotaxia das células de defesa do organismo (17, 18); produção de proteínas que se ligam à porção Fc de anticorpos IgG, impedindo o reconhecimento bacteriano (19); formação de biofilmes (20); e a liberação de substância que promovem a lise celular (2, 10, 14, 21). Estudos desses mecanismos têm sido essencial para pesquisas no campo da imunoterapia (10).

Devido à alta eficiência em evadirem-se aos mecanismos de defesa do organismo, contágios por *S. aureus* são associadas a altas taxas de morbimortalidade (14). Tendo nas infecções de pele e tecidos moles – IPTMs, os eventos de maior frequência observados com esse patógeno (6, 14).

A disseminação da bactéria pode acontecer pela formação de aerossol, perfazendo cerca 10 % dos casos (2). Mas, é pelas mãos que ocorre a principal forma de transmissão, especialmente no ambiente hospitalar, o que rendeu, inicialmente, a notoriedade de problema nosocomial (22-24).

Durante a década de 50 apareceram os primeiros relatos de resistência (25). O consumo crescente e indiscriminado de antibióticos criou o ambiente propício para o aparecimento de mutações, e, em menos de 10 anos do descobrimento da Penicilina, a resistência do *S. aureus* já preocupava (26).

Inicialmente, a produção de enzimas extracelulares, penicilinases, capazes de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico, farmacóforo da Penicilina, foi observada (27). Mas, o isolamento do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) tornou possível a produção de Penicilinas semissintéticas com proteção do anel contra a ação hidrolítica das penicilinases (28). Os primeiros desses agentes antimicrobianos disponíveis para uso clínico foram a Meticilina, comercializado nos EUA, e seu análogo comercializado no Brasil, a Oxacilina, que solucionaram temporariamente o problema já que em poucos anos foi isolado *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) (28, 29).

A resistência à Meticilina foi associada a alterações nas PBP's (*Penicillin-Bound Protein*), proteínas transpeptidases essenciais para biossíntese de parede celular, na qual os fármacos  $\beta$ -lactâmicos se ligavam.

Então, a codificação de PBP's com baixa afinidade de ligação à Penicilina (PBP2a) impediu o bloqueio  $\beta$ -lactâmico fazendo a bactéria resistir mais uma vez aos fármacos utilizados (27, 30).

Esforços concentrados para sobrepor o problema da resistência levaram ao desenvolvimento de substitutos da Meticilina com melhor absorção oral (Cloxacilina, Flucloxacilina e Cefalosporinas) que se mostraram importantes no tratamento de cepas resistentes, tanto que durante os anos 80 e 90, poucos relatos de casos de MRSA foram observados pelo mundo (22). Mas, novas mutações e a facilidade de aquisição de genes que conferem multirresistência, conduziram o *S. aureus* ao título de patógeno mais prevalente causador de infecção hospitalar em todo mundo (31). Entretanto, apesar da severidade do tema, no Brasil ainda são poucos os relatos científicos sobre a incidência e prevalência de MRSA (32).

Os fármacos em uso atual na terapia anti-MRSA são: Vancomicina, Teicoplanina, Arbecacina, Linezolida e Daptomicina, medicamentos de alto custo e que estão sendo cada dia mais requisitados na clínica (33-38). O tratamento de microrganismos multirresistentes aumenta muito os custos hospitalares pelo uso de múltiplos antibióticos caros e hospitalização prolongada, além do custo social pela falta de trabalho, sofrimento e morte (39, 40).

As estratégias de manejo de infecções por bactérias multirresistentes têm direcionado esforços na descoberta de metodologias para diagnóstico diferenciado de clones de alto risco, ou de marcadores de virulência (9). Na terapêutica, a pesquisa tem procurado novos alvos específicos nas bactérias e desenvolver terapias de imunização (41, 42), até então sem muito êxito; entretanto o desenvolvimento de fármacos análogos e o emprego de terapia adjuvante têm aberto novos horizontes (9, 33, 43).

O estudo de novas moléculas antibacterianas é de grande importância para a saúde, contudo, a perspectiva de curto tempo de mercado devido à resistência, não é o estímulo adequado para as empresas investirem em Pesquisa e Desenvolvimento de antibióticos realmente novos (44). Nesse sentido, a produção de análogos (moléculas com alterações nas cadeias

laterais de farmacóforos consagrados) e o resgate de moléculas antigas parecem os caminhos menos dispendiosos (33, 45).

Outra alternativa, a administração de adjuvantes, consiste na utilização de moléculas com propriedade antimicrobiana, ou não, que melhorem a atividade farmacológica do princípio ativo. Nesse cenário a utilização da nanotecnologia tem avançado de maneira proeminente (46, 47), e partículas diminutas de metais e óxidos metálicos têm sido investigadas como adjuvantes, em particular pela observação de alguma atividade antimicrobiana, especialmente por nanopartículas de prata (*Ag*), alumínio (*Al*), óxido de ferro ( $Fe_3O_4$ ), óxido de titânio ( $TiO_2$ ) óxido de cobre (*CuO*) e óxido de zinco (*ZnO*) (48, 49).

O óxido de ferro, magnetita ( $Fe_3O_4$ ) é um material que tem sido bastante pesquisado para aplicações na medicina, pois sua atividade magnética permite guiar o fármaco para o local desejado no corpo (50, 51). Além disso, em escala nanométrica (10 e 20 nm), o magnetismo dessas partículas adquire característica particular, conhecida como superparamagnetismo, o atributo de se magnetizar em presença de um ímã sem reter magnetização residual quando cessa a fonte magnética, e é nessas dimensões onde tem se observado seu potencial antimicrobiano (52, 53).

A magnetita superparamagnética é de interesse para aplicações *in vivo* de materiais magnéticos, pois previne: a exposição do organismo à campos magnéticos por períodos prolongados e a tendência de aglomeração desse material (50). Também permite a aplicação de aquecimento seletivo num procedimento conhecido como hipertermia magnética (49). O tamanho reduzido tem vantagem adicional de admitir a administração por via intravenosa, que não sofre efeito de primeira passagem hepático ou perdas pelo processo de absorção (48, 54).

O mecanismo da ação antimicrobiana das nanopartículas magnéticas não está totalmente elucidado. Postula-se que essas possam agir por duas vias: (a) desestabilização do potencial da membrana celular (52), e (b) produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (41, 48, 55-58). Vale salientar que tais mecanismos não são específicos para célula bacteriana,

podendo ser responsável pelos relatos controversos de citotoxicidade associada a magnetita (59-61).

Dentre as possibilidades vislumbradas, acredita-se que os mecanismos físicos - ação do campo magnético e aquecimento – sejam mais relevantes para emprego na antibioticoterapia, uma vez que as estruturas da resistência têm se baseado na atividade química das moléculas (48, 49).

Os danos a microrganismos pela ação de campo magnético têm sido reportados como alterações na síntese ou transcrição do DNA e na concentração de hormônios e de moléculas essenciais (62, 63). O mecanismo exato pelo qual isso acontece não está claro, porém as hipóteses apontam para atuação direta do campo sob as proteínas transmembrana que formam o canal iônico, ou ainda sobre as partículas iônicas que atravessam estes canais (64, 65).

A outra possibilidade, o aquecimento (à temperaturas de 43°C) gerado pelas partículas magnéticas em resposta à um campo magnético alternado (hipertermia magnética), também tem tido relatos positivos de destruição de bactérias em feridas infectadas (54, 66, 67); a redução no número de células procarióticas viáveis e na adesão de *S. aureus*, inclusive multirresistentes, crescidos em cateteres modificados com nanopartículas magnéticas (68-70).

Diante a crescente problemática da resistência de *S. aureus* e do promissor uso de magnetita superparamagnética como adjuvante na terapia antimicrobiana, nós do Grupo de Magnetismo e Materiais Magnéticos da UFRN (GM), com tradição no estudo de entrega localizada de fármacos com magnetita, em atividades teóricas/simulação e experimentais de desenvolvimento, caracterização e padronização do vetor (71-74), desenvolvemos esse trabalho com objeto de testar uma de terapia multifuncional para tratamento de infecções causadas por MRSA, com testes em organismos vivos - bactérias, células eucarióticas e animais – para comprovar eficácia e verificar toxicidade e segurança do nosso produto, e sugerir uma quebra de paradigma: o emprego de tratamento antimicrobiano com embasamento físico.



## 2. JUSTIFICATIVA

As infecções bacterianas estão entre as afecções mais comuns atualmente. Apesar de muitas terem um bom prognóstico e boas opções de tratamento, o aparecimento de cepas patogênicas resistentes aos antibióticos disponíveis em nosso arsenal terapêutico, associado à lentidão e/ou desinteresse das empresas em investir dinheiro e tempo em pesquisa e desenvolvimento dessa classe de medicamento, gera dificuldades em combater as infecções. Resta à pesquisa universitária propor e experimentar novas alternativas que possam atrair interesse industrial: rotas de baixo custo de produção de novas moléculas e mesmo reutilização de moléculas consagradas; compostos de ação superior aos fármacos disponíveis no mercado; escalabilidade e, principalmente, maior vida útil de comércio são características almejadas. O presente trabalho propõe a aplicação de sistema de: **VETORIZAÇÃO** (entrega localizada e altamente concentrada), **MAGNÉTICA** (que pode alterar o microambiente em que a bactéria está inserida, interferindo em processos vitais) e **NANOMÉTRICO** (com potencial antibiótico intrínseco e propriedades de interesse para aplicações *in vivo*, superparamagnetismo), para direcionamento de Oxacilina (fármaco “consagrado” que se deseja resgatar) para tratamento, por múltipla ação, de cepas multirresistentes, em particular MRSA, com interesse de conciliar os benefícios que a tecnologia gera com o mínimo acréscimo de custo para terapia farmacológica em sistemas de assistência à saúde e na sociedade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral

- Avaliar sistema desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, magnetita@Oxacilina, quanto à atividade antimicrobiana frente à cultura de bactéria *Staphylococcus aureus* multirresistente, e a toxicidade celular.

#### 3.2 – Objetivos específicos

- Realizar avaliação *in vitro*, da atividade antimicrobiana do sistema magnetita@Oxacilina;
- Realizar avaliação *in vitro*, da atividade citotóxica do sistema magnetita@Oxacilina frente a linhagens celulares imortalizadas;
- Promover marcação do sistema magnético com isótopo radioativo Tc99m para estudo de distribuição, *in vivo*, em ratos Winstar machos;
- Executar os testes *in vivo* de capacidade de vetorização magnética;
- Executar os testes *in vivo* de atividade antibiótica;

## 4. MÉTODOS

### 4.1 - Síntese de Magnetita padrão

A produção da magnetita padrão foi realizada segundo protocolo de síntese *top-down* por moagem de alta energia, conforme protocolo publicado em trabalho anterior, Carvalho, J.F., et al., 2016 (75).

A reação química da síntese, utilizando como reagentes água deionizada e pó de ferro metálico (Merk) é representada a seguir:



### 4.2 - Complexação magnetita@Oxacilina

A magnetita foi colocada para reagir com o fármaco (Oxacilina cristalina) na proporção de 1:1 peso molecular em Moinho de Bolas Planetário (Fritsch Pulverisette 6) equipado com cadinho de aço inoxidável de 45 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo dez bolas (do mesmo material do recipiente) de 10 mm de diâmetro, durante 10 horas (75).

O produto obtido foi caracterizado por ensaios de:

- Difração de Raios-X (DRX) – operado no modo de reflexão com fonte de raios-X Cu K $\alpha$  de a faixa de varredura foi de  $\theta - 2\theta$ .
- Espectrometria de Infravermelho (FT-IR - Fourier Transform Infrared) - faixa compreendida entre 780 e 2500nm (ou 12,8 a 4000 cm<sup>-1</sup>) utilizada para identificação das interações que ocorrem numa amostra.
- Magnetização de Amostra Vibrante (VSM) – operando à temperatura ambiente e em campos de 0 à  $\pm 1,2$  T.

### 4.3 – Ensaios *in vitro*

#### 4.3.1 – Ensaios com bactérias

As partículas sintetizadas foram testadas frente a cepa MRSA, *Staphylococcus aureus* (CCBH 4395), procedente da Coleção de Bactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ), gentilmente cedida ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências (UFRN) sob a responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Sousa Andrade. A **Tabela 1** traz a descrição das amostras examinadas.

**Tabela 1:** Descrição das amostras avaliadas nos experimentos com cepa de MRSA CCBH 4395.

Amostra	Composição	Concentração
1	Padrão de Magnetita	5 mg em 500 µl de água destilada; 10 mg em 500 µl de água destilada. 15 mg em 500 µl de água destilada.
2	Magnetita@Oxacilina	22 mg em 200 µl de água destilada

Fonte: própria

O valor de magnetita@Oxacilina empregada (0,11 mg/µl) foi calculado de modo que o teor de magnetita ficasse o mais próximo da amostra intermediária de magnetita padrão testada (0,02 mg/µl). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.3.1.1 – Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de cultura bacteriana (MRSA CCBH 4395). Com o auxílio de uma alça de platina colônias de *S. aureus* foram adicionadas a 3 mL de solução salina estéril e o inóculo foi ajustado a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), segundo protocolo próprio de preparo de inóculo.

#### 4.3.1.2 – Aplicação da amostra

As amostras-teste foram solubilizadas em água bidestilada e, com auxílio de pipeta automática, 1 mL de cada amostra foi despejada sob a superfície da placa de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton (76, 77). As porções foram uniformemente espalhadas com auxílio de alça de Drigalski e aguardou-se cerca de 15 minutos para que a placa estivesse completamente seca.

#### 4.3.1.3 – Semeio das placas-teste

A suspensão bacteriana previamente preparada foi semeada nas placas com as amostras utilizando uma alça calibrada (1  $\mu$ L). A técnica de semeio consistiu em uma estria vertical a partir da qual foram feitas estrias horizontais, sem tocar uma na outra para a contagem de colônias. Paralelamente foram preparados os controles experimentais.

#### 4.3.1.4 – Preparo dos controles positivo e negativo

O controle positivo é o padrão que confirma a sensibilidade do *S. aureus* à Meticilina. Com um swab estéril espalhou-se o inóculo, por distensão, na superfície do meio de cultura, posteriormente aguardando cerca de 15 minutos até que a placa estivesse completamente seca. Então, um disco de Cefoxitina (30 mcg) foi colocado no centro da placa, pressionando levemente para fixação.

A Cefoxitina é o antibiótico padronizado pelo CLSI para confirmar a resistência da cepa MRSA, portanto foi o fármaco empregado para controle positivo (78, 79).

O controle negativo é o padrão que testa a esterilidade do meio e da amostra. Cada diluição das amostras testadas, individualmente, foi plaqueada

usando a alça de Drigalski no meio de cultura Muller Hinton deixado sem inóculo bacteriano.

Finalmente, o controle de crescimento foi realizado através da inoculação de 1 µL da suspensão bacteriana com alça calibrada, semeando o microrganismo em estrias no meio Muller Hinton.

Todas as placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (Sterilifer, SX1.0DTMC) a 37°C, por 24 horas. Após esse período a contagem de UFC foi realizada manualmente. Todos os testes foram realizados em triplicatas, dentro de cabine biológica no Laboratório de Ensaio Imunológicos, Antimicrobianos e de Citotoxicidade (LEIAC) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (CB/UFRN).

#### 4.3.2 – Ensaio com células eucarióticas

Concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 mg/mL de magnetita@Oxacilina, previamente esterilizadas por calor seco, foram preparadas de maneira asséptica em solução fisiológica estéril para os testes de citotoxicidade, sob avaliação do metabolismo de sais de tetrazolium por células viáveis, técnica do MTT - [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio].

O método escolhido mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazolium, através das desidrases mitocondriais, a cristais de formazan, um composto de coloração roxo. A taxa de conversão é avaliada colorimetricamente, onde quanto mais intensa a coloração, maior o número de células viáveis (metabolicamente ativas).

Linhagem celulares 3T3 e HEK-293, e toda estrutura para manipulação de células foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais - BIOPOL, sob a responsabilidade do prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica, CB/UFRN.

Células fibroblásticas de camundongo (Mouse embryonic fibroblastic cells NIH/3T3 ATCC ® CRL-1658™) e células embrionárias de rim (HEK-293) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos

(estreptomicina e penicilina 15 mg/L de meio), sendo mantidas em ambiente estéril em câmara de  $CO_2$ .

Posteriormente à confluência, as células foram plaqueadas, em triplicata, na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de cultura de 96 poços e deixadas em repouso, em estufa à  $37^\circ C$  com 5 % de  $CO_2$ , para crescerem por 24 horas. Em seguida, foi realizado o período de carenciamento: o meio de cultivo é aspirado e substituído por DMEM sem SFB, o qual é deixado por período adicional de 24 horas. Ao fim de tais procedimentos, as células foram expostas às amostras de material magnético e do sistema magnetita@Oxacilina (100  $\mu L$ ), nas concentrações anteriormente relatadas pela diluição dos materiais em meio de cultura com SFB. O grupo controle foi feito com a adição do meio suplementado.

A viabilidade celular foi avaliada por técnica colorimétrica realizada em períodos de 24, 48 e 72 horas subsequente. Os meios com e sem amostra foram aspirados, adicionando-se 100  $\mu L$  de solução de MTT à 1 mg/mL, deixando agir por 4 horas ao abrigo da luz. Transcorrido esse tempo o sobrenadante é removido e adicionados 100  $\mu L$  de etanol para solubilização dos cristais coloridos formados (lenta agitação por 15 minutos), e a leitura foi processada à temperatura ambiente sob comprimento de onda de 570 nm em Espectrofotômetro de microplacas (Epoch BioTek, Califórnia/USA).

#### 4.4 – Ensaio *in vivo*

Os ensaios *in vivo* utilizaram a cepa de *S. aureus* MRSA CCBH 4395. A bactéria foi repicada, do estoque, em meio de cultivo ágar manitol salgado, 24 horas antes do experimento, e incubada a  $37^\circ C$ . O preparo do inóculo se deu pela ressuspensão de colônias de MRSA em soro fisiológico estéril, ajustando a concentração de UFC/mL comparando a turbidez com a escala 0,5 de McFarland para inoculação em cobaias.

Foram utilizados como animais-teste ratos Wistar, machos adultos de mesma linhagem, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) como modelos de

infecção por inoculação intramuscular de MRSA. A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição avaliou e aprovou o protocolo (051-2014), sendo todos os experimentos realizados com base nas diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e da Lei nº 11.794 (CONCEA).

Ratos Wistar com 3 meses de idade foram selecionados para os experimentos. Sendo o protocolo empregado para a manipulação dos animais: anestesia com injeção intraperitoneal de 0,2 mL /100 g de uma solução com 1 mL de Cetamina (50 mg) e 1 mL de Xilazina (20 mg).

O total de animais utilizados e em quais experimentos é trazido na Tabela 2.

**Tabela 2:** Desenho experimental da quantidade de animais utilizados e para qual finalidade.

n	Amostra	Ensaio
3	Magnetita@Oxacilina marcada com Tc99m	Biodistribuição.
3	Padrão de Magnetita	Controle de atividade antimicrobiana do vetor.
3	Magnetita@Oxacilina	Produto em teste
3	Solução salina estéril 0,9 %	Branco

Fonte: própria

#### 4.4.1 – Estudo de Biodistribuição

As amostras de magnetita@Oxacilina foram marcadas com pertecnetato de sódio ( $Na\ 99mTcO_4$ ) para avaliação da distribuição do fármaco pelo organismo (grupo radiomarcado), segundo protocolo modificado de Oh e Col.s (80).

Na complexação de  $99mTcO_4$ @Magnetita@Oxacilina, foram empregados 100 µL (1 g/L) de solução cloreto estanhoso ( $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ) como



agente redutor em 3 mL de magnetita@Oxacilina em solução salina estéril (1,5 g/mL), *Solução 1*.

1000 MBq/mL de  $^{99m}\text{TcO}_4$ , recém eluído em 1 mL de solução salina estéril é adicionado *Solução 1*, e a mistura é acondicionada em recipiente de vidro e aquecida em banho-maria por 10 minutos.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, a solução é testada quanto à eficiência de ligação por cromatografia de camada delgada (CCD) e é empregada de imediato nos animais.

O complexo formado foi administrado através da artéria femoral direita, cirurgicamente dissecada e isolada para tal finalidade.

Um ímã circular vazado de 15 mm de diâmetro foi suturado face externa das coxas direita dos animais e posteriormente administrado o antimicrobiano-vetorizável marcado.

Amostras de fígado, rim, pulmão e os músculos das coxas com ímã e sem ímã foram removidos após sacrifício das cobaias, pesados em balança analítica de precisão e submetidos à avaliação da atividade radioativa através do contador gama automático (Wizard, PerkinElmer, Finlândia). A radioatividade foi avaliada em percentual de atividade radioativa por grama de tecido (% ATI/g).

#### 4.4.2 – Estudo da atividade antimicrobiana

As cobaias foram preparadas para modelo de infecção pela administração de 200  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano na musculatura da face externa das coxas direita e esquerda do animal.

Após a inoculação, foi implantados, em cada animal, um ímã circular, vazado de magnetização no centro e na superfície do ímã de 5 e 23 mT respectivamente. *A posteriori* foi ministrado 200 mg/kg (81) do nosso produto de antibiótico vetorizável (Magnetita@Oxacilina) em 2 doses, com intervalo de 6 horas, por injeção na veia femoral.

Transcorridas 24 horas, os animais foram avaliados e novamente anestesiados para coleta de aproximadamente 5 mL de sangue por punção

cardíaca, para dosagens bioquímicas. Os animais foram eutanaziados com dose letal de cloreto de potássio 19,1 % IV por Kg de animal.

Utilizando técnica estéril, a pele de ambas as coxas das cobaias foi incidida, tendo a musculatura exposta. Em seguida, amostras de secreção da infecção instalada foram colhidas, com swab estéril, fornecendo material para a cultura microbiológica. Sendo semeados, em estrias, em placas com meio de cultura ágar-sangue, incubados por 24 horas a 37°C para contagem de unidades formadoras de colônias.

#### 4.4.3 – Dosagens bioquímicas

As amostras de sangue coletadas de cada animal foram fracionadas em dois tubos, um contendo anticoagulante (EDTA) e um sem anticoagulante para separação do soro.

O sangue do tubo com EDTA foi homogeneizado delicadamente por inversão, de 5 a 8 vezes para prevenir a hemólise e coagulação, essas amostras foram encaminhadas para análises de hemograma, enquanto os tubos sem anticoagulante foram deixados coagular à temperatura ambiente e em seguida foram centrifugados a 1.500 rpm em centrífuga de tubos de ensaio (Excelsa II Modelo 206-BL, Fanem), por um período de 10 minutos, para total retração do coágulo. O soro foi então aspirado e transferido para tubo limpo e identificado, para envio para análise (Tabela 3).

A Tabela 3 traz as dosagens a serem realizadas com as frações e a finalidade das análises.

**Tabela 3:** Dosagens a serem realizadas nas amostras de sangue coletadas das cobaias.

Dosagens	Amostra	Avaliação
Hemograma	Sangue total com anticoagulante	Anormalidades nas células sanguíneas
Ureia	Soro	Função renal

Creatinina	Soro	Função renal
Alanina-aminotransferase (ALT ou TGP)	Soro	Indicador altamente específico de dano hepático
Aspartato-aminotransferases (AST ou TGO)	Soro	Desordem muscular e/ou cardíaca

---

Fonte: própria

#### 4.4.3 – Estudo histopatológico

Para análise histomorfométrica, amostras de tecido das coxas, fígado, pulmão e rim, excitadas após morte das cobaias, foram fixadas em formol 10 % e desidratadas em uma série gradual de etanol.

Os cortes histológicos de 5 micra e a coloração com hematoxilina-eosina foram realizadas em parceria com o Departamento de Patologia (DPAT/CCS). Os dados histopatológicos da reação inflamatória, necrose de tecido e hemorragia foram examinados por patologista experiente, Prof.<sup>a</sup> Keyla Borges Ferreira Rocha, sem conhecimento prévio do grupo ao qual pertenciam as lâminas (Microscópio óptico Plympus BX50, fotografados em câmera Olympus DP20). Em seguida, análise quantitativa foi realizada utilizando o sistema computadorizado de análise de imagens (Image-Pro Plus versão 6.0, Media Cybernetics, USA).

#### 4.5 – Análise estatística

Para exame estatístico foi utilizada a análise de variância (ANOVA) entre os grupos, aceitando como limites: erro tipo I de 0,05 e poder 80% de detectar diferenças estatisticamente significantes.

A significância das diferenças observadas entre os grupos tratados e não tratados foi calculada pelo ANOVA one-way, e, posteriormente, pelo teste de Tukey.

Os resultados dos escores foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas através da utilização do software SPSS (versão 11,5; SPSS Inc., Chicago, III, EUA).

## 5 - ARTIGOS PRODUZIDOS

**5.1 Artigo: Oxacillin magnetically targeted for the treatment of Methicillin-Resistant *S. aureus* infection in rats.**

Revista: Acta Cirúrgica Brasileira

*Print version* ISSN 0102-8650 *On-line version* ISSN 1678-2674

Acta Cir. Bras. vol.32 no.1 São Paulo Jan. 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170106>

Fator de Impacto 2015/2016: 0,58

Quali/CAPES 2013-2016: B3 MEDICINA II

(<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>)

**Participação como 1ª autora em artigo científico publicado como produto da tese.**



## Oxacillin magnetically targeted for the treatment of Methicillin-Resistant *S. aureus* infection in rats<sup>1</sup>

Juliana Fernandes de Carvalho<sup>1</sup>, Ítalo Medeiros de Azevedo<sup>1</sup>, Keyla Borges Ferreira Rocha<sup>1</sup>, Aldo Cunha Medeiros<sup>2</sup>, Artur da Silva Carriço<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil. Acquisition and interpretation of data, technical procedures, manuscript preparation.

<sup>2</sup>Full Professor, Chairman, Nucleus of Experimental Surgery, UFRN, Natal-RN, Brazil. CNPq/PQ.2 Fellowship. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; analysis and interpretation of data; critical revision.

<sup>3</sup>Full Professor, Department of Theoretical and Experimental Physics, UFRN, Natal-RN, Brazil. CNPq/PQ.1D Fellowship. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; analysis and interpretation of data; critical revision.

### Abstract

**Purpose:** To evaluate the effect of oxacillin bonded to magnetic nanoparticles in local infection model in rat.

**Methods:** Twelve Wistar rats weighing 290±18g were randomly divided into four groups (n=6, each) and all rats had a magnet ring sutured on their right thighs. In the biodistribution group rats 0.1mL of <sup>99m</sup>Tc-magnetite (0.66 MBq) was injected i.v and after 30 minutes, biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-magnetite was evaluated in right and left thighs. The other groups were inoculated with MRSA in each thigh muscles. Group 1 rats were injected i.v. with magnetite, group 2 with *Magnetite + Oxacillin*, group 3 with saline twice a day. After 24 hours samples of muscle secretion were harvested for microbiological analysis; muscle, lungs and kidneys for histology.

**Results:** <sup>99m</sup>Tc-magnetite uptake was three-fold higher in right thigh muscles (with external magnet) than in the left. In magnetite and oxacillin-magnetite groups, bacterial/CFU was significantly lower in thigh muscles than in saline-controls. The inflammatory reaction in muscles and lungs was significantly lower in oxacillin-magnetite group-rats than in other groups (p<0.001).

**Conclusion:** This study confirms the potential antimicrobial activity of magnetic nanoparticles for Methicillin-Resistant *S. aureus* strains, which in addition to concentrate the antibiotic at the infection site, positively influenced the treatment.

**Key words:** Magnetic Field Therapy. Magnetite Nanoparticles. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Rats.

## ■ Introduction

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a common microorganism carried by approximately 30% of all humans, asymptotically in their nasopharynx and/or other body sites<sup>1</sup>. It can cause invasive and life-threatening infections, despite the availability of effective antimicrobial agents to treat diseases such as pneumonia, endocarditis, and septicemia<sup>2</sup>. In general, pathogenic *S. aureus* are the most frequently isolated pathogens from infected biomaterial implant surfaces<sup>3,4</sup>. Over the years, continued selective use of different drugs has resulted in resistance mechanisms that led to multidrug resistance<sup>5</sup>. Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) is one of the bacteria resulting from this selective pressure. It is resistant to a number of widely used antibiotics. Currently, all available B-lactams are considered to be inactive against MRSA strains<sup>6</sup>.

The reduction of efficacy of drugs due to the emergence of resistant microbes makes the treatment more slow and expensive<sup>6</sup>. One of the most promising strategies for overcoming microbial resistance is the use of nanoparticles (NP)<sup>8,9</sup>. Several classes of antimicrobial NPs and nanosized carriers for antibiotics delivery have proven their effectiveness for treating infectious diseases, including antibiotic-resistant ones<sup>3,4,8,10</sup>.

The potential activity of NP comes from their small size and big surface area that can result in the appearance of new mechanical, chemical, electrical, optical, magnetic, electro-optical, and magneto-optical properties<sup>3</sup>. Studies of magnetic nanomaterials have attracted great interest for the treatment of infections caused by resistant pathogens. The magnetic vector can guide the antibiotic to the site of action and the magnetic field itself can have a deleterious effect on the microorganism, either directly or resulting from changes in the normal environment for the

bacterial cell growth.

This study aimed to evaluate the activity of an oxacillin magnetically guided system having magnetite as a vector, in the treatment of MRSA infection induced in rats.

## ■ Methods

All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and use Committee (protocol n<sup>o</sup> 051/2014 – CEUA) and handled according to the Brazilian guidelines of care and use involving animals in research.

Wistar rats weighing 290±18 g were used. They were supplied by the Vivarium of Center of Health Sciences-UFRN, Brazil. They were divided into four groups (n=6/group): the biodistribution group, control group (no infection, no treatment), magnetite group (thigh infection treated with magnetite) and magnetite-oxacillin group (thigh infection treated with magnetite-oxacillin).

### *Biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-magnetite-oxacillin*

In order to study the effect of an external magnet on the biodistribution of magnetite-oxacillin, the biodistribution group rats were anesthetized with ketamine (70 mg/Kg) and xylazine (7 mg/Kg) i.p., and a Nd-magnetic ring (producing a magnetic field of 20 mT strength at its center) was sutured to the skin on the right thigh. Then 0.1 mL of <sup>99m</sup>Tc-magnetite-oxacillin was injected in the jugular vein, corresponding to 0.66 MBq radioactivity. The injected dose (ID) was calculated as the difference between the measured radioactivity in the syringe before and after injection, using a curiometer (Capintec CRC-25R). Thirty minutes after injection, animals were euthanized, and right and left thigh muscles were resected. The samples were quickly washed in saline, weighed on a precision balance (Mark 160<sup>®</sup>, Bel equipment, Italy) and then introduced into test

tubes for the determination of biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -magnetite-oxacillin in an automatic gamma counter (Wizard 1470<sup>®</sup>, Perkin-Elmer, Finland). The activity in counts per minute (CPM) in the tissues of interest was calculated as a percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g).

#### *Thigh infection model*

An overnight culture of MRSA (CCBH 4395) (courtesy Culture Collection of the Oswaldo Cruz Foundation - Fiocruz/RJ) was washed and resuspended in fresh trypsin soy broth to a concentration of 108 CFU/ml. The animals of magnetite and magnetite-oxacillin groups had both thighs shaved and cleaned with 70% ethanol; they were then anaesthetized as described above, and injected intramuscularly with a suspension 0.2 mL of MRSA in both thighs. After this, an Nd-magnetic ring was sutured in each right thigh skin. After 2 and 6h of MRSA inoculation, the animals received two i.v. doses of 0.21 mg/Kg of magnetite and 0.4 mg/Kg of oxacillin. The control group received the volume of saline 0.9 %. The dosages were chosen on the basis of the possible maximum dose projected for therapy in humans. One day after the infection, the rats were euthanized and the thigh muscles aseptically excised for examination.

#### *Microbiological assay*

After euthanasia, a small incision was performed at each thigh of rats and collection of secretion of muscle was performed for microbiological examination. Samples were homogenized by adding 9 mL of sterile saline. Serial tenfold dilution was prepared up to 10<sup>-9</sup> from obtained main dilution. All prepared solutions were cultivated at the same time. Blood agar plates for aerobic bacteria were used. All culture plates were evaluated after 48 hours incubation at 37°C and the results

were recorded as colony forming units/gram (CFU/g).

#### *Histopathology*

Fresh thigh muscles, kidney and lung samples were cut and washed in running water to enable rapid and uniform action of the fixative solution. Then the samples were fixed in 10 % buffered formalin for 48 hours and processed for 18 hours in an automatic tissue processor, using Leica equipment TP 1020, German. Prior to embedding in paraffin, the samples were cut with punch (6 mm diameter), for standardization of samples. Histological sections were obtained with microtome Leica RM 2125 RTS, 03 microns thick. The fixed specimens were stained with Prussian blue for detection of iron deposits and hematoxylin/eosin for morphological analysis by optical microscopy, using the CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Sections were examined in magnification power fields (x100) to determine the presence of infiltrating neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes and lymphocytes. The total number of cells was analyzed in six fields, for each sample, and expressed in cells per square millimeter. The quantitative analysis was performed using video-assisted software (Image ProPlus 6.0, Media Cyber).

#### *Synthesis of magnetite nanoparticles*

Nanoparticles of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) with an average particle size of 10 nm (nanometers) were prepared by high energy milling process. Initially, the metallic Fe and distilled water were put to react in a planetary ball mill (Fritsch Pulverisette 6, Oberstein, Germany) equipped with a stainless steel crucible 45 cm<sup>3</sup> capacity, containing ten balls 10 mm in diameter according to the stoichiometric reaction:





The equipment was operated in the ratio 1:20 mass/ball, at 300 rpm at 60-hour cycle. The system was characterized for x-ray diffraction, vibrating sample magnetometry, Mossbauer spectroscopy and infrared spectroscopy.

#### *Conjugation of oxacillin to magnetic nanoparticles*

The crystalline oxacillin obtained from Sigma-Aldrich was weighed in a 1:1 drug molecular weight:magnetic particle. The powder was subjected to fragmentation and cold welding of the ball mill operating at 300 rpm for 10 hours with 10 stainless steel balls of 10 mm diameter and ratio of mass/ball was 1:20.

#### *Labeling of Oxacillin/nanoparticles with pertechnetate ( $^{99m}\text{TcO}_4$ )*

For the synthesis of  $^{99m}\text{TcO}_4$ -Oxacillin + nanoparticles, 100  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{g}$ ) of stannous chloride ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) were used as reducing agent. 15 mg of Magnetic +Oxacillin nanoparticles were mixed to the solution of stannous chloride and 1000 MBq/mL of  $^{99m}\text{TcO}_4$  newly eluted in 1 mL of 0.9 % saline. This mixture was subjected to vortexing for 10 minutes, after which the solution was ready for immediate use in animals.

#### *Statistical analysis*

Images were measured by pixel density and normalized through the logarithmic transformation. The data of continuous quantitative variables that attended the assumption of normality were expressed as mean  $\pm$  standard deviation; those that do not meet the normality are in median (interquartile range). The values of the transformed variables are presented by their respective logarithms. To determine whether the differences

between groups are statistically significant, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test were used. The nonparametric Wilcoxon test was used to compare the biodistribution of oxacillin labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ -magnetite between the right and left thigh muscles. The statistical SPSS<sup>®</sup>21 package was used. The significance level was 5%.

## ■ Results

#### *Biodistribution of $^{99m}\text{Tc}$ -magnetite-oxacillin*

The biodistribution group had the muscle samples analyzed in a Gama Counter. The quantitative measurements of radiation uptake on muscle samples of the right thigh and left thigh are comparatively shown in Table 1. The median value of beta radiation counted for right thigh was almost three fold the median value counted for the left thigh, and this difference is statistically significant ( $p=0.028$ ). So, there was a large concentration of Magnetite +  $^{99m}\text{Tc}$  on the right thigh muscle, where an external magnet was sutured.

#### *Microbiology*

Representative Petri plates are shown in Figure 1. The plates were divided into two halves: the right half of each plate was seeded with secretion of the right thigh muscle (under the effect of external magnet) and the left half with secretion of the left thigh muscle of rats. Figure 1A shows that magnetite group rats were protected against bacterial overgrowth in the right thigh muscle in response to treatment with magnetite. Counts taken from the left muscle were greatly (100 to 200-fold) elevated when compared to the right muscle. Approximately the same values were observed in Magnetite + Oxacillin group rats (Figure 1B). Saline group had approximately a 300-fold significant increase in CFUs compared to

Magnetite and Magnetite + Oxacillin groups.  
Counts taken from the right thigh muscle of

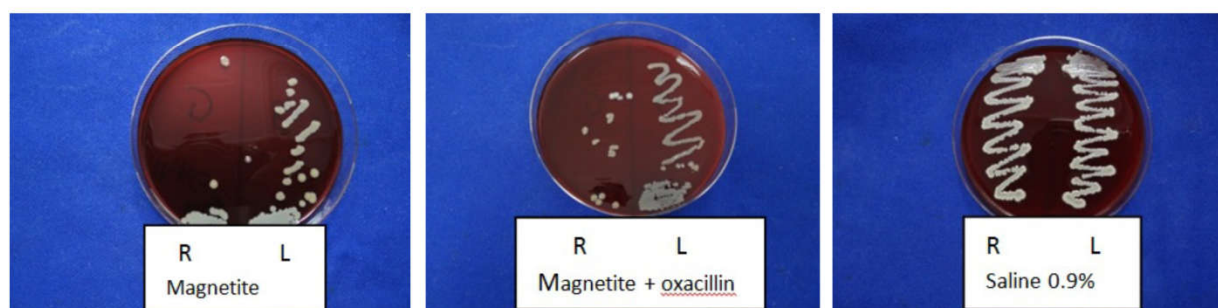
saline group rats did not differ of count from  
left muscle (Figure 1C).

**Table 1** - Descriptive and inferential statistics of biodistribution results of oxacillin labeled with magnetite and  $^{99m}\text{Tc}$ . (Values in percentage of injected dose per gram of tissue - %ID/g).

Parameter	Thigh muscle side		p-value <sup>1</sup>
	Right (with magnet)	Left	
Thigh muscle (%ID/g)	0.620(1.65)	0.25(0.25)	0.028

Median ( $Q_1$ - $Q_3$ )

1 – p-value Wilcoxon test



**Figure 1** - *S. aureus* growth: (A) Magnetite group, (B) Magnetite-Oxacillin group and (C) Saline group. “R” means the right thigh muscle and “L” means left thigh muscle. The right side muscle was under the effect of an external magnet.

### Histopathology

Representative microscopic images of right thigh muscle and lung tissue sections from the saline-control, magnetite and magnetite + oxacillin groups are shown in Figure 2. The inflammatory cells were marked using Image ProPlus software. The yellow marked cells were

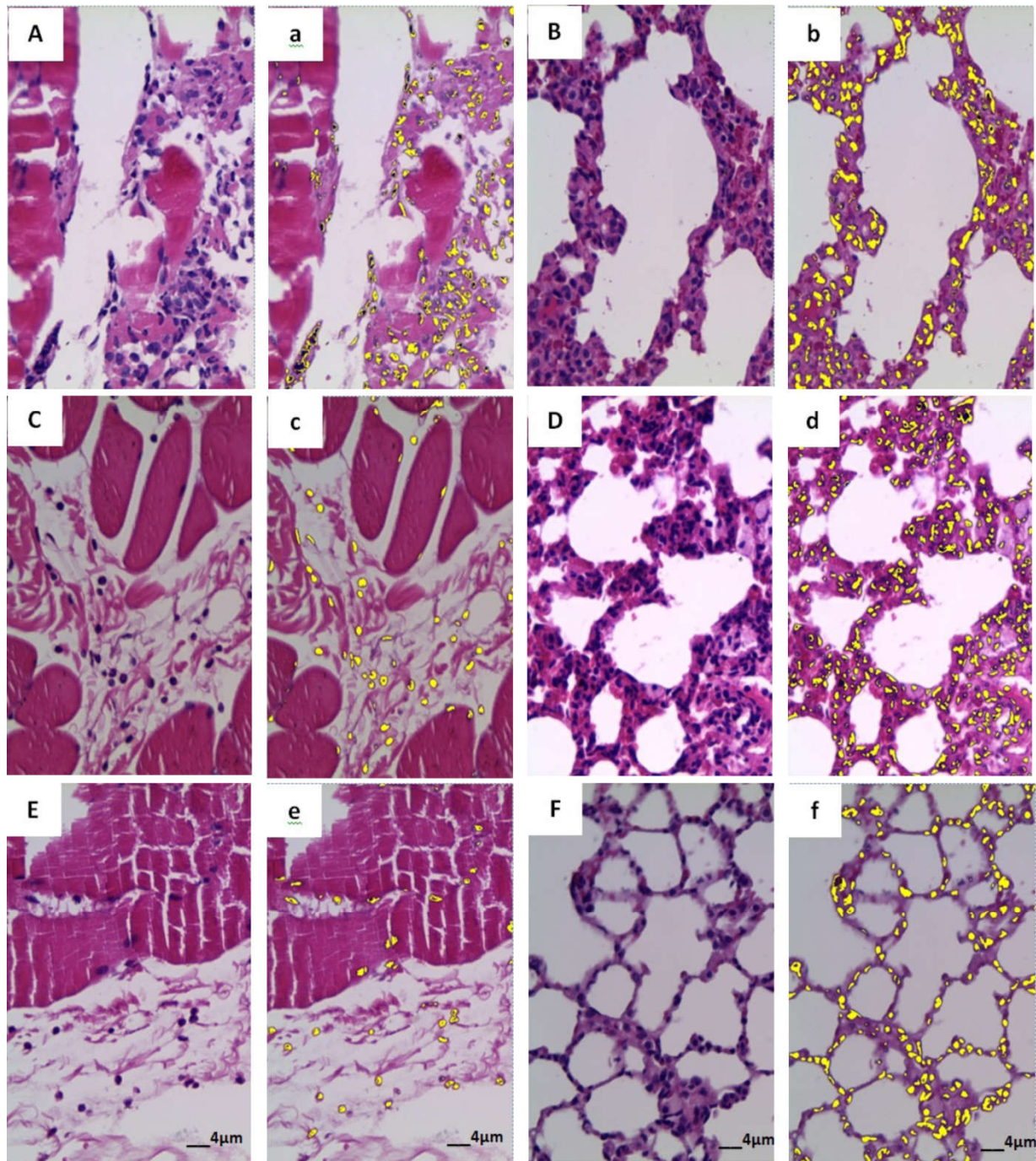
counted in optical density pixels to generate the statistical data of Table 2. For muscle samples, the inflammatory reaction of saline-control group and the magnetite group was significantly higher than of magnetite + oxacillin group ( $p < 0.001$ ). For lung samples the inflammatory reaction was significantly higher in saline-control rats than in magnetite + oxacillin group rats ( $p = 0.019$ ).

**Table 2** - Descriptive statistics and inferential results of histopathology per group. Results in density pixels of the inflammatory reaction in right thigh muscle and lung.

Parameter	Group			p-value <sup>1</sup>
	Saline-Control	Magnetite	Magnetite + Oxacillin	
Right thigh muscle (log density pixels)	4.58±0.32¥	4.25±0.27§	3.74±0.23¥§	< 0.001
Lung (log density pixels)	4.79±0.22¥	4.57±0.12	4.33±0.31¥	0.019

Mean ± standard deviation

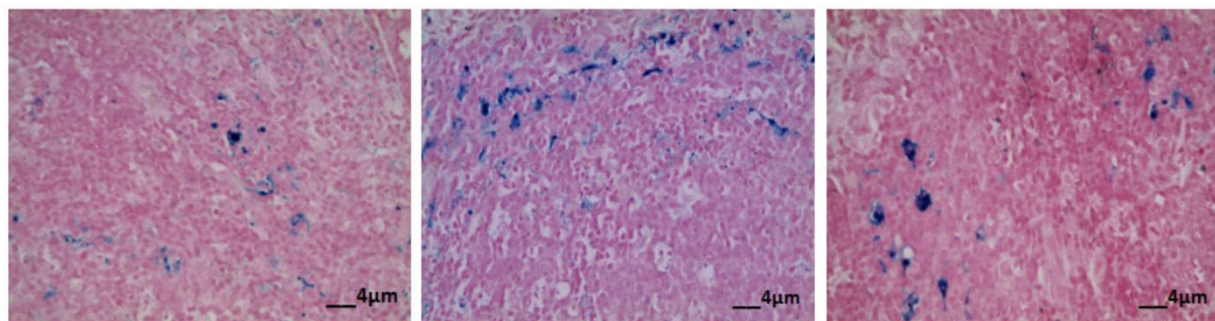
Values in the same line followed by identical symbols are significantly different (ANOVA).



**Figure 2** - Haematoxylin and eosin staining (x100) of right thigh muscle (Aa,Cc,Ee) and lung (Bb, Dd, Ff) showing leukocyte cell infiltration. In photomicrographs a,b,c,d,e,f the leukocytes were marked in yellow using the Image ProPlus software for the cell counting in optical density pixels. Aa, Bb are from saline-control group rats; Cc, Dd from magnetite group, and Ee, Ff from magnetite-oxacillin group.

Histological sections were also examined by Prussian blue staining to detect the presence of Fe-magnetite in specimens.

This staining detected some Fe-magnetite images in lung peribronchial tissues (Figure 3).



**Figure 3** - Photomicrographs of peribronchial areas of lungs showing Fe-magnetite deposits. Prussian blue staining (x100).

## ■ Discussion

This study was conducted to examine the antimicrobial activity of magnetic nanoparticle and oxacillin magnetic drug delivery system in infected muscle. The study was based on two main approaches: the *in vitro* testing of oxacillin magnetic drug delivery system for the capacity to stay concentrate on the site of infection despite the systemically administration, and the *in vivo* testing of oxacillin labeled with the magnetic carrier using an animal model of MRSA thigh infection.

*Staphylococcus aureus* is one the mains etiologic agents of skin and soft tissue infections<sup>11</sup>. These are common and relatively easy to treat diseases, but the development of resistance in these strains is a great therapeutic problem<sup>12</sup>.

Over the years, the semi-synthetic  $\beta$ -lactams such as oxacillin, cloxacillin, flucloxacillin were antibiotics of choice for the treatment of *S. aureus* infections<sup>13</sup>. These antibiotics acting by linkage with the penicillin binding proteins (PBPs), resulting in the inhibition of the cell wall synthesis and consequently growth inhibition or cell lysis. MRSA strains synthesize PBP2a, a protein of low affinity to bond  $\beta$ -lactams, therefore the cell wall can be renewed<sup>14</sup>. A range of new agents for the treatment of MRSA infections have resulted favorably, but usage of antibiotics has enhanced the accumulation of genetic elements coding for resistance, making

effective therapies a current challenging goal<sup>15,16</sup>.

Novel therapeutic strategies, such as antibacterial antibodies and cell wall-specific enzymes as adjunct to antibiotics, are currently being explored<sup>17</sup>. Another alternative is the use of nanotechnology, with delivery systems that concentrate and potentiate the antimicrobial effect<sup>15</sup>. Or even the reuse of drugs, used in traditional therapy, as proposed by Song et al, using a nanoemulsion of chlorhexidine, which seems to have quicker effect on the healing of skin lesions infected with reduced bacterial load and hindering the formation of biofilms<sup>18</sup>.

Our study indicates that the magnetic system which we have developed to deliver oxacillin, holds a promising potential for the treatment of MRSA infections. We have shown that the magnetite-oxacillin nanoparticles are concentrated in the area where the external magnet is placed. As noted in Table 1, in the biodistribution study the system labeled with technetium stayed almost 3 times lower in the left thigh muscle (without the magnet) compared with the concentration found in the right thigh muscle (with the magnet). This result corroborates those found in the study of Grumezescu et al, which also proved the efficacy of magnetic vectorization of drugs<sup>19</sup>. The antimicrobial activity of magnetite-oxacillin nanoparticles may benefit from both the drug concentration at the infection site, as well as from the changes in the normal environment

for the bacterial cell growth produced by the magnetic field of magnetite nanoparticles. Our results may indicate a possible way for the use of antibiotics currently in disuse due to microbial resistance. These findings may have significant therapeutical implications in the clinical setting.

The histological photomicrographs in rats after injection of test substances showed that lung parenchyma preserved alveolar architecture despite intense cellular infiltration. Infiltration and retention of nanoparticles in human body organs causing inflammatory process is widely described in studies of nanotoxicity. We observed retention of nano-magnetite in lungs. No retention of nano-magnetite was detected in muscle and kidneys. Nanometric particles are small enough to go beyond the blood compartment and due to its large surface area/volume, react with body structures causing toxicity<sup>20,21</sup>. In addition, transition metals such as iron can participate in redox reactions forming free radicals that can lead to oxidative stress and consequent toxicity<sup>22</sup>. Further studies are needed to examine the toxicity of nano-magnetite in lungs. However, the control animals injected with saline solution also showed prominent cellular infiltration in the lung which leads us to believe that the widespread inflammatory reaction is a result of bacterial infection.

An inflammatory process was expected in response to the direct injection of *S. aureus* in the thigh muscles tissue. We have seen a clear difference in the number of inflammatory cells amongst the three animal groups. As shown in Table 2, the count of inflammatory cells was smaller in lungs and muscle of the magnetite and magnetite + oxacillin group rats than in saline-controls.

The microbiological assay clearly showed the favorable effect of magnetite + oxacillin in the infection in the thigh muscle under the effect of an external magnet. Samples of the right thigh muscle, where the magnetic vectorization successfully lead to

large concentration of magnetite + oxacillin, had a strong reduction of microbial growth, when compared to samples from the left thigh muscle. Surprisingly, the same antimicrobial effect was observed in the magnetite group (without oxacillin). This result indicates that the magnetic field may also have antibacterial action. Future studies are needed to elucidate the mechanisms of this effect. Azam *et al.*<sup>23</sup> reported that this effect is expected, using metal oxide nanomaterials in their work with gram-positive and gram-negative organisms. The bactericidal activity appears to arise from oxidative stress as proposed in studies using metallic nanoparticles<sup>24,25</sup>

## ■ Conclusion

This study confirms the potential antimicrobial activity of magnetic nanoparticles for Methicillin-Resistant *S. aureus* strains, which in addition to concentrate the antibiotic at the infection site, positively influenced the treatment.

## ■ References

1. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HA. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2009 Jan;9(1):32-47. doi: 10.1016/j.meegid.2008.09.012.
2. Xiong MH, Bao Y, Yang XZ, Zhu YH, Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Nov 30;78:63-76. doi: 10.1016/j.addr.2014.02.002.
3. Sathyanarayanan MB, Balachandranath R, Genji Srinivasulu Y, Kannaiyan SK, Subbiahdoss G. The effect of gold and iron-oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens. *ISRN Microbiol.* 2013 Sep 25;2013:272086. doi: 10.1155/2013/272086.
4. Subbiahdoss G, Sharifi S, Grijpma DW, Laurent S, van der Mei HC, Mahmoudi

- M,Busscher HJ. Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Acta Biomater.* 2012 Jul;8(6):2047-55. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.002.
5. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1037-50. PMID: 17382878.
  6. Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Apr;12 Suppl 2:3-10. Review. PMID: 16524422.
  7. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010 Apr;8(4):260-71. doi: 10.1038/nrmicro2319.
  8. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012 Oct;30(10):499-511. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
  9. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Nov;65(13-14):1803-15. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.011.
  10. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release.* 2011 Dec 10;156(2):128-45. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002.
  11. Dryden MS. Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Nov;65 Suppl 3:iii35-44. doi: 10.1093/jac/dkq302.
  12. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, Hirschmann JV, Kaplan SL, Montoya JG, Wade JC. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2014 Jul 15;59(2):147-59. doi: 10.1093/cid/ciu296.
  13. Negi B, Kumar D, Kumbukgolla W, Jayaweera S, Ponnann P, Singh R, Agarwal S, Rawat DS. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity, synergism with oxacillin and molecular docking studies of metronidazole-triazole hybrids. *Eur J Med Chem.* 2016 Jun 10;115:426-37. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.041.
  14. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-López C, Kumarasiri M, Lastochkin E, Fishovitz J, Dawley M, Heseck D, Lee M, Johnson JW, Fisher JF, Chang M, Mobashery S, Hermoso JA. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Oct 15;110(42):16808-13. doi: 10.1073/pnas.1300118110.
  15. Balaure PC, Popa RA, Grumezescu AM, Voicu G, Rădulescu M, Mogoantă L, Bălșeanu TA, Mogoșanu GD, Chifiriuc MC, Bleotu C, Holban AM, Bolocan A. Biocompatible hybrid silica nanobiocomposites for the efficient delivery of anti-staphylococcal drugs. *Int J Pharm.* 2016 Aug 30;510(2):532-42. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.037.
  16. Liakos I, Grumezescu AM, Holban AM. Magnetite nanostructures as novel strategies for anti-infectious therapy. *Molecules.* 2014 Aug 20;19(8):12710-26. doi: 10.3390/molecules190812710.
  17. Rasmussen RV, Fowler VG Jr, Skov R, Bruun NE. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. *Future Microbiol.* 2011 Jan;6(1):43-56. doi: 10.2217/fmb.10.155.
  18. Song Z, Sun H, Yang Y, Jing H, Yang L, Tong Y, Wei C, Wang Z, Zou Q, Zeng H. Enhanced efficacy and anti-biofilm activity of novel nanoemulsions against skin burn wound multi-drug resistant MRSA infections. *Nanomedicine.* 2016 Aug;12(6):1543-55. doi: 10.1016/j.nano.2016.01.015.
  19. Grumezescu AM, Gestal MC, Holban AM, Grumezescu V, Vasile BS, Mogoantă L, Iordache F, Bleotu C, Mogoșanu GD. Biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> increases the efficacy of amoxicillin delivery against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Molecules.*

- 2014 Apr 22;19(4):5013-27. doi: 10.3390/molecules19045013.
20. Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal.* 2014 Mar;22(1):64-75. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.005.
21. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul;113(7):823-39. PMID: 16002369.
22. Yin JJ, Fu PP, Lutterodt H, Zhou YT, Antholine WE, Wamer W. Dual role of selected antioxidants found in dietary supplements: crossover between anti- and pro-oxidant activities in the presence of copper. *J Agric Food Chem.* 2012 Mar 14;60(10):2554-61. doi: 10.1021/jf204724w.
23. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:6003-9. doi: 10.2147/IJN.S35347.
24. Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Pollut.* 2009 Apr;157(4):1127-33. doi: 10.1016/j.envpol.2008.10.002.
25. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec 15;52(4):662-8. PMID: 11033548.

## ■ Acknowledgements

The technical support of the Department of Pathology, and the Service of Microbiology of Onofre Lopes University Hospital-UFRN.

---

### Correspondence:

Juliana Fernandes de Carvalho  
Rua General Cordeiro de Faria, s/n  
59012-570, Natal, RN, Brazil  
carvalho.jf.2918@gmail.com

Received: Sep 05, 2016

Review: Nov 07, 2016

Accepted: Dez 09, 2016

Conflict of interest: none

Financial sources: CNPq (Grant 4449083/2014-4) and CAPES.

<sup>1</sup>Research performed at Laboratory of Magnetism and Magnetic Materials and Nucleus of Experimental Surgery, Department of Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Health Sciences. Tutor: Prof. Dr. Artur da Silva Carriço.

---

**5.2 Artigo: Monodisperse Sodium Oleate Coated Magnetite High Susceptibility Nanoparticles for Hyperthermia Applications.**

Revista: Journal of Magnetism and Magnetic Materials

ISSN 1530-9932

GMMM. Vol.364 p.72-79 Jan.2014

Doi: 10.1016/j.jmmm.2014.04.001

Fator de Impacto 2015/2016: 2,630

Quali/CAPES 2013-2016: B1 MEDICINA II

(<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>)

**Participação como coautora em artigo científico publicado. Outras produções não relacionadas à tese.**





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Magnetism and Magnetic Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmmm](http://www.elsevier.com/locate/jmmm)

## Monodisperse sodium oleate coated magnetite high susceptibility nanoparticles for hyperthermia applications



R.P. Araújo-Neto<sup>a</sup>, E.L. Silva-Freitas<sup>a</sup>, J.F. Carvalho<sup>a</sup>, T.R.F. Pontes<sup>a</sup>, K.L. Silva<sup>a</sup>,  
I.H.M. Damasceno<sup>a</sup>, E.S.T. Egito<sup>a</sup>, Ana L. Dantas<sup>b</sup>, Marco A. Morales<sup>c</sup>, Artur S. Carriço<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, Petrópolis, 59012-570 Natal-RN, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Física, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 59610-210 Mossoró-RN, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Física Teórica e Experimental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus universitário, CEP: 59078-970 Natal-RN, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 February 2014

Received in revised form

23 March 2014

Available online 13 April 2014

## Keywords:

Nanoparticle

Superparamagnetic

Magnetite

Sodium oleate

Hyperthermia

## ABSTRACT

We report a simple and low cost methodology to synthesize sodium oleate coated magnetite nanoparticles for hyperthermia applications. The system consists of oleate coated magnetite nanoparticles with large susceptibility (1065 emu/gT), induced by the dipolar inter-particle interaction, with a magnetic core diameter in the 6 nm–12 nm size range. In aqueous medium, the nanoparticles agglomerate to form a monodisperse system, exhibiting a mean hydrodynamic diameter of 60.6 nm  $\pm$  4.1 nm, with a low average polydispersity index of 0.128  $\pm$  0.003, as required for intravenous applications. The system exhibits promising efficiency for magnetic hyperthermia, with a specific absorption rate of 14 W/g at a low field amplitude of 15.9 kA/m and frequency of 62 kHz. In a 50 mg/mL density in 1 mL, the temperature rises to 42.5 °C in 1.9 min.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cancer is one of the most challenging problems of modern medicine and a leading cause of death worldwide, accounted for 7.6 million deaths (around 13% of all-cause mortality) in 2008. Projections estimate 13.1 million deaths from cancer in 2030 [1].

Alternative techniques for cancer treatment have been widely studied in the last years to increase the effectiveness of currently available therapies, such as chemotherapy or radiotherapy, and reduce their side effects [2,3].

Hyperthermia is a promising approach for cancer therapy. Different techniques have been proposed to generate heat at the tumor site and produce apoptosis of tumor cells that are more sensitive to high temperatures than healthy cells [2,4].

The most common treatments with hyperthermia require temperature elevations to a range between 42 and 45 °C which is sufficient to destroy cancer cells without causing damage to normal tissue [5].

Much effort has been made to improve hyperthermia techniques for clinical applications, leading to the development of magnetic hyperthermia. This technique involves the administration of magnetic particles into the tumor or target tissue followed by exposure to an external AC magnetic field that causes the

particles to heat because of their capacity to convert the energy absorbed from a high-frequency magnetic field into thermal energy mostly via relaxation and hysteresis losses [5–7].

Whereas the majority of hyperthermia modalities including microwave, laser and ultrasonic wave-based treatments are restricted in their utility because of unwanted heating of healthy tissue, magnetic hyperthermia has the advantage to selectively target the tumor cells [4,8].

The frequency of the AC magnetic field has to be higher than 50 kHz, to avoid neuromuscular electrostimulation, and lower than 10 MHz for appropriate penetration into the body [6]. High amplitude and frequency of the applied field may generate eddy currents and cause non-selective heating of the biological tissue, so a limit on the amplitude of magnetic field was established between 8 and 16 kA/m [2].

In addition to the potential use in hyperthermia, magnetic particles have attracted much attention due to their current and novel biomedical applications such as magnetic resonance imaging, tissue engineering, magnetofection, and cellular labeling/cell separation and magnetically targeted drug delivery [9–13].

For clinical applications, these particles must be biocompatible, non-toxic, non-immunogenic and water-based [14]. Several studies report a vast range of magnetic materials that can be applied in biotechnology. Iron oxide particles represented by magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) are considered promising candidates because they present biocompatibility, high saturation magnetization, stable magnetic response, higher resistance to

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [ascarrico@gmail.com](mailto:ascarrico@gmail.com), [acarrico@dfte.ufm.br](mailto:acarrico@dfte.ufm.br) (A.S. Carriço).

oxidation than other metal compounds and relative easiness to functionalize with polymers or functional groups [15,16].

The size also plays a key role. Nanoparticles with small diameter and narrow size distribution are required for biomedical applications in general. It is currently accepted that the diameter of the nanoparticles should be in the 10–100 nm size range, in order to avoid rapid removal from systemic circulation by extravasation, renal clearance or uptake into the reticuloendothelial system, and emboli within the capillaries [17,18].

For magnetic hyperthermia applications, the need to control the particle size is further enhanced, in order to optimize the energy transfer to the biologic tissue. High polydispersity of the nanoparticles size diminishes the magnetic heating that can be achieved [19,20].

Due to the high surface area to volume ratio, and the strong dipole–dipole interactions and van der Waals attractive forces, magnetic nanoparticles tend to agglomerate and form large clusters resulting in increased particle size [21].

Surface coating of the nanoparticles prevents aggregation and may provide colloidal stability by steric and/or electrostatic repulsion [22].

Numerous coating materials have been reported previously, such as polymers (e.g., polyethylene glycol, Pluronic<sup>®</sup>, dextran, chitosan), inorganic materials (e.g., silica, alumina), and liposome and fatty acids [22–24].

Previous works report that oleic acid and sodium oleate have high affinity to the surface of iron oxide particles, being effective in the stabilization of nanoparticles by steric repulsion. It is possible to obtain iron oxide nanoparticles coated with monolayers of these surfactants, which are dispersible in organic solvents, or bilayers that can be dispersed in water. In the latter case, the primary layer is first adsorbed onto the surface of the nanoparticles through chemical bonds between the carboxylic acid head groups of the surfactant molecules and the particle surface. The secondary layer is adsorbed onto the primary layer through hydrophobic interactions. Thus, the outermost layer provides hydrophilic groups that make the magnetic nanoparticles dispersible in aqueous solutions [25–29].

We note that toxicity evaluation is a mandatory issue. Sun et al. [30] reported that magnetite nanoparticles coated with sodium oleate had low toxicity and a better biocompatibility than magnetite nanoparticles coated with polyethylene glycol. Jain et al. evaluated the distribution, clearance and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles coated with oleic acid and Pluronic<sup>®</sup> in rats [31]. They found that the coated nanoparticles did not cause long-term changes in the liver enzyme levels, or induce oxidative stress, and thus can be safely used for drug delivery and imaging applications without significant levels of toxicity.

We presently report the synthesis of superparamagnetic sodium oleate coated magnetite nanoparticles, using a simple and low cost co-precipitation methodology, with no organic solvents. In the aqueous medium the nanoparticle system has a narrow size distribution, and large initial susceptibility, as required for high efficiency hyperthermia applications.

## 2. Materials and methods

Iron (III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99%), iron (II) sulphate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 99%), ammonium hydroxide (28–30%  $\text{NH}_3$ ), potassium bromide (KBr, 99%) and ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , 99%) were purchased from Vetec (Vetec Química Fina Ltda., Brazil). Sodium oleate ( $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NaO}_2$ , 82%) was acquired from Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC., USA). Deionized water was prepared using a DE-1800 water purification system (Permutation Ltda., Brazil).

The nanoparticles were synthesized by co-precipitation of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  salts using excess of ammonium hydroxide as previously

described [26,32]. In a typical synthesis, an aqueous solution containing 0.12M of  $\text{Fe}^{3+}$  and 0.06M of  $\text{Fe}^{2+}$  was prepared by dissolution of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in deionized water.

This solution was heated until 80 °C and stirred at 960 rpm (Mechanical stirrer RW 20, IKA Labortechnik, Germany), followed by rapid addition of 16 mL of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28–30%  $\text{NH}_3$ ) solution. The resulting suspension was vigorously stirred for 5 min. Then, 50 mL of 0.06 M sodium oleate dispersion was added into the reaction medium and continuously stirred for 25 min. At the end of the process, a black precipitate was obtained and washed several times with deionized water.

Finally, the procedure was repeated one more time by heating the precipitate in aqueous suspension until 80 °C with stirring at 960 rpm and subsequent addition of 50 mL of a sodium oleate dispersion with the same concentration as the previous one. At this point, it was observed the formation of a stable dispersion that was stirred for 25 min.

Additionally, bare magnetic particles were prepared by the same process described above without the step of coating with sodium oleate, in order to analyze its influence in the stabilization of magnetic nanoparticles. While the sodium oleate coated particles showed colloidal aspect with good dispersion in water and no evident sedimentation, the uncoated particles easily precipitated to the bottom of the flask.

## 3. Characterization

A particle size analyzer (ZetaPALS, Brookhaven Instruments) was used to measure size distribution of the particles by dynamic light scattering (DLS) technique. The zeta potential (ZP) was determined in the same equipment.

X-ray diffraction (XRD) analysis (MiniFlex<sup>™</sup>II, Rigaku Co.) using  $\text{CuK}\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ ) and  $2\theta$  scan range from 15–80° was employed to study the crystal structure of the samples.

A vibrating sample magnetometer (VSM, custom-made) was used to measure the magnetization of the samples at room temperature with fields up to 1.2 T.

The structure, morphology and size of the crystallites were investigated by selected area of electron diffraction (SAED) and transmission electron microscopy (TEM) with an acceleration voltage of 120 kV (Tecna<sup>™</sup> G<sup>2</sup> Spirit TWIN, FEI). The samples were prepared by placing one drop of the dispersion on a carbon coated copper grid (300 mesh) and the size distribution was calculated from 20 different TEM images using an image analysis software (ImageJ) by measuring the diameters of a total of 500 particles.

To study the interactions between surfactant and surface of the particles, the Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded in transmittance mode over the wavenumber range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  at a resolution of 1  $\text{cm}^{-1}$  (Spectrum 65 FTIR Spectrometer, PerkinElmer Inc.). The powdered samples were mixed with KBr and compressed into a pellet. For this particular analysis, extra samples were produced by submitting the sodium oleate coated particles to several washings with ethanol to remove any surfactant molecule that was not chemically bound to the surface of the particles.

The surfactant mass of coated particles was quantified by thermogravimetric analysis (TGA) under argon atmosphere (50 mL/min argon flow) from room temperature up to 500 °C with a heating rate of 10 °C/min (DTG-60H, Shimadzu). Differential thermal analysis (DTA) was employed using the same parameters.

The evaluation of the particles potential application in magnetic hyperthermia was performed in an experimental setup which produces an alternating magnetic field with a frequency of 62 kHz and amplitude of 15.9 kA/m or 200 Oe. The samples were subjected to this field for 600 s and their temperature was

measured every second. In this test, the ferrofluid had a particle concentration of approximately 50 mg/mL in 1 mL volume.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Dynamic light scattering

The size distribution of the particles coated with sodium oleate as measured by DLS is shown in Fig. 1a. The mean hydrodynamic diameter of the nanoparticles was  $60.6 \text{ nm} \pm 4.1 \text{ nm}$ . It was also calculated that 10%, 50% and 90% of the nanoparticles were smaller than  $31.1 \text{ nm} \pm 1.7 \text{ nm}$ ,  $46.9 \text{ nm} \pm 2.9 \text{ nm}$  and  $70.7 \text{ nm} \pm 4.7 \text{ nm}$ , respectively.

The polydispersity index (PDI) was determined with an average value of  $0.128 \pm 0.003$ . PDI less than 0.2 indicates a monodisperse particulate system, as required for intravenous applications [33].

For the uncoated magnetic particles (Fig. 1b), the mean hydrodynamic diameter was  $1230.4 \text{ nm} \pm 165.7 \text{ nm}$ , and 10%, 50% and 90% of the particles were smaller than  $804.6 \text{ nm} \pm 367.3 \text{ nm}$ ,  $1224.8 \text{ nm} \pm 160.4 \text{ nm}$  and  $2020 \text{ nm} \pm 505.3 \text{ nm}$ , respectively. The average value of PDI was  $0.418 \pm 0.008$  which characterizes a polydisperse particulate system.

These results confirm the essential role of sodium oleate coating of the magnetite particles, leading to a monodisperse nanoparticle system. The absence of surfactant led to an increase of about 20 times in the average particle hydrodynamic diameter, combined with a considerable increment in polydispersity of more than three times. Furthermore, for the same experimental conditions, the uncoated

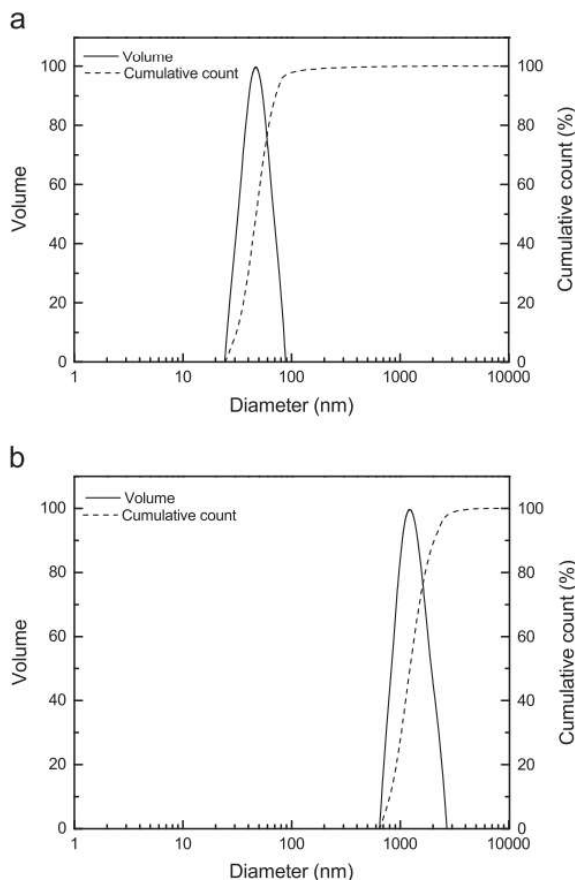


Fig. 1. Hydrodynamic size distribution of (a) coated nanoparticles and (b) uncoated microparticles.

particles exhibited a relative size variation much larger than the coated nanoparticles, as observed in the standard deviation value indicating that the particle aggregation can take place differently for each synthesis process when no surfactant is used.

### 4.2. Zeta potential

Zeta potential measurements for coated nanoparticles reveal an average value of  $-32.9 \pm 1.6 \text{ mV}$ , while for the bare microparticles this value was  $+5.2 \pm 0.4 \text{ mV}$ . The negative zeta potential of the coated nanoparticles can be attributed to the negatively charged carboxylate groups present in the sodium oleate. As the pKa of carboxyl group is about 4, in aqueous medium with pH higher than 6 virtually all carboxyl groups are ionized to the form of carboxylate [34].

Zeta potential values found below  $-30 \text{ mV}$  indicate that in addition to stabilization by steric repulsion, the sodium oleate can also stabilize the particles by electrostatic repulsion mechanism. Concerning the uncoated microparticles, the positive and relatively low zeta potential is related to the fact that the point of zero charge (PZC) admitted for iron oxide particles is approximately 7. Therefore, pH values below PZC lead to a positive zeta potential, which increases as the pH reduces [27].

### 4.3. X-ray diffraction

XRD patterns of the coated nanoparticles and standard magnetite (JCPDS Card no. 19-0629) are shown in Fig. 2a and b. The analysis of the position and relative intensity of diffraction peaks suggests the formation of magnetite nanoparticles. However, due to the similarity between  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  inverse spinel crystal structure, this analysis may not distinguish which of the iron oxides was actually formed [35]. One might think of using the position of 440 peak in order to identify the predominant magnetic phase. The 440 peak position is around  $62.5^\circ$  for magnetite (JCPDS Card no. 19-0629) and  $62.9^\circ$  for maghemite (JCPDS Card no. 39-1346). In our samples the 440 peak position was  $62.7^\circ$  indicating either the presence of both magnetic phase or the formation of non-stoichiometric magnetite nanoparticles with crystal defects.

For this reason we calculated the lattice parameter of the crystals. The typical unit cell parameter reported for maghemite is  $8.34 \text{ \AA}$  and for magnetite is  $8.39 \text{ \AA}$  [36]. The XRD data revealed nanoparticles with lattice parameter of  $8.383 \text{ \AA}$  that indicates the synthesis of magnetite particles.

The lower value of lattice parameter observed in the nanoparticles prepared by co-precipitation could be explained by oxidation

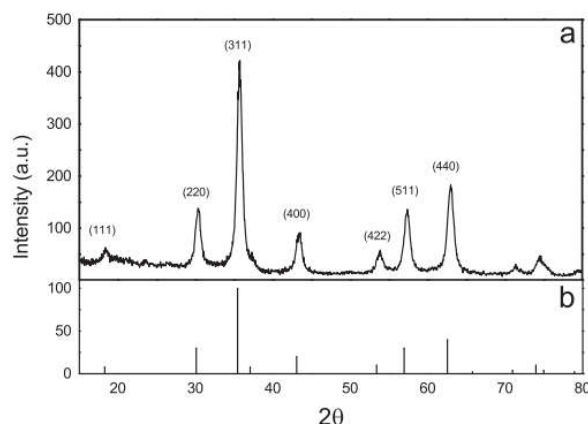
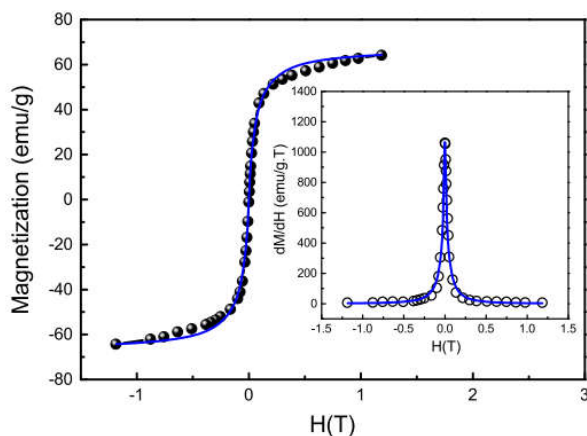


Fig. 2. XRD patterns of (a) coated nanoparticles and (b) pure magnetite.



**Fig. 3.** Magnetization curve of magnetite nanoparticles, full and open symbol curves for the experimental results and continuum line for the theoretical model. In the inset we show the susceptibility.

of  $\text{Fe}^{2+}$  or existence of small amount of maghemite impurities, especially at the surface of the particles [36,37].

The mean crystallite size, calculated from the XRD pattern, is 9.8 nm. This value is within the 25 nm size limit required for superparamagnetism of magnetite at room temperature [38].

The DLS and XRD data indicate that in the aqueous phase the crystallites agglomerate forming a monodisperse ferrofluid with larger particles of 60 nm size.

#### 4.4. Magnetization

The magnetization, as shown in Fig. 3, exhibits a value of about 64 emu/g at an external field strength of 1.2 T. This is about 69% of the bulk saturation magnetization of magnetite (92 emu/g). Furthermore, the magnetization does not saturate for this large value of the external field strength. Both results are signatures of small size superparamagnetic nanoparticle systems [28,35,39].

The reduced value of magnetization may be partially attributed to dilution effects, caused by the presence of the sodium oleate adsorbed layer.

Furthermore, the magnetic moment of small size nanoparticles may have a relevant reduction due to the existence of spin canting in the near surface region. This effect is more pronounced in small particles, which have a much larger fraction of surface spins. A disordered alignment of surface atomic spins may be induced by the reduced surface coordination and the broken exchange bonds in the near surface layers [40].

As shown in Fig. 3 remanence and coercivity are nearly zero, indicating a typical superparamagnetic behavior. For biomedical applications, superparamagnetic particles are preferred because they do not retain any magnetization after removal of the magnetic field [4].

In order to model the magnetization curve we use a self-consistent method which takes into account the existence of nanoparticles with dimensions in the 5 nm to 18 nm size range, with a size dispersion close to that found in the analysis of the TEM images. The model also accounts for the dipolar interaction of the nanoparticles assembled together in the VSM sample holder.

The basic phenomenology is based on the fact that in the presence of an external magnetic field each superparamagnetic particle produces its own dipolar field. Therefore each one of the particles is under the action of the applied field and the effective dipolar field produced by all the other particles.

The effective dipolar field, for a given value of the applied field, depends on the relative position of the particles in the VSM

sample holder, the VSM sample holder shape, as well as on the size dispersion.

Furthermore, the effective dipolar field acting on a given nanoparticle also depends on the diameters of the particles distributed in the first, second, third shells of particles around it. We adopted a simplifying assumption.

The thermal average value of the magnetization is represented by an average over a distribution of superparamagnetic spherical crystallites, each of which is considered to be subjected to the thermal average dipolar field of the others.

For a given value of the external field, the magnetization is given by

$$M(H) = M_S \int \mathcal{L}(\mu(D)\mathcal{H}_{\text{eff}}/k_B T) f(D) dD \quad (1)$$

where  $\mathcal{L}$  is the Langevin function,  $M_S$  is the saturation magnetization,  $\mu(D) = \pi M_S D^3 / 6$  is the saturation magnetic moment of a nanoparticle of diameter  $D$ , and  $f$  is a log-normal distribution function.

$\mathcal{H}_{\text{eff}}$  includes the external field  $H$ , and an effective dipolar field,  $\mathcal{H}_{\text{eff}} = H + \mathcal{H}_d$ . We assumed that the effective dipolar field  $\mathcal{H}_d$  is proportional to the thermal average dipolar field produced by the crystallite at a distance of one diameter,  $\mathcal{H}_d = 2\alpha\langle\mu(D)\rangle/D^3$ .  $\langle\mu(D)\rangle$  is the thermal average magnetic moment of the crystallites with diameter  $D$ .

We have assumed a reduction of the nanoparticles saturation magnetic moment down to 70% of the saturation value.  $M(H)$ ,  $\alpha$  and the distribution function were adjusted self-consistently to fit the experimental data. We have found a narrow log-normal distribution function

$$f(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma D} \exp\left[-\frac{\ln(D/D_0)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (2)$$

with a standard deviation  $\sigma=0.24$  and a  $D_0=8.0$  nm median diameter, with 83% of the particles with diameter in the 6 nm–12 nm range, and an average diameter of 8.3 nm, in agreement with the X-ray results and the TEM images size analysis.

In Fig. 3 we show the magnetization curve and susceptibility of the coated magnetite nanoparticles. Notice that the theoretical model (continuum line curves) reproduces quite well the experimental results. Both the magnetization curve and the initial susceptibility are well represented in the model theory.

We have found that the dipolar interaction between the crystallites plays a key role in the magnetic response of the nanoparticles to external field in the mT range, and leads to the large value of the initial susceptibility (1065 emu/gT). Without the dipolar interaction, we have found that the initial susceptibility is smaller than the measured value.

A discussion of the low field effects is appropriate since biomedical safety requires an AC magnetic field strength of at most 20 mT [2]. Also, the specific absorption rate for superparamagnetic particles is proportional to the value of the magnetic susceptibility at small field strength [7].

Before entering the detailed discussion of this point, it is instructive to consider qualitatively the phenomenology which leads to the response of the nanoparticle system to a small strength external field. This is a key issue for hyperthermia applications.

Magnetite has a magnetic moment of  $16.4\mu_B$  per unit cell of  $0.295 \text{ nm}^3$  volume [41]. Thus a magnetite nanoparticle with diameter  $D$  has a saturation magnetic moment given by  $\mu_0 = 55.59\pi D^3 / 6$ .

In the presence of a magnetic field  $H$ , an isolated superparamagnetic particle has a thermal average magnetic moment, along the field direction, which may be estimated [41] as

$$\mu = \mu_0 \mathcal{L}(\mu_0 H / k_B T) \quad (3)$$

where  $\mu_0$  is the saturation moment, and  $\mathcal{L}$  is the Langevin function,  $\mathcal{L}(x) = \coth(x) - 1/x$ .

A 9 nm diameter magnetite particle has a saturation magnetic moment of around  $7.07 \times 10^4 \mu_B$ . At room temperature, an external field of 1 mT strength is enough to break the thermal relaxation balance, producing a thermal average net magnetic moment of around 1.0% of the saturation value. This amounts to stabilizing  $92 \mu_B$  per 9 nm diameter particle. At a distance of 9 nm from the particle center, the dipolar field is about 8 mT. For small external field strengths, the dipolar field produced by the 9 nm magnetite nanoparticle at its neighborhood is of the order of magnitude of the external field.

Thus, in the low field range, the dipolar effects cannot be neglected. In the mT field range, the susceptibility is to a large extent controlled by the dipolar interaction between the crystallites.

In order to investigate the impact of the dipolar interaction on the magnetization, we have compared the final result shown in Fig. 3 with simulations using the same algorithm, but with different size distribution functions and effective dipolar interaction fields.

Using the same size distribution function (Eq. (2), with  $\sigma = 0.24$  and  $D_0 = 8.0$  nm), but no dipolar contribution to the effective ( $\mathcal{H}_{eff} = H$ ), we have reproduced most of the magnetization curve, except in the low field range. The initial susceptibility was found to be only 61% of the measured value.

We have also checked monodisperse nanoparticle systems with size in the 6 nm–12 nm range. Without dipolar interaction, a 9 nm particle system ( $\sigma = 0.01$  and a  $D_0 = 9.0$  nm) has an initial susceptibility of 713 emu/gT, which is about 66% of the measured value.

In order to reproduce the large initial susceptibility value, a large diameter monodisperse particle system ( $\sigma = 0.01$  and a  $D_0 = 10.3$  nm) is required. However, this is not appropriate. In this case the magnetization saturates too early, at an external field value of about 500 mT.

A previous report has indicated that for nanoparticle systems with similar diameter size distribution, the dipolar interaction leads not only to larger initial susceptibility, but also to a small coercivity of 22 mT [42].

The dipolar effects in our coated samples are smaller due to the oleate bilayer, which leads to a relevant decrease in the average particle density. However, it is large enough to increase the susceptibility by a factor of almost two.

#### 4.5. Transmission electron spectroscopy

Fig. 4 shows two transmission electron microscopy (TEM) pictures, selected from a total of 20 images used to investigate the size distribution of the oleate coated magnetite nanoparticles.

The size histogram, including a total of 500 nanoparticles, shows magnetite nanoparticles with dimensions in the 5 nm–18 nm size range, and corresponds to a log-normal distribution with median diameter of 9.8 nm, standard deviation  $\sigma = 0.244$ , and an average diameter of 10.01 nm.

This narrow size distribution, with about 80% of the nanoparticles in the 6 nm–12 nm range of diameters, is in good agreement with the crystallite size (9.8 nm) estimated from the X-ray diffractogram.

From the SAED pattern of the synthesized sample shown in Fig. 5, the d-spacings corresponding to the respective Miller indices (hkl) were determined as being 4.86 Å (111), 2.97 Å (220), 2.52 Å (311), 2.08 Å (400), 1.69 Å (422), 1.61 Å (511) and 1.47 Å (440). These values were close to those found in standard magnetite (JCPDS Card no. 19-0629) which are 4.85 Å (111), 2.97 Å (220), 2.53 Å (311), 2.10 Å (400), 1.71 Å (422), 1.62 Å (511) and 1.48 Å (440). The diffraction pattern is in agreement with the XRD data.

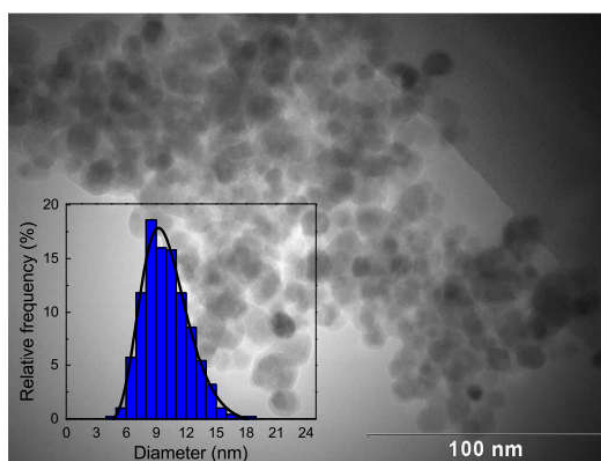
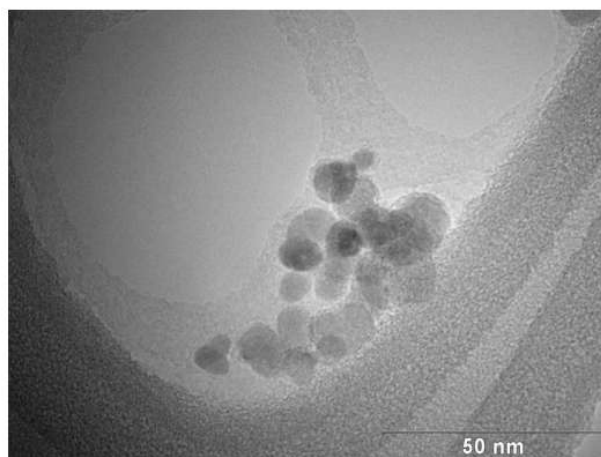


Fig. 4. TEM image and size distribution histogram of oleate coated nanoparticles.

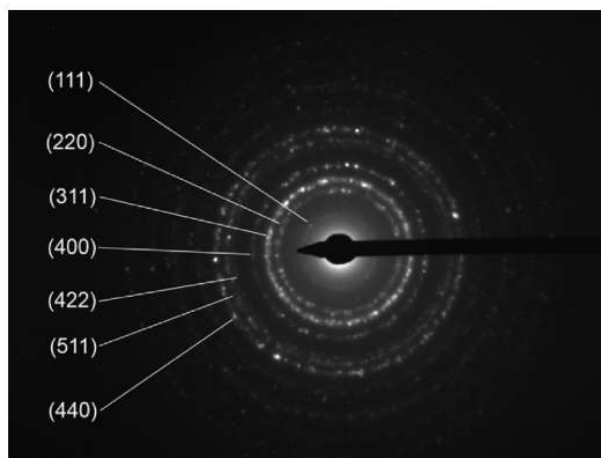
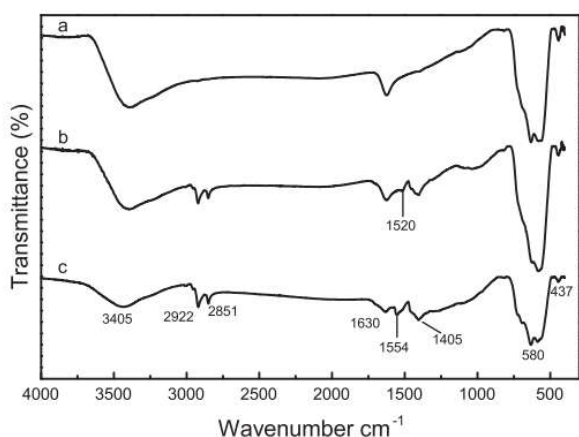


Fig. 5. Selected area electron diffraction (SAED) pattern of oleate coated nanoparticles.

#### 4.6. Fourier transform infrared spectroscopy

FTIR spectra of the prepared samples are presented in Fig. 6. Spectral bands with a maximum transmittance at  $437 \text{ cm}^{-1}$  and  $580 \text{ cm}^{-1}$  correspond, respectively, to the vibration of the  $\text{Fe}^{3+}-\text{O}$  and  $\text{Fe}^{2+}-\text{O}$  bonds in the crystalline lattice of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [43].



**Fig. 6.** FTIR spectra of (a) magnetite particles without coating, (b) coated nanoparticles washed with ethanol to remove physically adsorbed sodium oleate and (c) coated nanoparticles.

The bands at  $1405\text{ cm}^{-1}$  and  $1554\text{ cm}^{-1}$  can be ascribed to the symmetric  $\nu_s(\text{COO}^-)$  and asymmetric  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  carboxylate stretches. The sharp bands at  $2922\text{ cm}^{-1}$  and  $2851\text{ cm}^{-1}$  are attributed to asymmetric and symmetric C–H vibrations of the methylene groups.

During the preparation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles by the chemical co-precipitation, their surfaces may be covered with hydroxyl groups in an aqueous environment. Thus, the characteristic bands of hydroxyl groups,  $1630\text{ cm}^{-1}$  and  $3405\text{ cm}^{-1}$ , appeared in the FTIR spectra [26,44,45].

The spectrum in Fig. 6b shows the presence of bands corresponding to  $\text{CH}_2$  and  $\text{COO}^-$  groups, suggesting that the sodium oleate is actually chemically bound to the surface of the magnetic nanoparticles.

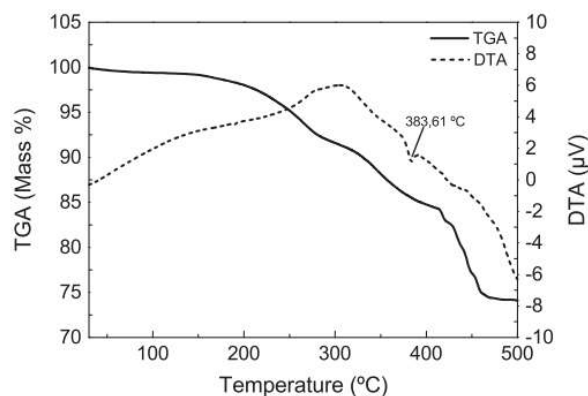
On the other hand, the band assigned to the asymmetric vibration of carboxylate group shifted down to  $1520\text{ cm}^{-1}$  and had an intensity reduction, indicating that there were oleate molecules freely dispersed in the aqueous medium, or free terminal carboxylate groups forming a surfactant bilayer. This hypothesis is supported by the good dispersion of the nanoparticles in water.

The type of interaction between the carboxylate group and the nanoparticle surface can be determined by the wavenumber separation,  $\Delta\nu$ , between the symmetric  $\nu_s(\text{COO}^-)$  and asymmetric  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  FTIR bands. The  $\Delta\nu$  ( $1520 - 1405 = 115\text{ cm}^{-1}$ ) found was ascribed to chelating bidentate coordination in which the interaction between the  $\text{COO}^-$  group and the Fe atom was covalent [28,44].

#### 4.7. Thermogravimetric and differential thermal analysis

TGA provided additional quantitative evidence of the magnetic nanoparticles coating. The initial weight loss of 1.5% is due to the evaporation of physically adsorbed water or degradation of surface hydroxyl groups (Fig. 7). Subsequent weight loss of 24.63% corresponds to decomposition of the surfactant [46]. We note that previous studies showed that the number of surfactant molecules adsorbed on the magnetite surface may vary from 2 to 3.5 molecules/ $\text{nm}^2$  [47]. Thus, for functionalized magnetite nanoparticles with 10 nm diameter the amount corresponding to the surfactant are of the order of 25% of the total mass.

The major weight loss transitions of magnetic nanoparticles occurred between 200 and 450 °C in a two-step process that might indicate the formation of an oleate bilayer on the magnetite surface. In this case, a secondary layer physically adsorbed into a primary layer is decomposed at lower temperatures while the primary layer chemically bound to the particle surface undergoes



**Fig. 7.** TGA and DTA curves of coated nanoparticles.

desorption/decomposition at higher temperatures [48]. The DTA data suggest that the latter process starts at 383 °C.

#### 4.8. Heat dissipation

The specific absorption rate (SAR), which is the amount of energy converted into heat, per unit time, per unit Fe mass, is given by [49]

$$\text{SAR} = c \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{1}{m_{\text{Fe}}} \quad (4)$$

where  $c$  is the sample heat capacity, calculated as a mass weighted mean value of magnetite and water,  $\Delta T/\Delta t$  is the initial slope of the time-dependent temperature curve, and  $m_{\text{Fe}}$  is the iron content per gram of the ferrofluid.

The mean SAR value of the oleate coated nanoparticles was about 14 W/g at a low field amplitude of 15.9 kA/m and frequency of 62 kHz. Rashad et al. managed to obtain similar results with a lower particle concentration, although a much larger magnetic field with 41.5 kA/m amplitude and 160 kHz frequency was employed [50].

Typical SAR values between 10 and 100 W/g are commonly reported for superparamagnetic ferrofluids with low particle concentration and small crystallite sizes submitted to alternating magnetic fields up to 18 kA/m [2–4].

Fig. 8 shows the time-dependent temperature curve of the samples in the AC magnetic field, with a frequency of 62 kHz and amplitude of 15.9 kA/m. We have used a ferrofluid concentration of 50 mg/mL in a 1 mL volume of water. The sample temperature increases rapidly, reaching 42.5 °C in about 1.9 min.

We suggest that the rapid temperature increase, for low values of the amplitude and frequency of the AC field, originates in the dipolar interaction between the 9 nm crystallites that compose the 60 nm nanoparticles.

This interpretation is corroborated by previous works on the impact of the dipolar interaction on the specific absorption rate of dextran coated iron oxide nanoparticles [51–53].

There are also interesting reports on the effects of particle interactions on the cooperative behavior of multicore nanoparticles ferrofluids for hyperthermia [54,55]. Lartigue et al. have found that the magnetic ordering and exchange interactions within the multicore nanostructures may lead to a 10-fold SAR increase for multicore nanoparticle systems with respect to that of single core materials [54].

## 5. Conclusions

In summary, we have reported the synthesis and characterization of oleate coated magnetite nanoparticles with a narrow size distribution, as appropriate for magnetic hyperthermia applications.

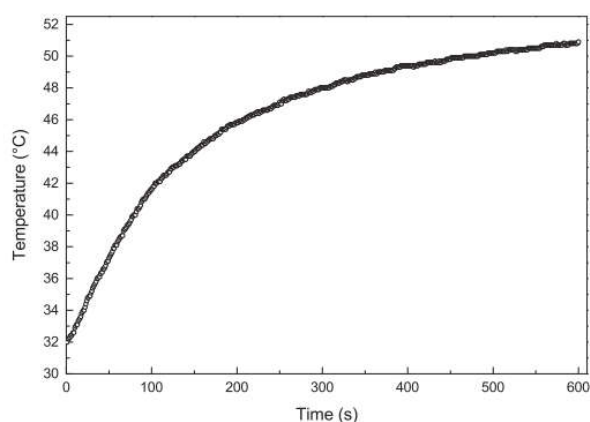


Fig. 8. Time-dependent temperature curve of coated nanoparticles.

The synthesis is based on a simple and inexpensive coprecipitation method with the temperature selected to optimize the oleate coverage of the magnetite nanoparticles.

We have shown that sodium oleate successfully coated the magnetite nanoparticles, in a weight ratio of about 25%, promoting their stabilization into a system with narrow size distribution, with 80% of the crystallites with dimensions in the 6 nm–12 nm range, and average size around 9 nm.

Furthermore the DLS measurements indicate a satisfactory pattern of agglomeration of the nanoparticles in aqueous medium. The mean hydrodynamic diameter of the nanoparticles is  $60.6 \text{ nm} \pm 4.1 \text{ nm}$ , with a small average polydispersity index (PDI) of  $0.128 \pm 0.003$ , as required for safe intravenous applications.

We have also shown that the magnetization measurements in powder samples correspond to a system of dipolar coupled magnetite crystallites, with dimensions ranging from 6 nm to 18 nm, with 83% of the particles in the 6 nm–12 nm range, in agreement with the particle size analysis from TEM images.

The agglomeration of the crystallites in the 60 nm nanoparticles is stable upon heating up to 200 °C. The basic structure is maintained even when the coated nanoparticles are dried at 100 °C to obtain a solid sample, since the TGA data suggest that the surfactant is not decomposed until 200 °C, and when the dried samples are redispersed in water, the colloidal aspect is reproduced.

The system exhibits promising efficiency for magnetic hyperthermia, with a specific absorption rate of 14 W/g at a low field amplitude of 15.9 kA/m and frequency of 62 kHz. The sample temperature increases rapidly, reaching 42.5 °C in about 1.9 min.

We argue that the rapid heating results from the strong dipolar interactions between the crystallites within the 60 nm nanoparticles, leading to a collective behavior of the crystallites.

## Acknowledgments

This research was partially supported by the Brazilian research agencies CAPES and CNPq. The work of A.S.C. was supported by CNPq Grant No. 350773. The work of A.L.D. was supported by CNPq Grant No. 309676. The authors acknowledge technical support from Dr. Geronimo Perez, Mr. Carlos Iglesias and the staff from NUPEG/UFRN and Dimat/INMETRO.

## References

- [1] WHO, Cancer: GLOBOCAN, IARC (2013), Accessed: October 23, 2013, (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>).
- [2] C.S.S.R. Kumar, F. Mohammad, Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* 63 (2011) 789–808.
- [3] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller, M. Zeisberger, Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) S2919.
- [4] S. Laurent, S. Dutz, U.O. Häfeli, M. Mahmoudi, Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 166 (2011) 8–23.
- [5] E. Pollert, P. Veverka, M. Veverka, O. Kaman, K. Záveta, S. Vasseur, R. Epherre, G. Goglio, E. Duguet, Search of new core materials for magnetic fluid hyperthermia: preliminary chemical and physical issues, *Prog. Solid State Chem.* 37 (2009) 1–14.
- [6] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert, E. Duguet, Magnetic nanoparticle design for medical applications, *Prog. Solid State Chem.* 34 (2006) 237–247.
- [7] R.E. Rosenzweig, Heating magnetic fluid with alternating magnetic field, *J. Magn. Magn. Mater.* 252 (2002) 370–374.
- [8] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167.
- [9] C. Alexiou, R. Tietze, E. Schreiber, R. Jurgons, H. Richter, L. Trahms, H. Rahn, S. Odenbach, S. Lier, Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles-magnetic drug targeting, *J. Magn. Magn. Mater.* 323 (2011) 1404–1407.
- [10] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy, *Adv. Drug Del. Rev.* 63 (2011) 24–46.
- [11] A.K.A. Silva, E.L. Silva, J.F. Carvalho, T.R.F. Pontes, R.P. Araújo Neto, A. Silva Carriço, E.S.T. Egitto, Drug targeting and other recent applications of magnetic carriers in therapeutics, *Key Eng. Mater.* 441 (2010) 357–378.
- [12] E.L. Silva, J.F. Carvalho, T.R.F. Pontes, E.E. Oliveira, B.L. Francelino, A.C. Medeiros, E.S.T. Egitto, J.H. Araujo, A.S. Carriço, Development of a magnetic system for the treatment of *Helicobacter pylori* infections, *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (2009) 1566–1570.
- [13] M. Yu, J. Park, S. Jon, Magnetic nanoparticles and their applications in image-guided drug delivery, *Drug Deliv. Transl. Res.* 2 (2012) 3–21.
- [14] U.O. Häfeli, Magnetically modulated therapeutic systems, *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 19–24.
- [15] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* 26 (2005) 3995–4021.
- [16] N. Tran, T.J. Webster, Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 8760–8767.
- [17] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 771–782.
- [18] T. Neuberger, B. Schof, H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system, *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 483–496.
- [19] A.P. Khandhar, R.M. Ferguson, K.M. Krishnan, Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: implications in biological systems, *J. Appl. Phys.* 109 (2011) 7B310–317B3103.
- [20] B. Luigjes, S.M.C. Woudenberg, R. de Groot, J.D. Meeldijk, H.M. Torres Galvis, K.P. de Jong, A.P. Philipse, B.H. Erné, Diverging geometric and magnetic size distributions of iron oxide nanocrystals, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 14598–14605.
- [21] C. Rümenapp, B. Gleich, A. Haase, Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics, *Pharm. Res.* 29 (2012) 1165–1179.
- [22] A. Tomitaka, T. Koshi, S. Hatsugai, T. Yamada, Y. Takemura, Magnetic characterization of surface-coated magnetic nanoparticles for biomedical application, *J. Magn. Magn. Mater.* 323 (2011) 1398–1403.
- [23] Z. Karimi, L. Karimi, H. Shokrollahi, Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 2465–2475.
- [24] J.K. Oh, J.M. Park, Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: design, preparation, and biomedical application, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 168–189.
- [25] A. Tomitaka, K. Ueda, T. Yamada, Y. Takemura, Heat dissipation and magnetic properties of surface-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles for biomedical applications, *J. Magn. Magn. Mater.* 324 (2012) 3437–3442.
- [26] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, N. Li, Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 3093–3097.
- [27] E. Tombácz, D. Bica, A. Hajdú, E. Illés, A. Majzik, L. Vékás, Surfactant double layer stabilized magnetic nanofluids for biomedical application, *J. Phys.: Condens. Matter* 20 (2008) 204103.
- [28] W. Jiang, Y. Wu, B. He, X. Zeng, K. Lai, Z. Gu, Effect of sodium oleate as a buffer on the synthesis of superparamagnetic magnetite colloids, *J. Colloid Interface Sci.* 347 (2010) 1–7.
- [29] B. Bateer, Y. Qu, X. Meng, C. Tian, S. Du, R. Wang, K. Pan, H. Fu, Preparation and magnetic performance of the magnetic fluid stabilized by bi-surfactant, *J. Magn. Magn. Mater.* 332 (2013) 151–156.
- [30] J. Sun, S. Zhou, P. Hou, Y. Yang, J. Weng, X. Li, M. Li, Synthesis and characterization of biocompatible  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. A* 80A (2007) 333–341.
- [31] T.K. Jain, M.K. Reddy, M.A. Morales, D.L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 316–327.
- [32] R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247–1248.

- [33] A.S. Zahr, M.V. Pishko, Nanotechnology for cancer chemotherapy, in: M.M. Villiers, P. Aramwit, G.S. Kwon (Eds.), *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer, New York, 2009, pp. 491–518.
- [34] A. Hajdú, E. Tombácz, E. Illés, D. Bica, L. Vékás, Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application, in: Z. Hórvolgyi, E. Kiss (Eds.), *Colloids for Nano- and Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 29–37.
- [35] M.A. Morales, A.J.S. Mascarenhas, A.M.S. Gomes, C.A.P. Leite, H.M.C. Andrade, C.M.C. de Castilho, F. Galembeck, Synthesis and characterization of magnetic mesoporous particles, *J. Colloid Interface Sci.* 342 (2010) 269–277.
- [36] T. Belin, N. Guigue-Millot, T. Caillot, D. Aymes, J.C. Niepce, Influence of grain size, oxygen stoichiometry, and synthesis conditions on the  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  vacancies ordering and lattice parameters, *J. Solid State Chem.* 163 (2002) 459–465.
- [37] G. Gnanaprakash, S. Mahadevan, T. Jayakumar, P. Kalyanasundaram, J. Philip, B. Raj, Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 103 (2007) 168–175.
- [38] J. Lee, T. Isobe, M. Senna, Preparation of ultrafine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles by precipitation in the presence of PVA at high pH, *J. Colloid Interface Sci.* 177 (1996) 490–494.
- [39] B. Veriansyah, J.-D. Kim, B.K. Min, J. Kim, Continuous synthesis of magnetite nanoparticles in supercritical methanol, *Mater. Lett.* 64 (2010) 2197–2200.
- [40] S. Yu, G.M. Chow, Carboxyl group ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2781–2786.
- [41] J.M.D. Coey, *Magnetism and Magnetic Materials*, Cambridge University Press, New York, 2010.
- [42] J.F. de Carvalho, S.N. de Medeiros, M.A. Morales, A.L. Dantas, A.S. Carriço, Synthesis of magnetite nanoparticles by high energy ball milling, *Appl. Surf. Sci.* 275 (2013) 84–87.
- [43] S. Yang, H. Liu, A novel approach to hollow superparamagnetic magnetite/polystyrene nanocomposite microspheres via interfacial polymerization, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 4480–4487.
- [44] C.Y. Wang, J.M. Hong, G. Chen, Y. Zhang, N. Gu, Facile method to synthesize oleic acid-capped magnetite nanoparticles, *Chin. Chem. Lett.* 21 (2010) 179–182.
- [45] L. Zhang, R. He, H.-C. Gu, Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 2611–2617.
- [46] P. Roonasi, A. Holmgren, A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nanoparticle surface, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 5891–5895.
- [47] M. Klokkenburg, J. Hilhorst, B.H. Erne, Surface analysis of magnetite nanoparticles in cyclohexane solutions of oleic acid and oleylamine, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 243–248.
- [48] Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C.N. Sukenik, G. Markovich, Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: a comparison with fatty acids, *Langmuir* 17 (2001) 7907–7911.
- [49] M. Ma, Y. Wu, J. Zhou, Y. Sun, Y. Zhang, N. Gu, Size dependence of specific power absorption of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles in AC magnetic field, *J. Magn. Magn. Mater.* 268 (2004) 33–39.
- [50] M.M. Rashad, H.M. El-Sayed, M. Rasly, M.I. Nasr, Induction heating studies of magnetite nanospheres synthesized at room temperature for magnetic hyperthermia, *J. Magn. Magn. Mater.* 324 (2012) 4019–4023.
- [51] C.L. Dennis, A.J. Jackson, J.A. Borchers, R. Ivkov, A.R. Foreman, P.J. Hoopes, R. Strawbridge, Z. Pierce, E. Goertitz, J.W. Lau, C. Gruettner, The influence of magnetic and physiological behaviour on the effectiveness of iron oxide nanoparticles for hyperthermia, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41 (2008) 134020.
- [52] C.L. Dennis, A.J. Jackson, J.A. Borchers, R. Ivkov, A.R. Foreman, J.W. Lau, E. Goertitz, C. Gruettner, The influence of collective behavior on the magnetic and heating properties of iron oxide nanoparticles, *J. Appl. Phys.* 103 (2008) 07A319.
- [53] C.L. Dennis, A.J. Jackson, J.A. Borchers, P.J. Hoopes, R. Strawbridge, A.R. Foreman, J. van Lierop, C. Grüttner, R. Ivkov, Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia, *Nanotechnology* 20 (2009) 395103.
- [54] L. Lartigue, P. Hugounenq, D. Alloyeau, S.P. Clarke, M. Lévy, J.-C. Bacri, R. Bazzi, D.F. Brougham, C. Wilhelm, F. Gazeau, Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents, *ACS Nano* 6 (2012) 10935–10949.
- [55] S. Dutz, M. Kettering, I. Hilger, R. Müller, M. Zeisberger, Magnetic multicore nanoparticles for hyperthermia influence of particle immobilization in tumour tissue on magnetic properties, *Nanotechnology* 22 (2011) 265102.



**5.3 Artigo: Revisão de Achados sobre Cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010-2013.**

Revista: Arquivos de Ciências da Saúde (FAMERP)

ISSN 1807-1325

vol.21 n.3 p.28-35 Jul.2014

Fator de Impacto 2015/2016: Não possui

Quali/CAPES 2013-2016: C MEDICINA II

(<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>)

**Participação como coautor em artigo científico submetido. Outras produções não relacionadas à tese.**

**ARTIGO REVISÃO**

# Revisão dos achados sobre Cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010 2013

## *Review of the findings related to staphylococcus aureus strains resistant in Brazil from 2010 to 2013*

Juliana Fernandes de Carvalho<sup>1</sup>, Fabrícia Lima Fontes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Farmacêutica, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN

<sup>2</sup>Farmacêutica, Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN.

---

### Resumo

**Introdução:** O desenvolvimento de resistência por cepas de *Staphylococcus aureus* está diretamente ligado a falhas na terapêutica antimicrobiana, e tem como consequência a elevação nos custos com saúde. Pesquisas sobre distribuição e perfil do patógeno têm norteado a terapêutica e o uso racional de medicamentos pelo mundo. No Brasil, entretanto, há uma enorme carência de publicações oficiais sobre resistência desse micro-organismo. **Objetivo:** Esta revisão tem por objetivo buscar na literatura dados de estudos brasileiros sobre *Staphylococcus aureus* resistente aos antimicrobianos publicados no período de 2010 a 2013. **Material e Métodos:** Foi realizada uma revisão da literatura a partir de artigos relevantes publicados entre os anos de 2010 e 2013 em periódicos científicos indexados nas bases de dados da Biblioteca Virtual em Saúde para avaliação estatística. **Resultados:** Foram encontrados 37 artigos no total, entretanto apenas 14 desses foram selecionados por tratarem especificamente da resistência de *Staphylococcus aureus*. A pesquisa da literatura científica revelou um número limitado de estudos que tratam de *Staphylococcus aureus* resistente. São poucas as publicações sobre o assunto nos últimos anos, sendo essas, principalmente, provenientes dos estados do sudeste e nordeste do Brasil, e em sua maioria, de origem hospitalar. **Conclusão:** A pesquisa da literatura científica revelou um número limitado de estudos que examinaram a resistência de *Staphylococcus aureus*, e foi observado que a grande maioria dos estudos estão concentrados nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O número crescente de registros/ano e publicações nas áreas de alimento e veterinária demonstra aumento da conscientização quanto à necessidade de informações sobre estafilococos resistentes.

**Descritores:** Revisão; Resistência microbiana a medicamentos; *Staphylococcus aureus*; Brasil.

### Abstract

**Introduction:** The development of resistance by *Staphylococcus aureus* strains is directly linked to antimicrobial therapy failures. Its major consequences are increased healthcare costs. Research has guided the therapy and the rational use of drugs worldwide regarding the pathogen distribution and profile. In Brazil, however, there is a huge lack of official publications regarding the resistance of this microorganism. **Objective:** The purpose of this review of the literature is to document the known evidence of Brazilian data regarding the bacterial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in articles published from 2010 to 2013. **Material and Methods:** We searched the Virtual Health Library for relevant studies for a period spanning 2010-2013. **Results:** A total of 37 articles were retrieved. After a full-text review, we included 14 articles addressing specifically the resistance of *Staphylococcus aureus*. In recent years, we could observe the presence of a few publications on the subject. The publications were mainly from the States of Southeastern and Northeastern of Brazil. Most publications are of hospital origin. **Conclusion:** A search of the scientific literature revealed a limited number of studies that examined the resistance of *Staphylococcus aureus*. The vast majority of studies are concentrated in the Southeastern and Northeastern regions of Brazil. Food and veterinary areas show an increasing number of records/year and publications. This demonstrates an awareness-raising in the need for information regarding antibiotic-resistant *Staphylococci*.

**Keywords:** Review; Microbial drug resistance; *Staphylococcus aureus*; Brazil.

---

Recebido em 19/04/2014

Aceito em 29/06/2014

Não há conflito de interesse

## Introdução

Antibióticos são produtos do metabolismo secundário microbiano com finalidade de defesa, promovendo a morte ou a inibição do crescimento de outros micro-organismos. A descoberta dessas substâncias, aliada ao reconhecimento do potencial como agente terapêutico, concretizou um grande marco na área de saúde, se consolidando no cenário da II Guerra Mundial, onde o tratamento de infecções de feridas era crítico para sobrevivência dos remanescentes da guerra<sup>(1)</sup>.

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, o tratamento mais comum e eficaz de doenças infecciosas baseia-se na neutralização do patógeno por antibioticoterapia<sup>(2-3)</sup>. O número de moléculas antibióticas usadas na rotina médica teve pouco ou nenhum crescimento. As inovações nesse campo ocorrem essencialmente por “melhoramento” da molécula ativa, com adição de radicais, visando tanto a ampliação do espectro quanto melhorias nas propriedades tecnológicas: ação em maior número de micro-organismos e efeitos adversos reduzidos ou características que prejudiquem sua formulação como medicamento. O advento da resistência microbiológica impôs a necessidade de pesquisa de moléculas inéditas, para suprir a utilização dos ativos que vinham ficando obsoletos em virtude da seleção dos micro-organismos<sup>(4)</sup>. As pesquisas em novos compostos ainda não evoluem na velocidade da demanda, sendo necessárias medidas alternativas para controle de doenças infecciosas<sup>(5)</sup>.

O desenvolvimento da resistência em micro-organismos patogênicos gera grande preocupação em virtude da redução da eficácia terapêutica a um tratamento empírico<sup>(4)</sup>. A resistência ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea no DNA ou por transposição e transferência de plasmídeos resistentes<sup>(6)</sup>. Isso ocorre em consequência do uso corriqueiro e sem critério de antibióticos, possibilitando o acúmulo de mutações e o desenvolvimento de multirresistência. Há uma baixa considerável no arsenal terapêutico, tornando a cura demorada e cara, ou, por vezes, inatingível<sup>(7)</sup>.

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), coco Gram-positivo, encontrado colonizando a microbiota natural, é frequentemente implicado na epidemiologia das infecções comunitárias e relacionadas à assistência em saúde (IrAS), incluindo bacteremias, infecções de pele, tecidos moles, ósseos, articulares, pneumonia e endocardite<sup>(8)</sup>. É um dos mais importantes patógenos oportunistas para o homem e, provavelmente, o exemplo mais conhecido e estudado de desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo capaz de

reproduzir todos os mecanismos de resistência conhecidos. Atualmente, é um dos mais notórios micro-organismos implicado nas infecções nosocomiais e encontrado frequentemente em superfícies de implantes contaminados com biofilmes<sup>(9)</sup>.

No Brasil, as discussões sobre a problemática da resistência bacteriana foram colocadas em termos de Consulta Pública e culminaram na medida descrita como Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 44, de 26 de outubro de 2010, que instituiu modificações nos produtos farmacêuticos à base de substâncias antimicrobianas para controle mais rígido de compra e venda desses medicamentos, e fixou o prazo para as indústrias e farmácias se adequarem<sup>(10)</sup>. Entretanto, mesmo que a retenção de receitas leve a um impacto potencial na redução global de consumo de antimicrobianos, ainda é necessário a avaliação entre consumo e resistência<sup>(11)</sup>.

O surgimento de cepas microbianas com crescentes níveis de resistência aos antimicrobianos é objeto de preocupação em todo o mundo. O presente estudo visa fornecer informações com intuito de minimizar a carência de informações relacionada a Cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil e contribuir para a implantação de ações que otimizem a utilização de um arsenal terapêutico.

## Material e Métodos

Conduzimos uma pesquisa com revisão integrativa da literatura, com levantamento bibliográfico realizado na base de dado: Portal de Pesquisa da Biblioteca Virtual em Saúde (<http://bvsalud.org/>). Foram selecionados artigos de acesso livre e publicados no período de 2010 a 2013, usando os seguintes descritores: “bacterial resistance”, “*Staphylococcus aureus*” e “Brazil”. Artigos obtidos nos catálogos de periódicos *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com>) e PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), assim como dados do SINAN/SVS/MS (Sistema Nacional de Agravos Notificáveis da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde) foram utilizados para embasar a discussão dos dados. Foram excluídos, artigos publicados fora do período proposto pelo estudo, que abordassem como tema central outros micro-organismos ou novos compostos ativos farmacologicamente; artigos não disponibilizados integralmente pela UFRN no sistema CAFe - RNP (Comunidade Acadêmica Federada e Rede Nacional de Ensino e Pesquisa), revisões e com resumos de congressos. Dos 37 artigos encontrados, foram selecionados 14 artigos (Tabela 1). As informações extraídas foram agrupadas em quatro categorias e apresentadas em tópicos.

**Tabela 1.** Dados dos artigos selecionados para revisão

Artigo	Título	Autor	Desfecho
1	Oxacillin Resistance of <i>Staphylococcus aureus</i> Isolated from the University Hospital of Botucatu Medical School in Brazil	Martins A. e cols.	Foram testados diferentes métodos para detecção de resistência à oxacilina, em amostra de 45,1% de isolados <i>mecA+</i> e 5 isolados resistentes <i>mecA-</i> . A menor sensibilidade foi observada em testes fenotípicos, tendo o E-test como representante mais sensível desses (96,8%). Os testes de difusão em disco apresentaram também baixa sensibilidade (86,9%), e, portanto, baixa confiabilidade. Exceto estudos com disco de cefoxitina, que apresentaram boa performance.
2	Identification of <i>Staphylococcus aureus</i> Carrying the <i>mecA</i> Gene in Ready-to-Eat Food Products Sold in Brazil	Rizek C. F. e cols.	<i>Staphylococcus aureus mecA</i> -positivo foram encontrados em comida japonesa sugerindo a possibilidade de contaminação devido o manuseio da comida, como potencial rota para disseminação do micro-organismo carreando gene de resistência
3	Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study	Marra A. R. e cols.	Foram analisados 2563 casos de infecções sistêmicas em 16 hospitais no Brasil e o cenário encontrado foi de: 95% das infecções com caráter monomicrobiano; 49% ocorrendo em UTIs; sendo o principal fator predisponente o uso de cateter venoso central (70,3%); e colonização dada principalmente por bactérias Gram-negativas (58,5%). O patógeno mais incidente foi <i>S. aureus</i> , menos prevalentes apenas na neurocirurgia, mas com altos níveis de resistência à meticilina. Sua caracterização SCCmec revelou que o subtipo mais comumente encontrado foi o SCCmec tipo III pertencente ao Clone Endêmico Brasileiro.
4	Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococci on a Farm: Staff can Harbour MRS When Animals Do Not	Aquino G.V. e cols.	De 161 amostras de animais e funcionários saudáveis da Faculdade de Ciências Agrária e Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, apenas 2,5% eram cepas estafilocócicas, todas <i>mecA+</i> , coagulase-negativas e provenientes de humanos. Dos 4 isolados encontrados, apenas 1 teve caráter multirresistente.
5	SCCmec Type IV, PVL-Negative, Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in Cystic Fibrosis Patients from Brazil	Mimica M.J. e cols.	24,5% dos pacientes com fibrose cística estavam colonizados por <i>S. aureus</i> e mais de 70% eram colonizados cronicamente. As cepas resistentes foram identificadas carreando SCCmec tipo III e IV, com forte associação à multirresistência e à resistência somente à penicilina, oxacilina e eritromicina, respectivamente. Nenhum dos isolados portavam o gene PVL relacionado a infecções pulmonares invasivas.
6	Novel sequence types (STs) of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates causing clinical and subclinical mastitis in flocks of sheep in the northeast of Brazil	Almeida L.M. e cols.	Estudo em ovinos com mastite isolaram <i>S. aureus</i> no leite de 29% da população. O encontro de sequências associadas à infecção de humanos sugere possibilidade de contaminação humana. E o achado de variações alélicas ainda não descritas em cepas de <i>S. aureus</i> pode favorecer à sobrevivência da bactéria e sua capacidade de causar infecções na glândula mamária de ovinos.
7	Characterization of MLSb resistance among <i>Staphylococcus aureus</i> and	Teodoro C.R.S. e cols.	71 isolados clínicos de estafilococos foram analisados observando-se correlação entre os gene <i>erm(A)</i> o tipo SCCmec III em <i>S. aureus</i> (com altos valores de resistência à eritromicina e clindamicina), enquanto em <i>S. epidermidis</i> o gene <i>erm(C)</i> , encontrado principalmente em cassette <i>mec</i>

Artigo	Título	Autor	Desfecho
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> isolates carrying different SCCmec types		IV ou não tipável era o grande responsável pela resistência. Outro fato notório é da resistência à macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B ser predominantemente fenótipo constitutivo em cepas de MRSA, enquanto em cepas de MRSE tem caráter induzido.
8	Colonização pelo <i>Staphylococcus aureus</i> em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco	Silva E.C.B.F. e cols.	Foi observado que dos 151 profissionais avaliados 25,8% se encontravam colonizados e aponta estes como importantes fontes de infecção para indivíduos susceptíveis. Dentre as variáveis estudadas, a faixa etária e a quantidade de EPI apresentaram-se associadas à colonização pelo micro-organismo. De todas as linhagens isoladas, apenas cinco apresentaram resistência à metilina.
9	First report of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil	Becker A.P. e cols.	Foram estudados 30 clones isolados de pacientes com infecções por MRSA em dois hospitais na cidade de Porto Alegre e determinou seu tipo de clone endêmico. Observou-se 18 (60%) cepas SCCmec III e 11 (36,7%) SCCmec tipo I.
10	Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> from ICU units in Brazil	Campos G.B. e cols.	Este estudo mostrou que todas as cepas isoladas apresentaram características genotípicas da SCCmec tipo III. Em testes de desinfecção, de hipoclorito de sódio (0,5, 1,0 e 2,0%), 2% de gluconato de clorexidina, de amônio quaternário, ácido peracético e o formaldeído foram eficazes contra os isolados testados. As cepas apresentaram maior resistência ao ácido acético a 4%, álcool e glutaraldeído. Os resultados deste estudo devem ajudar a reduzir a ocorrência de infecções hospitalares e, portanto, a morbidade, mortalidade e obrigações sócio-econômico causado pela hospitalização prolongada.
11	Proposta sobre uso de dados de receitas de antimicrobianos retidas: a experiência EUREQA	Camargo E.C.Ge cols,	Foi demonstrada a importância da informação sobre o consumo de antimicrobianos e propõe estratégias de saúde pública que tenham como base análises quantitativas de eventos reais usando um teste de hipóteses de efeitos indiretos de prescrições ou de consumo sobre a resistência a antimicrobianos.
12	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one	Caboclo R.M.F. e cols.	O estudo mostrou que houve o surgimento de cepas MRSA SCCmec IV e SCCmec II tanto em hospitais públicos quanto em privados. Estes fatos indicam a capacidade de certas linhagens de MRSA surgir em hospitais brasileiros, e as características da instituição de saúde facilitam a sua disseminação.
13	Peritonitis in recent years: clinical findings and predictors of treatment response of 170 episodes at a single Brazilian center	Oliveira L.G. e cols.	Este estudo mostrou que as características clínicas atuais e as mudanças importantes no perfil microbiológico indicam uma menor incidência de peritonite, mas maior gravidade dos episódios de peritonite e um maior risco de morte, possivelmente devido à resistência bacteriana. Foi observado também que a idade avançada é um fator de risco importante, sugerindo que o tratamento clínico mais intensivo de infecções peritoneais em idosos é necessário.
14	Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections in a tertiary hospital in Maceió, Alagoas, Brazil	Tenório M.T.F. e cols.	De acordo com o estudo, as características mais relevantes que podem levar ao aumento da morbidade e mortalidade devido a infecções da corrente sanguínea foram a presença de fonte de infecção respiratória, o isolamento de <i>S. aureus</i> em culturas de sangue, a idade dos pacientes com mais de 60 anos e gravidade dos pacientes em UTI. Assim, tais resultados podem contribuir para a adoção de medidas preventivas e terapêuticas eficazes, capazes de melhorar a sobrevivência destes pacientes.

## Resultados e Discussão

Infeções bacterianas: áreas de abrangência  
*S. aureus* são reconhecidamente um dos micro-organismos mais incidentes em infecções, sendo considerado um dos patógenos humanos mais comuns<sup>(12-14)</sup>. A transmissão pode ocorrer de um indivíduo a outro por contato direto ou indireto, relatado principalmente no ambiente hospitalar, onde estudos anteriores já revelaram a presença de um mesmo clone em pacientes e profissionais de saúde. Ocorre também por contato direto com alimentos ou animais contaminados, apesar dessas vias não serem tão extensamente investigadas na epidemiologia de *S. aureus* resistentes<sup>(15-16)</sup>. Apesar das diferentes formas de disseminação do patógeno, a contaminação nos ambientes hospitalares é, notoriamente, a que mais preocupa a comunidade científica. Essa preocupação é refletida no número de relatos na literatura, nos quais 77% dos artigos encontrados registravam dados de *S. aureus* resistentes em ambiente hospitalar (Tab. 2).

**Tabela 2.** Porcentagem de publicações na área do conhecimento em que foram isoladas cepas de *S. aureus*.

Área de Conhecimento	Porcentagem
Hospitalar	77%
Veterinária	15%
Alimentar	8%

No contexto alimentar, Rizek e cols.<sup>(16)</sup>, relataram achados de alimentos contaminados com *S. aureus* geneticamente resistentes, perfazendo 9% dos produtos pesquisados. Apesar de ser uma população pequena, a descoberta de genes de resistência chama atenção para a possibilidade das práticas para conservação de alimento representarem o estresse necessário para o micro-organismo iniciar a produção de proteínas características de resistência. A identificação de agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA) só tem sido possível em algumas situações, como surtos, nos quais existe um esforço conjunto para o esclarecimento etiológico<sup>(17)</sup>. De acordo com a notificação de surtos das DTA no SINAN/SVS/MS, durante os anos de 2010, 2011, 2012 e até o mês de abril 2013, ocorreram respectivamente 498, 795, 792 e 9 casos de DTA, dos quais o *S. aureus* foi o agente etiológico de 41, 38, 36 casos nos respectivos anos. Em 2013, até a data de busca, ainda não tinha sido relatado nenhum caso de DTA ocasionado pelo *S. aureus*.

Na área veterinária, os trabalhos realizados demonstraram que os subtipos que contaminam animais, além de serem susceptíveis aos antibióticos testados, não foram ainda encontrados em humanos<sup>(18)</sup>. Todavia, os dados ainda não são suficientes para descartar a transmissão animal-ser humano, mesmo que rara.

### *Staphylococcus aureus* no contexto das publicações

O *S. aureus* tem prevalência crescente em hospitais pelo mundo<sup>(14,19)</sup>. A presença frequente desse patógeno em ambiente hospitalar ocorre pelas facilidades de disseminação do micro-organismo por meio das mãos dos profissionais e equipamentos e pela facilidade de contágio de indivíduos imunologicamente debilitados<sup>(16)</sup>. As infecções que trazem como agente etiológico o *S. aureus*, são aproximadamente 20% das infecções hospitalares sistêmicas registradas no Brasil e associadas a

importantes taxas morbidade e mortalidade<sup>(14)</sup>. O----- *S. aureus* é considerado um dos micro-organismos mais frequentes em infecções sistêmicas hospitalares<sup>(13)</sup>, tendo prevalência de disseminação entre 25,8% dos profissionais da enfermagem, segundo pesquisa de Silva e cols.<sup>(20)</sup>.

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a uma vasta distribuição de antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomomicina e tetraciclina, tornou-se um problema de saúde pública, em virtude das opções terapêuticas limitadas disponíveis<sup>(21)</sup>. Os *S. aureus* resistentes à meticilina (do inglês *methicillin-resistant S. aureus* [MRSA]) adquiriram prevalência expressiva nas populações adulta e pediátrica em ambiente hospitalar, configurando um desafio para a terapia antimicrobiana, em razão do perfil de multirresistência<sup>(22)</sup>. Infecções por MRSA, na ausência de fatores de risco, relatadas na comunidade, são referidas como infecções por MRSA associados à comunidade (*Community-associated-MRSA* [CA-MRSA])<sup>(23)</sup>. De acordo com pesquisas realizadas em hospital terciário de Maceió, os estafilococos são o segundo patógeno mais incidente em culturas de sangue de pacientes diagnosticados com sepse, em que 50% dessa população é acometida por infecções causadas por cepas MRSA, e ocupam o primeiro lugar em prevalência quando a mortalidade dos pacientes é a variável estudada<sup>(11, 24)</sup>.

Antes de se tornar sistêmico, o contágio por *S. aureus* surge principalmente em decorrência de contaminações no trato respiratório, e nesse cenário, doenças de base, como a fibrose cística, predispõe o paciente a sucessivas contaminações e a um aumento na probabilidade para o desenvolvimento de cepas resistentes, tendo como resultado um mau prognóstico no tratamento. Outro fator preponderante para infecções estafilocócicas é a presença de acessos venosos, sondas ou aparelho que permitam o acesso facilitado da bactéria ao interior do organismo. Esses aparatos expõem o paciente a infecções recorrentes que acabam por exercer a pressão seletiva necessária para o desenvolvimento de resistência, resultando em grande incidência na falha de tratamento e, conseqüente, elevação na mortalidade desses pacientes<sup>(23, 25)</sup>.

No Brasil a cepa MRSA de origem hospitalar mais comum é o Clone Endêmico Brasileiro (BEC) SCCmec tipo III. Este é um dos cinco clones mais prevalentes no mundo, apresentando resistência a várias classes de antibióticos<sup>(11)</sup>. Essa prevalência é notória nas publicações analisadas, estando presente em 40% dos artigos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Clones de *Staphylococcus aureus* citados nas publicações analisadas.

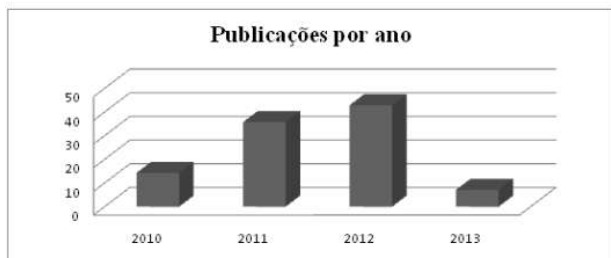
Clones de <i>Staphylococcus aureus</i>	%
SCCmec III	40
SCCmec IV	33
SCCmec II	20
SCCmec I	7

O estudo do perfil das cepas de *S. aureus* mais prevalentes em cada região do Brasil ainda não ocorre de maneira uniforme. As regiões sudeste e nordeste se consolidam como centros com maior número de dados relatos, enquanto as demais apresentam esparsas publicações, como é possível observar na Tabela 4.

**Tabela 4.** Citações em publicações entre 2010 a 2013 sobre resistência bacteriana de *S. aureus* por regiões no Brasil.

Região	Quantidade de Citações
Norte	2
Centro Oeste	2
Sul	3
Nordeste	6
Sudeste	9

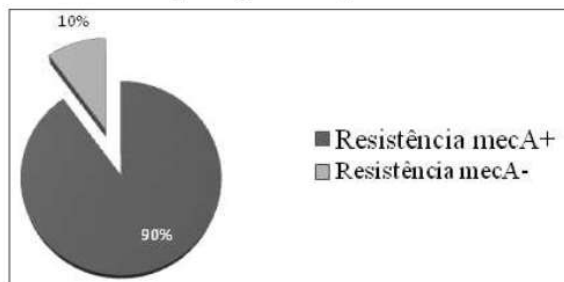
Entretanto, apesar da desigualdade no número de publicações por região no país, é notável uma conscientização crescente quanto à necessidade de relatos no campo da resistência bacteriana no Brasil, refletida em cifras crescentes de dados/ano publicados, como mostra a Figura 1.



**Figura 1.** Número de publicações sobre resistência bacteriana por ano no Brasil. Fonte: A autora.

#### Desenvolvimento de resistência

As taxas de resistência antimicrobiana são crescentes em todo mundo, e o consumo exacerbado de antibióticos e o subaproveitamento são pontos crítico para a seleção de resistência em micro-organismos<sup>(11, 12)</sup>. A resistência dentre as cepas de *S. aureus* é bastante estudada, e pode estar ligada à expressão do gene *mecA* no cromossomo cassete estafilococal (SCCmec), gene comum a todas as cepas de estafilococos e, portanto, útil como marcador molecular de resistência. O gene *mecA* estimula (1) a inativação do fármaco por hiperprodução de  $\beta$ -lactamase; (2) produção de proteína ligadora de penicilina (PBP); (3) alterações na subunidade 23S do RNAr; e síntese de bombas de efluxo<sup>(14, 16, 19)</sup>. A resistência pode ocorrer também, sem a expressão do gene *mecA*, mas como demonstrado na Figura 2 não há muitos relatos no Brasil que tragam esse quadro.



**Figura 2** – Esquema representando as publicações que notificam resistência de cepas de *S. aureus* mecA positivas e negativas. FONTE: autora.

#### Medicamentos abordados

A terapia empírica inicial para infecções por *S. aureus* emprega dois ou mais antibióticos de amplo espectro, principalmente quando há chance de infecções por micro-organismos resistentes, apesar do maior número de antibióticos predispor a bactéria à maior pressão seletiva para resistência, essa tem sido a alternativa, em hospitais, para pacientes de alto risco<sup>(13)</sup>.

No Brasil, os medicamentos mais citados para teste de resistência de *S. aureus* são oxacilina, sulfametoxazol/trimetopina, gentamicina, clindamicina e eritromicina, todos com baixas taxas de resposta terapêutica eficiente. Por um lado, a clindamicina, o sulfametoxazol/trimetopina, a gentamicina e o ciprofloxacino apresentam eficácia de menos de 10% em cepas do tipo BEC e, portanto, falham na maioria dos casos encontrados no Brasil. Por outro lado, esses medicamentos são altamente eficazes contra o clone SCCmec IV, segundo mais incidente em nosso país, revelando a necessidade da caracterização do tipo de *S. aureus* para um tratamento acertado<sup>(11,25-26)</sup>. A cefoxitina e a clindamicina são relatadas como potentes indutores de resistência, o que limita a utilização desses medicamentos em caso de cepas susceptíveis<sup>(14, 19)</sup>.

Foi descrito, em triagem com profissionais de saúde, 100% resistência à penicilina e altos índices de resistência à rifampicina e eritromicina. Algumas das cepas isoladas cursavam com alta sensibilidade à mupirocina e linezolida, enquanto outras apresentaram resistência intermediária à vancomicina e, no perfil da baixa resistência, estavam os medicamentos comumente testados (clindamicina, sulfametoxazol/trimetopina, cloranfenicol, gentamicina e cefoxetina), demonstrando um perfil diferente das cepas encontradas em pacientes e carregadas por profissionais de saúde<sup>(20)</sup>. Dentre a população de profissionais da área de saúde, os enfermeiros aparecem como principais carregadores do micro-organismo. Esta observação pode ser justificada pelo maior contato desses profissionais com os pacientes e também pelo fato de realizarem a maioria dos procedimentos relativos aos cuidados em uma rotina hospitalar.

Os glicopeptídeos ainda são os fármacos mais efetivos no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, apesar de seu emprego necessitar de certa cautela, em função do aparecimento de cepas com resistência intermediária, são o recurso mais efetivo quando o paciente não responde a outros tratamentos. A linezolida e a vancomicina se consagram como os fármacos com maior taxa de resultados positivos na presença de infecções por *S. aureus*<sup>(11)</sup>. Além da preocupação inicial da resistência aos antimicrobianos, o fenômeno da resistência também é observado na presença de outros produtos químicos, como os agentes desinfetantes e saneantes, que exercem papel essencial na garantia de esterilidade do ambiente e/ou dos materiais, e dificultam a transmissão indireta de *S. aureus*. São poucos os trabalhos que se destinam à investigação desse tipo de resistência. Em um dos estudos, Campos e cols.<sup>(12)</sup> identificaram alta eficiência de saneantes como hipoclorito de sódio, clorexidina 2%, amônia quaternária, ácido paracético e formaldeído para limpeza de materiais contaminados com estafilococos, enquanto o álcool a 70% e o glutaraldeído enfrentaram altos valores de resistência bacteriana.

A partir da vigência da RDC 44/10, o combate ao crescimento da resistência bacteriana incluiu não somente o sistema de saúde humana e sua vigilância, mas também a saúde animal, uma vez que a medida restritiva de venda tem abrangência para as prescrições de uso veterinário de antibióticos. Embora a retenção de receitas tenha impacto potencial na redução global de consumo de antibióticos, ainda faz-se necessária a avaliação entre consumo e resistência, fornecida por um modelo atual. Pesquisa observou uma correlação positiva entre consumo das quinolonas e resistência comunitária ao *E. coli*, mas é possível que existam outras correlações quando estudados diferentes antimicrobianos e/ou micro-organismos<sup>(27)</sup>.

### Conclusões

O número de relatos do impacto clínico e econômico em decorrência da presença de micro-organismos resistentes é crescente, particularmente no ambiente hospitalar, e tendo o *S. aureus* como um dos agentes multirresistentes mais comuns de infecção nosocomial no Brasil. O arsenal terapêutico para tratamento de infecções causadas por *S. aureus* está cada vez mais restrito em virtude da disseminação da resistência bacteriana, apontando para o emprego cada vez mais variado de antibióticos.

Apesar de ser crescente o número de publicações sobre o assunto, parece haver uma redução no número de cepas de *S. aureus* resistentes registrado nas publicações mais recentes. Essa redução mostra que, além da preocupação da comunidade científica em notificar seus achados, está havendo uma maior conscientização da população em geral para prevenção do desenvolvimento de resistência, o que podemos atribuir a campanhas de boas práticas de higiene, mas principalmente à dificuldade de acesso aos antibióticos imposta pela nova legislação de compra e venda desses medicamentos, além da dispensação e terapêutica criteriosa.

A caracterização genotípica e fenotípica das cepas de *S. aureus* responsáveis pelo declínio da situação de saúde dos pacientes, principalmente em âmbito hospitalar, é de inestimável valor para escolha da estratégia de tratamento mais efetiva e para redução do índice de mortalidade nessa população.

### Referências

1. Bush K. The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1213:1-4. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05872.x.
2. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J Invest Surg.* 2012;25(2):67-77. doi: 10.3109/08941939.2012.664099.
3. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):780-90.
4. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Micro.* 2010;8(4):11.
5. Theuretzbacher U. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(5):433-8. doi: 10.1016/j.coph.2011.07.008.
6. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative

reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):87-102.

7. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010;340:c2046. doi: 10.1136/bmj.c2096.

8. McCallum N, Berger-Bächi B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(2-3):118-29. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.015.

9. Fangtham M, Baer AN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* arthritis in adults: case report and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41(4):604-10. doi(2011 Oct 28):10.1016/j.semarthrit.2011.06.018.

10. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 44 DE 17 de agosto de 2009.

11. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52(9):1138-43. doi: 10.1093/cid/cir120.

12. Campos GB, Souza SG, Lob OTN, Silva DC, Sousa DS, Oliveira PS, et al. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. *New Microbiol.* 2012;35(2):183-90.

13. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1866-71. doi(2011 Mar 16):10.1128/JCM.00376-11.

14. Teodoro CRS, Mattos CS, Cavalcante FS, Pereira EM, Santos KRNd. Characterization of MLSb resistance among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying different SCCmec types. *Microbiol Immunol.* 2012;56(9):647-50.

15. Aquino GV, Maluta RP, Avila FA. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococci* on a farm: staff can harbour MRS when animals do not. *Zoonoses Public Health.* 2012;59(1):1-3. doi(2011 May 25):10.1111/j.1863-2378.011.01413.x.

16. Rizek CF, Matte MH, Dropa M, Mamizuka EM, Almeida LM, Lincopan N, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(4):561-3. doi: 10.1089/fpd.2010.0706.

17. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2010.

18. Almeida LM, Almeida MZ, Mendonça CL, Mamizuka EM. Novel sequence types (STs) of *Staphylococcus aureus* isolates causing clinical and subclinical mastitis in flocks of sheep in the northeast of Brazil. *J Dairy Res.* 2011;78(3):373-8.

19. Martins A, Pereira VC, Cunha ML. Oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the university hospital of Botucatu Medical School in Brazil. *Chemotherapy.* 2010;56(2):112-9. doi(2010 Apr 20):10.1159/000313523.

20. Silva ECBFd, Samico TM, Cardoso RR, Rabelo MA, Bezerra Neto AM, Melo FLD, et al. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola



- de Pernambuco. Rev Esc Enferm USP. 2012;46(1):132-7.
21. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2006;12 (Suppl 1):3-8.
22. Cohen PR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. Int J Dermatol. 2007;46(1):1-11.
23. Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. Pediatr Infect Dis J. 2004;23(7):619-24.
24. Tenorio MT, Porfirio Z, Lopes AC, Cendon S. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections in a tertiary hospital in Maceio, Alagoas, Brazil. Braz J Infect Dis. 2010;14(2):175-9.
25. Oliveira LG, Luengo J, Caramori JC, Montelli AC, Cunha Mde L, Barretti P. Peritonitis in recent years: clinical findings and predictors of treatment response of 170 episodes at a single Brazilian center. Int Urol Nephrol. 2012;44(5):1529-37.
26. Mimica MJ, Berezin EN, Damaceno N, Carvalho RB. SCCmec Type IV, PVL-Negative, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis Patients from Brazil. Curr Microbiol. 2011;62(2):388-90. doi(2010 Jul 23):10.1007/s00284-010-9718-y.
27. Camargo ECG, Kiffer CRV, Pignatari ACC, Shimakura SE, Ribeiro Junior PJ, Monteiro AMV. Proposta sobre uso de dados de receitas de antimicrobianos retidas: a experiência EUREQA. Cad Saúde Pública. 2012;28(5):985-90.

---

**Endereço para correspondência:** Universidade Federal do Rio Grande do Norte Departamento de Biologia Celular e Genética/ Centro de Biociências. Laboratório de Biologia Molecular e Genômica - Campus Universitário, s/n – Lagoa Nova CEP: 59072-970 - Natal-RN – Brasil *E-mail:* fontesfl@hotmail.com

---

**5.4 Artigo: Design of Magnetic Polymeric Particles as a Stimulus-responsive System for Gastric Antimicrobial Therapy.**

Revista: AAPS PharmaSciTech

ISSN 0304-8853

v.17 p.1-11 Dez.2016

Doi: 10.1208/s12249-016-0673-1

Fator de Impacto 2015/2016: 1,954

Quali/CAPES 2013-2016: B1 MEDICINA II

(<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf>)

**Participação como coautora em artigo científico submetido. Outras produções não relacionadas à tese.**

## Research Article

**Design of Magnetic Polymeric Particles as a Stimulus-Responsive System for Gastric Antimicrobial Therapy**

Erica L. Silva-Freitas,<sup>1,2</sup> Thales R. F. Pontes,<sup>2</sup> Rafael P. Araújo-Neto,<sup>2</sup> Ítalo H. M. Damasceno,<sup>2</sup> Kátia L. Silva,<sup>2</sup> Juliana F. Carvalho,<sup>2</sup> Aldo C. Medeiros,<sup>3</sup> Rodolfo B. Silva,<sup>4</sup> Amanda K. A. Silva,<sup>5</sup> Marco A. Morales,<sup>4</sup> Eryvaldo S. T. Egito,<sup>2</sup> Ana L. Dantas,<sup>6</sup> and Artur S. Carriço<sup>4,7</sup>

Received 19 August 2016; accepted 14 November 2016

**Abstract.** The treatment of peptic ulcers induced by *H. pylori* remains challenging due to the deep mucous layer location of bacteria preventing antimicrobial drug access. The present work aimed to design and evaluate *in vitro* dual responsive (both pH and magnetic field-sensitive) polymeric magnetic particles loaded with amoxicillin as a smart drug carrier for deep mucous layer penetration and *in situ* drug release. Magnetite particles were produced by the co-precipitation method and subsequently coated with the Eudragit®S100 and amoxicillin by using the spray-drying technique. The physicochemical characterization of the obtained particles was carried out by optical and scanning electron microscopy, X-ray powder diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, nitrogen adsorption/desorption isotherms, and vibrating sample magnetometry. Additionally, drug release tests and antibacterial activity tests were evaluated *in vitro*. Microparticles presented  $17.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  in size and their final composition was  $4.3 \pm 1.5\%$  of amoxicillin,  $87.0 \pm 2.3\%$  of Eudragit, and  $9.0 \pm 0.3\%$  of magnetite. They were both pH and magnetic field responsive while presenting antimicrobial activity. On one side, magnetic field responsiveness of particles is expected to prompt them to reach bacterium niche in deep mucous layer by means of magnetic forces. On the other side, pH responsiveness is expected to enable drug release in the neutral pH of the deep mucous layer, preventing undesired delivery in the acidic gastric lumen. Smart microparticles were designed presenting both pH and magnetic field responsiveness as well as antimicrobial activity. These may be promising assets for peptic ulcer treatment.

**KEY WORDS:** antimicrobial activity; drug delivery; magnetite; smart microsystems; spray drier.

**INTRODUCTION**

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are characterized by gram-negative staining, spiral shape, and the presence of polar flagella. *H. pylori* are the only known organism able to colonize

the harsh gastric environment in humans, living near the gastric mucosa surface. Most of infected subjects are asymptomatic. Nevertheless, infection may induce significant human disease (1). Over the past two decades, research efforts have been focused on the investigation of effective treatment strategies for healing *H. pylori* infection. The main difficulty relates to the localization of the bacteria on gastric mucosa surface and the presence of a protective mucus layer (2).

Although *H. pylori* is susceptible to several antibiotics *in vitro*, *in vivo* eradication is quite challenging (3). Amoxicillin is considered a well-tolerated beta-lactam antibiotic displaying a broad-spectrum of action, which renders possible the therapy of many bacterial infections, including *H. pylori*. Amoxicillin acts during *H. pylori* proliferation phase by inhibiting the biosynthesis of the cell wall at pH 5 and above, being considered the first line drug along with metronidazole or clarithromycin, and omeprazole for peptic and duodenal ulcer therapy induced by *H. pylori* (4). *H. pylori* are able to penetrate into the layer of gastric mucus and attach to it *via* phospholipids and glycolipids present in the mucus gel (5), restricting the access of antimicrobial drugs to the infection

<sup>1</sup> Departamento de Análises de Produtos e Ambiente, Setor de Análise de Medicamentos, Laboratório Central Dr. Almino Fernandes, Natal, RN, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Física Teórica e Experimental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Avenida Senador Salgado Filho, 3000, 59078-970, Natal, RN, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, CNRS, Université Paris Diderot, Paris, France.

<sup>6</sup> Departamento de Física, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN, Brazil.

<sup>7</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: ascarrico@gmail.com)

site. Considering that amoxicillin presents a short gastric residence time and that it may be degraded in the gastric acid, blood levels are reduced, which render difficult *H. pylori* eradication (6). Therefore, the design of drug delivery systems endowed with extended residence time and able to attain the infection site under the mucus layer is required.

Mucus represents a very complex hydrogel constituted by carbohydrates, proteins, lipids, antibodies, salts, and bacteria as well as cellular debris. In humans, mucus confers protection from acid in the stomach. Its thickness is of about 180  $\mu\text{m}$  (ranging from 40 to 450  $\mu\text{m}$ ) (7). Mucus pH in the stomach varies from 1 to 2 at the lumen surface, while it is nearly neutral at the epithelium level. Therefore, there is a gradient from pH 1–2 to pH 7 through a mucus thickness of only 180  $\mu\text{m}$ . Such a gradient occurs as gastric mucus acts as a selective barrier limiting acid diffusion. Mucus-penetrating particles are expected to improve drug delivery by passing through the first part of mucus layer, which is loosely adherent and rapidly cleared, in the attempt to be retained in the next part, which is the firmly adherent one (8, 9).

In the last 20 years, several gastroretentive dosage forms have been investigated in order to extend gastric residence time (10, 11). They broadly fall into the following categories: sinking (high-density) systems (12), floating (low-density) systems (13), expandable systems (14), hydrogels (15), mucoadhesive systems (16), and magnetically actuated systems (17).

Magnetic drug targeting (MDT) may represent an efficient strategy to address drugs associated to a magnetic carrier to a specific target site located at the gastrointestinal tract *via* an external magnetic field (18). The magnetic field is expected to slow down the speed of travel of drug-loaded magnetic carrier, thereby, modulating its position, its residence time, and drug absorption extent in the stomach or intestines (19). Magnetic vectorization allows a large concentration drug delivery at the site of the infection. Therefore, even for a drug which may be stable in acid environment, a much better therapeutic efficiency may be achieved by means of the magnetic vectorization. A key point in the design of magnetic systems for local drug delivery is the strength of the magnetic force, such as to tailor how far deep can the external magnetic field reach, driving the drug to the site of action. Using suitable rare-earth magnets, the magnetic force (20) can be strong enough to overcome the peristaltic motion and the barrier for mucus layer penetration.

Maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) as well as magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) are suitable to be used in biomedical application due to their biological properties, high magnetic moment, superparamagnetic behavior, and controllable size parameters (21). Magnetite is one of the iron oxides that received the approval from the Food and Drug Administration (FDA) (22).

In addition to magnetic field responsiveness, nanoparticles may be endowed with pH responsiveness in the attempt to obtain a controlled drug release effect in the gastrointestinal tract. A number of different approaches have been proposed so far, including coating with pH-sensitive polymers (23). Eudragit<sup>®</sup>S100 is a methacrylic acid and methyl methacrylate ester copolymer. It represents the most widely employed pH-responsive polymer in order to achieve drug release at the ileo-colonic region due to its solubility at pH 7.0 (Rohm Pharma, Darmstadt, Germany).

The objectives of this study were to synthesize and characterize magnetite particles coated with Eudragit<sup>®</sup>S100 and amoxicillin in order to design a dual magnetic and pH-responsive system for deep mucous layer penetration and *in situ* antibiotic release. In an unprecedented strategy, the magnetic responsiveness of nanoparticles is expected to constrain the penetration of the system across the mucus while the Eudragit<sup>®</sup>S100 coating is expected to allow optimal drug delivery in the deep mucous (pH 7) niche of *H. pylori*.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Ferric chloride hexahydrate (Acros Organics, Brazil; P.A.); ferrous sulfate heptahydrate (Acros Organics, USA; 99%), sodium hydroxide (NaOH) (Vetec Chemical, Brazil; 99%), hydrochloric acid (HCl) (Vetec Chemical, Brazil; 37%), amoxicillin (Galena, Brazil; 97%), Eudragit<sup>®</sup>S100 (Rohm GmbH & c.og, German; methacrylic acid–methyl methacrylate copolymer 1:2), and phosphate buffer pH 7.4 were of pharmaceutical grade and used as received without further purification.

The culture medium for bacterium was purchased from HiMedia Laboratories, Brazil. The selected bacterial strain was the *Micrococcus luteus* ATCC 9341, which was obtained from the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ, Brazil). Nutrient agar was employed in order to enable bacterial strain growth and maintenance. Suspension cultures were prepared using nutrient broth. Antibacterial activity of magnetic system was assessed in Tripcase-Soy Agar (TSA).

### Synthesis of Magnetic Particles (MPs)

The MP synthesis was based on the co-precipitation method (24). MPs were prepared as follows. Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) at 0.1 M and ferrous sulfate heptahydrate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) at 0.05 M solutions in 0.1 M HCl were prepared. In brief, 9 mL of ferrous and ferric salt mixture was added drop-wise into 300 mL of NaOH solution at 1 M concentration under bath sonication (Unique USC 1800, 40 kHz, Brazil). Vigorous mechanical stirring at 960 rpm (IKA RW-20, Germany) was carried out for 30 min at room temperature (25°C). The color of the reagent mixture shifted from orange to black forming a dark precipitate. After decantation, the supernatant was discarded and the precipitate was washed three times to remove excess of Fe and Na ions in the suspension. Finally, the precipitate obtained after washing was dried in the oven for further investigation.

### Production of Magnetic Polymeric Particles (With and Without Amoxicillin)

Polymeric magnetic microparticles with amoxicillin (hereafter labeled as MagAmox) were produced by the spray-drying technique (25). To obtain the MagAmox, 750 mg of Eudragit<sup>®</sup>S100 was dispersed in a NaOH solution 0.4 N (90 mL) and 300 mg of amoxicillin was dispersed in distilled water (90 mL). The dispersions were mixed under mechanic stirring at 960 rpm and 7.5 mL of the magnetite suspension (40 mg/mL), previously subjected to ultrasound

### Smart Magnetic System for Antimicrobial Therapy

bath for 5 min (Unique USC 1800, 40 kHz, Brazil), was added. The blank sample (MagEud), containing only Eudragit®S100 and MP, was prepared. The preparation was thus maintained in moderate agitation and fed into the spray-dryer (Mini Spray-dryer Büchi B191, Germany). The device was equipped with a two-fluid nozzle, providing particles from 2 to 25  $\mu\text{m}$ . The residence time of the drying air within the spray chamber was of about 1.5 s. The flow rate was 1.2 mL/min (inlet temperature of 120°C) using a peristaltic pump. Once recovered, the dried powders were weighed and, then, they were stored at room temperature in a hermetically closed glass vessel.

### Characterization of the Obtained Particles

#### *X-ray Diffraction (XRD)*

X-ray diffractometer (Shimadzu, XRD-6000, Japan) was used to analyze the structural properties of MPs. This measurement was performed to characterize the nanocrystalline structure and identify the iron oxide specie. Representative powder sample was analyzed in the range  $20^\circ < 2\theta < 70^\circ$  by using the  $\text{CuK}\alpha$  radiation with wavelength of 1.54056 Å.

#### *Size and Morphology Studies*

MP and MagAmox were subjected to particle size analysis under optical microscopy (Leica microscopic). The samples were added to glass slides and the size of 1500 microparticles of each condition were measured in accordance to Ferret's method using a stage micrometer scale for calibration (26). Size analysis as well as morphology investigation were also checked using a scanning electron microscope (SEM, XL 30 ESEM, Philips, The Netherlands).

#### *Surface Area and Porosity Evaluation*

Isotherms of nitrogen adsorption-desorption (NSD) at 77 K were recorded on an ASAP 2420/Micromeritics Instrument. Standard Brunauer-Emmett-Teller (BET) procedure was employed in order to obtain the specific surface area ( $S_{\text{BET}}$ ) of the analyzed powder samples. Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method was used for calculating the distribution of pore size (27).

#### *Vibrating Sample Magnetometry (VSM) Evaluation*

Magnetization measurements of the MP and MagAmox samples in powder form were carried out by means of a homemade vibrating sample magnetometer after a calibration step using a nickel sample. Measurements of magnetization as a function of the applied field were obtained at room temperature using 1.17 T maximum applied field.

#### *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*

The sample spectra of FTIR transmission were obtained with a Perkin-Elmer spectrometer (Spectrum 65 FTIR Spectrometer, Perkin-Elmer, Buckinghamshire, U.K.), operating with spectrum v3.02 software. Pellets for FTIR analysis were prepared by mixing the samples with spectroscopic

grade KBr powder, 2 mg of each sample were mixed with 200 mg of KBr thoroughly mixed and pressed to obtain a pellet. The FTIR spectra were obtained in the transmission mode using 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  range at a 1  $\text{cm}^{-1}$  resolution.

#### *Amoxicillin and Magnetite Content Assay*

For this experiment, 250 mg of MagAmox was added to 100 ml of ethanol to dissolve the polymeric matrix (Eudragit®S100) and centrifugation was performed to separate magnetite microparticles. The amoxicillin content was determined with an UV/vis spectrophotometer (Liochrom Libra S32, UK), and the measurements were carried out at 233 nm wavelength. The analysis was performed in triplicate. The dissolution of the precipitate was carried out in a 0.1 M HCl solution previously to the determination of magnetite content. Then, the iron ions were complexed with sulfosalicylic acid. Absorbance was, then, measured at 420 nm wavelength (28). For validation, a calibration curve for amoxicillin or iron was generated.

#### *Drug Release Assay*

Amoxicillin release from the MagAmox was investigated via a dissolution test according to USP XXIV (United States Pharmacopeia) by using a dedicated type II paddle dissolution device (model 299–6, Ethik Technologies). Paddle speed was set at 100 rpm and the tests were carried out in triplicate in 500 ml of dissolution medium kept at  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The investigation of drug release from MagAmox sample was conducted at pH 1.2 in a 0.1 N HCl solution during 2 h as well as at pH 7.4 in buffer media (phosphate buffer) for another 2 h.

Phosphate buffer was prepared according to United States Pharmacopeia (USP 27, 2004) by placing 250 mL of the 0.2 M monobasic potassium phosphate solution in a 1000 mL volumetric flask. In addition, 195.5 ml of 0.2 M NaOH solution was added and the volume was adjusted to 1000 mL using purified water (if needed, pH was adjusted with 2 N NaOH or 2 N HCl).

Dissolution media were prepared immediately before utilization with deionized water, which was de-aerated prior to use. Dissolution medium aliquots (2 ml) were withdrawn at predetermined time points and were filtered by means of Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  filter. Drug released was, then, assessed at 233 nm using UV/vis spectrophotometry. For validation, a calibration curve for amoxicillin was generated.

#### *Antibacterial Activity Assay*

An adapted agar diffusion protocol was performed for the qualitative antimicrobial activity screening *in vitro* (29), with *M. luteus* being used as the assay microorganism (30, 31). The sterilized medium was melted at 100°C and after cooling to 46°C, it was poured onto plates, (18 mL, 90 mm) and left to solidify. *M. luteus* were obtained in frozen form from the Fiocruz/RJ, Brazil. Bacteria were thawed for 20 min before being plated on an agar plate. The bacterial cultures were kept in the nutrient agar at 35°C for 24 h. After that, bacterial suspensions were prepared by taking 3–5 well separated colonies from agar nutrient plates into 3 ml of saline, and the

suspension turbidity was set to about 0.5 McFarland standard. The suspension sample was inoculated into TSA plates and distributed homogeneously. Plates were allowed to rest for 10 min to enable the culture to be absorbed. In order to investigate the antimicrobial activity of MagAmox, 8 mm wells were carefully punched into the TSA plates. Using a micropipette, 30  $\mu$ L of MagAmox suspensions were added, at different concentrations (50, 100, and 200  $\mu$ g/mL), on the solid culture medium to which the microbial inoculum was previously seeded. The inoculated plates were incubated for 24 h at 35°C. The diameter (in mm) of the growth inhibition zones was measured to assess antimicrobial activity.

#### Statistics

Measurements were carried out in triplicate with error bars representing standard deviation from the mean. Unpaired *t* test with Welch's correction was performed using the Prism 3.0 version of GraphPad software (USA). A minimum of 95% confidence level was considered significant. \*, \*\*, and \*\*\* indicates  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively.

## RESULTS

### X-ray Diffraction Evaluation

The XRD pattern of the MP displayed peaks that could be attributed either to maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) or to magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). These iron oxide compounds consist of ferrites presenting inverse spinel structure. X-ray diffraction is not an appropriate tool to distinguish these iron oxides due to their structural similarities (32). XRD peaks are labeled with magnetite indexes in Fig. 1. The diffractogram consists of wide peaks relative to an elastic coherence volume of 6.5 nm. The particles consist of nano-crystallites that aggregate forming microparticles (see in the next section) displaying superparamagnetic properties, which are suitable for biomedical use.

### Size and Morphology Studies

As shown in Fig. 2, MP and MagAmox displayed a multimodal distribution with a right tail. MP presented a

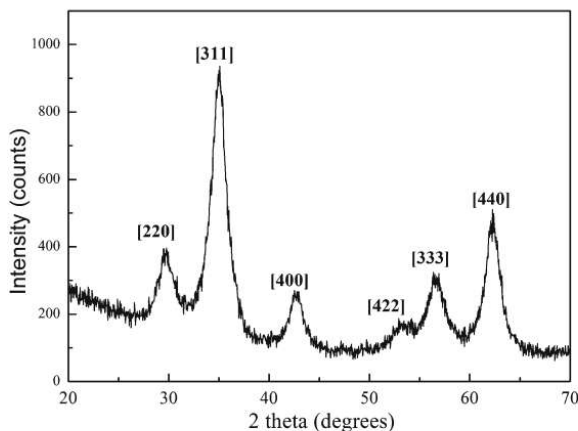


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of the MP

mean diameter of  $11.8 \pm 0.7$   $\mu$ m. Data showed that 90, 50, and 10% of the sample was at a size inferior to  $20.4 \pm 1.4$ ,  $10.0 \pm 0.7$ , and  $6.0 \pm 0.6$   $\mu$ m, respectively. On the other hand, the MagAmox mean diameter was of  $17.2 \pm 0.4$   $\mu$ m with 90, 50, and 10% of the sample at a size smaller than  $27.6 \pm 0.8$ ,  $16.4 \pm 0.5$ , and  $9.2 \pm 0.5$   $\mu$ m, respectively. Particle size increase and changes in morphology, as attested by scanning electron microscopy pictures in Fig. 3, converge to indicate that MPs were coated by the Eudragit®S100. They appeared to be concave and shriveled in a manner that is typically related to the particles derived from macromolecules after the spray-drying process (33).

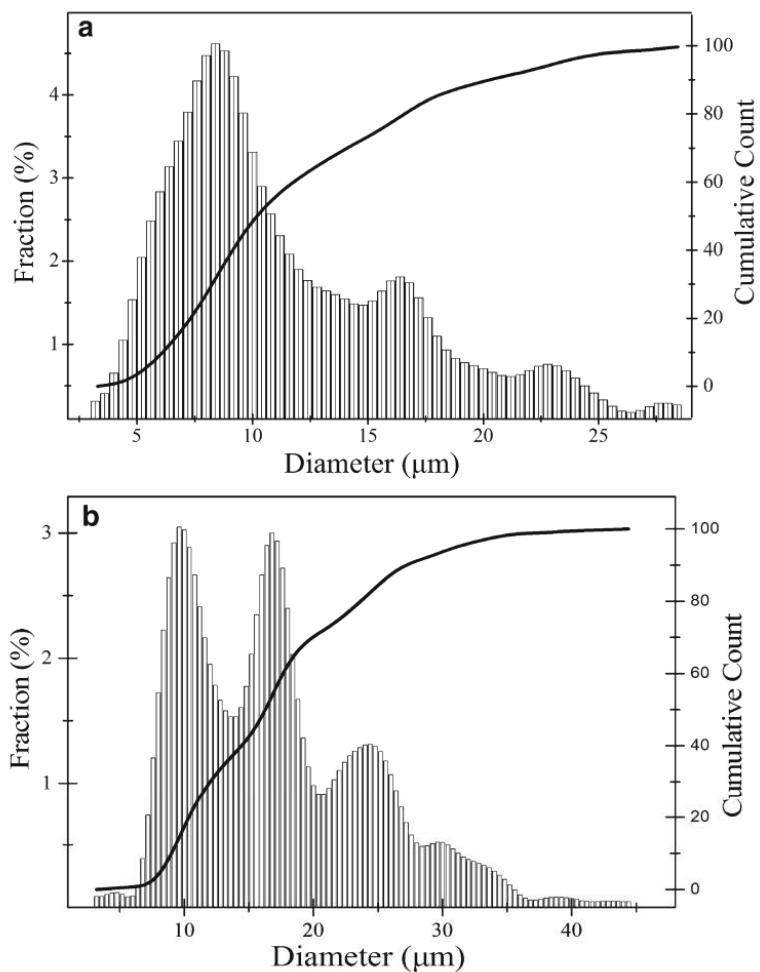
### Surface Area and Porosity Evaluation

Examination of the samples by NSD resulted in type IV isotherms for MP and type III isotherms for MagAmox (Fig. 4). From these curves, the  $S_{BET}$  for MP and MagAmox were determined and the values obtained were equal to 252 and 202 m<sup>2</sup>/g, respectively. According to the BJH method, the maximum diameters for the MP and MagAmox pores were 5 and 3 nm, respectively. Figure 5 shows that the pore size distribution for MagAmox is narrower when compared with MP particles. From a molecular modeling, it was obtained that the amoxicillin molecule size was about 1.1 nm (34). The smaller pore diameter in MagAmox may be related to the chemisorption of amoxicillin on the pores of the MP core. Indeed, it will reduce the pore size in about 2 nm giving a final diameter of about 3 nm. Pore diameters between 2 and 50 nm are called mesopores according to the IUPAC classification. The potential use of mesoporous materials to enhance the permeability of large hydrophilic drugs has been investigated (35). Furthermore, mesoporous materials offer the possibility to increment the dissolution of poorly soluble drugs *via* chemical interactions with the surface of the pore (36). When pore size is close to the drug molecule size, the formation of crystalline material is prevented by its confinement within the pore, thus maintaining the drug molecule in its noncrystalline, amorphous form (37).

### Vibrating Sample Magnetometry Evaluation

VSM results showed a reversible hysteresis behavior and a zero coercivity attesting the superparamagnetic nature of the MP (Fig. 6), meaning that these particles do not retain any magnetism when the magnetic field is removed. The saturation magnetization ( $M_s$ ) for the MagAmox formulation was found to be 4 emu/g. This value is inferior to the MP saturation magnetization ( $M_s = 44$  emu/g), as expected, considering that there is no contribution to the magnetic moment from the drug and the polymer. The magnetization measurement suggests that the MagAmox has approximately 8% of the MP in weight. The magnetite magnetization curve has been fitted using the particle size distribution shown in the upper left corner inset. It corresponds to nanoparticles with average diameter of 6.15 nm and the most probable value of 5.72 nm. Note that with the dipolar interaction (gray line curve) the initial susceptibility is larger than the one without interactions. With the inclusion of the dipolar interaction between the nanoparticles a nice fitting of the measured magnetization curve was achieved.

### Smart Magnetic System for Antimicrobial Therapy

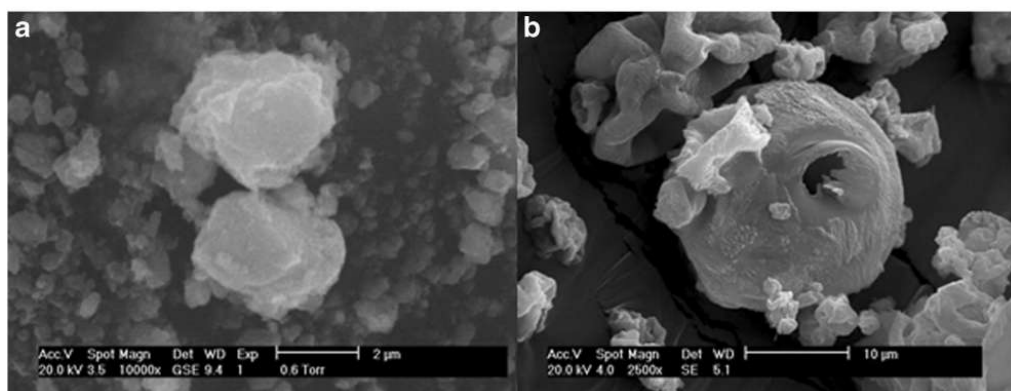


**Fig. 2.** Size distribution of **a** magnetite particles and **b** MagAmox

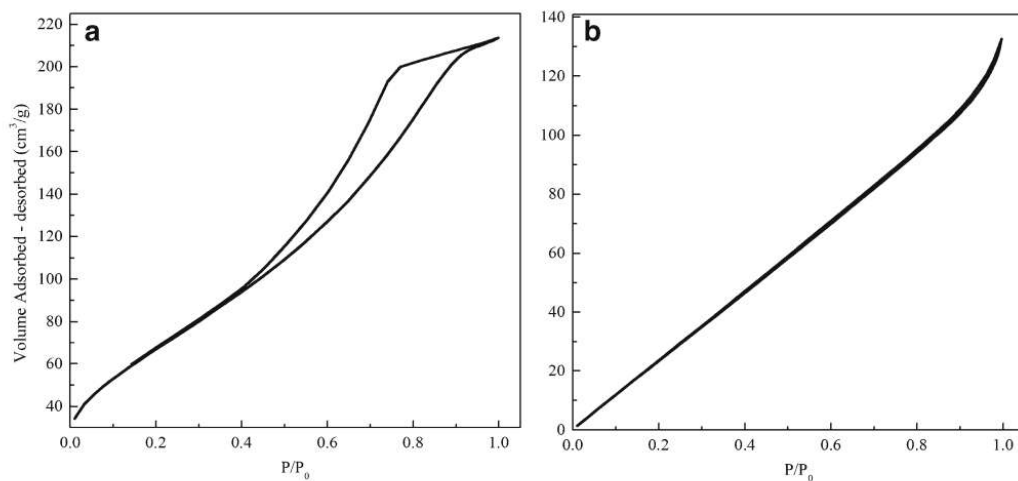
### Fourier Transform Infrared Spectroscopy

The aim of the FTIR analysis was to confirm the adsorption of amoxicillin in MagAmox. These analyses were performed for individual components (MP, amoxicillin

and Eudragit<sup>®</sup>S100); MagAmox; and the solution of MF and amoxicillin (sMP/amoxicillin). The sMP/amoxicillin sample was prepared by mixing MP and amoxicillin in an alkaline solution at room temperature. The drug-loaded MPs were separated from the untrapped drug using a

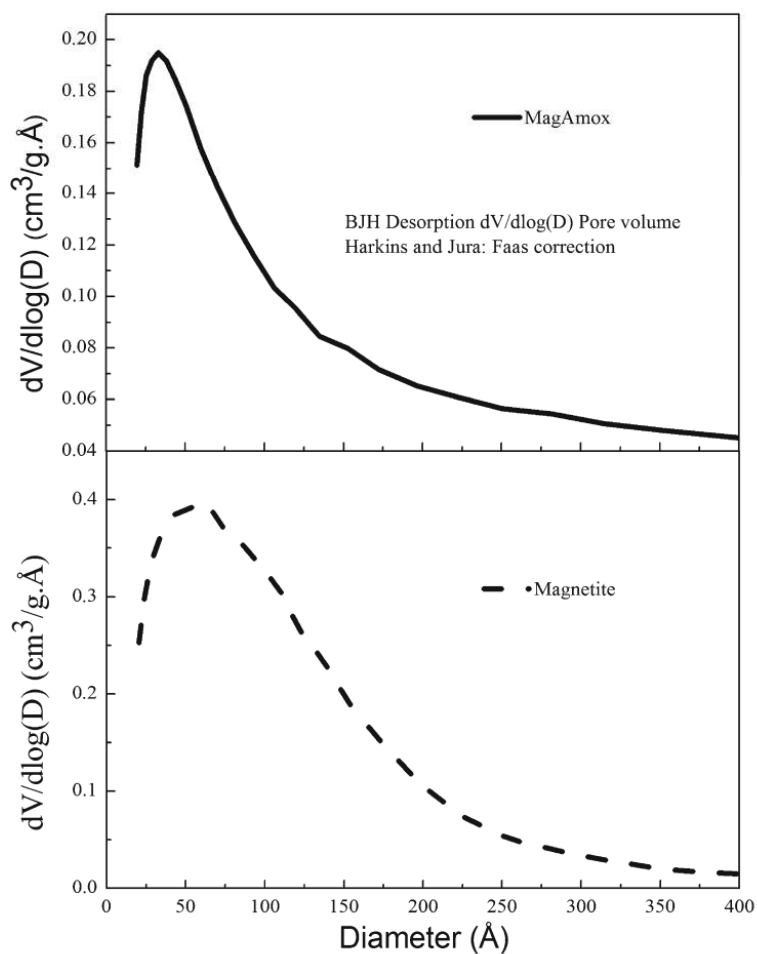


**Fig. 3.** Scanning electron microscopy images of **a** MP and **b** MagAmox



**Fig. 4.** Nitrogen adsorption-desorption isotherm. **a** MP and **b** MagAmox

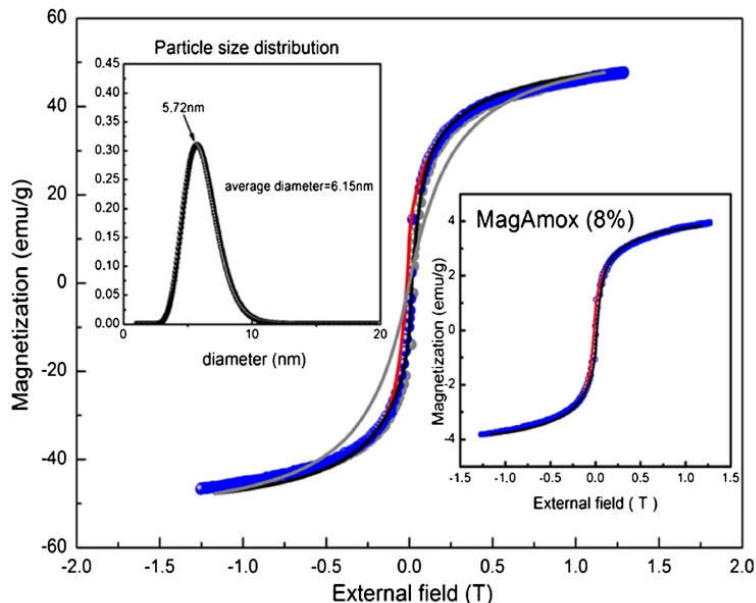
et. The corresponding FTIR spectra are shown in 7a, b. For amoxicillin, major peaks were observed at 3170 and 3466 cm<sup>-1</sup> (these peaks are related to amide N-H and phenol OH stretching), 3043 cm<sup>-1</sup> (C-H asymmetric



**Fig. 5.** Size distribution of the pores in MagAmox and magnetite aggregates (MP) obtained from the NSD isotherm



### Smart Magnetic System for Antimicrobial Therapy



**Fig. 6.** Magnetization curves for MP and MagAmox samples. *Black and blue open circles* are related to the experimental data. The *gray curve* is the fitting to a Langevin function related to the size distribution in the inset. The *black curve* is the fit using a model that considers interaction between the nanoparticles. The *inset* shows the size distribution obtained from the model with magnetic interactions

stretch),  $1777\text{ cm}^{-1}$  (C=O carbonyl stretching monomer),  $1618\text{ cm}^{-1}$  (C-C stretching ring 2 and N19H bending),  $1516\text{ cm}^{-1}$  (benzene ring C=C stretching),  $1490\text{ cm}^{-1}$  (N-H bend and C-N stretch combination band), and  $848\text{ cm}^{-1}$  (C-H bending ring 2, out of the plane) (38, 39). Characteristic peaks of amoxicillin (at  $3466$ ,  $3043$ ,  $1618$ , and  $848\text{ cm}^{-1}$ ) were also presented in the FTIR spectrum of MagAmox. This indicates that amoxicillin was successfully entrapped in the MagAmox. It should be highlighted that the C=O stretch band corresponding to the carboxyl group, which was presented at  $1777\text{ cm}^{-1}$  in the amoxicillin spectrum, was absent in the sMP/amoxicillin and MagAmox spectra. It is known that this band shifts to lower wavelength numbers when carbonyl groups interact with hydroxides present in carboxyl groups or on the surface of iron oxides particles. In fact, Eudragit®S100 also exhibits a hydroxide and carbonyl groups in each repeating unit of its backbone, therefore, being able to interact with amoxicillin. In the sample sMP/amoxicillin, the peaks at  $2853$  and  $2922\text{ cm}^{-1}$  from the amoxicillin symmetric and asymmetric CH<sub>2</sub> stretching modes, respectively. Furthermore, in Fig. 7b, the phenol (OH) stretch in pure amoxicillin shifted to a band at  $3453\text{ cm}^{-1}$  in sMP/amoxicillin suggests amoxicillin chemisorption onto the surface of iron oxide nanoparticles. These results explain the reduced pore diameter observed in the MagAmox sample in the NSD experiments and, therefore, are evidencing the chemisorption of COOH functional group from the amoxicillin onto the MP, as a carboxylate (40). Although some amoxicillin is chemisorbed onto the pores of the MP particles of MagAmox, the remaining content may be dispersed in the Eudragit®S100 polymer network.

#### Amoxicillin and Magnetite Content Assay

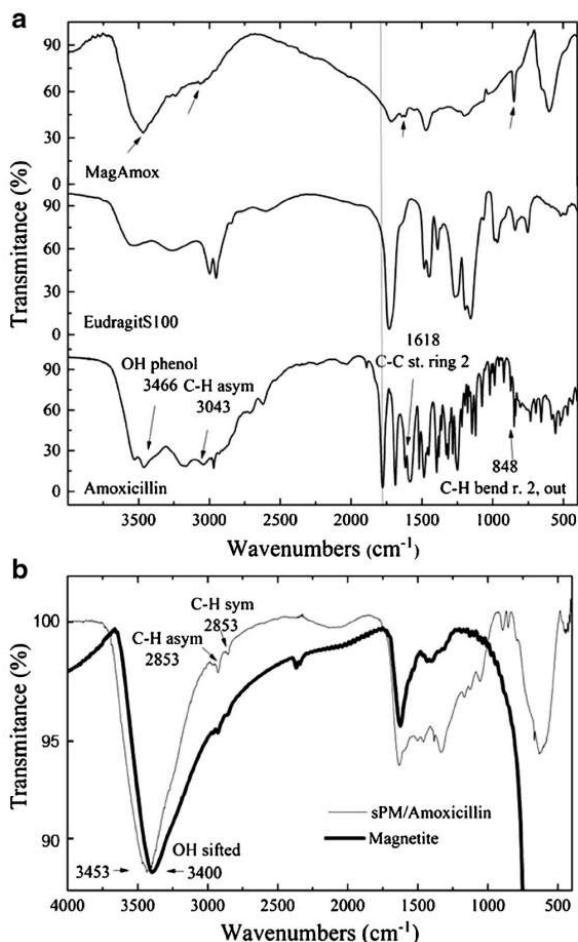
Using the sulfosalicylic acid method, the iron content in MagAmox was 6.5%. After converting this value to magnetite, the mass percentage in MagAmox was of 9%, in good agreement with the MP fraction obtained from the magnetization measurements (8%). The actual magnetite content in MagAmox is smaller than the nominal composition of the reagents added to the spray drier (22%). This is a known feature of the spray-drying technique as a result of the distinct physical properties of the suspension components, which impacts the final yield. According to this study, the MagAmox final composition was  $4.3 \pm 1.5\%$  of amoxicillin,  $87.0 \pm 2.3\%$  of Eudragit, and  $9.0 \pm 0.3\%$  of magnetite.

#### Drug Release Assay

The release of amoxicillin from the MagAmox was evaluated at pH 1.2 in a chloride acid solution and at pH 7.4 in a phosphate buffer. Data are shown in Fig. 8. The release rates from the microspheres at pH 1.2 were significantly reduced when compared to the ones in the phosphate buffer. At pH 1.2, polymer coating markedly prevented drug release. The small drug amount released at acidic pH may be related to amoxicillin located near to the MagAmox particle surface. Alternatively, the entire drug was released at pH 7.4 in a prompt manner, as the polymer solubilized.

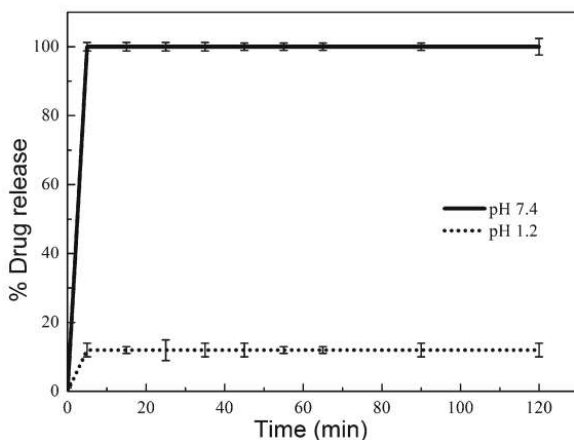
#### Antimicrobial Tests of MagAmox

It was noticed that MagEud (at a concentration of  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) exhibited an antibacterial activity (inhibition

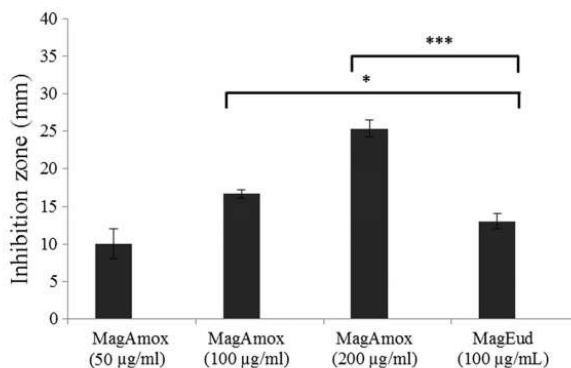


**Fig. 7.** FTIR spectra of **a** MagAmox, Eudragit<sup>®</sup>S100, and amoxicillin, vertical dashed line is at  $1777\text{ cm}^{-1}$  **b** sPM/amoxicillin and MP

zone of  $13.0 \pm 1.0$  mm). Bactericidal activity of delivery systems partially relates to their concentration, size, and stability in the growth medium (41). Figure 9 indicates the



**Fig. 8.** Drug release of amoxicillin from MagAmox at different pH values



**Fig. 9.** Inhibition zones of MagAmox and MagEud. Different concentrations of MagAmox were used: 50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$

zones of inhibition produced by different concentrations of MagAmox (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ). The inhibition zones were found to be  $10.0 \pm 2.0$ ,  $16.7 \pm 0.6$ , and  $25.3 \pm 1.6$  mm, respectively. Inhibition was enhanced as concentration increased and it was statistically different from MagEud control.

## DISCUSSION

In this work, mesoporous polymeric amoxicillin-loaded microparticles with a magnetic core were designed. The magnetite particles were produced by the co-precipitation method and subsequently coated with the Eudragit<sup>®</sup>S100 and amoxicillin by spray-drying. The produced microparticles were characterized in terms of size, composition, magnetic properties, drug release, and antibacterial activity. Characterization data indicated that the obtained microparticles presented a mean diameter of  $17.2 \pm 0.4\ \mu\text{m}$  and their final composition was  $4.3 \pm 1.5\%$  of amoxicillin,  $87.0 \pm 2.3\%$  of Eudragit, and  $9.0 \pm 0.3\%$  of magnetite.

Eudragit coating successfully endowed the particles with pH responsiveness. According to the drug release assay, there was a minimal amoxicillin release at gastric pH (pH 1.2) while total drug release was rapidly obtained at pH 7.4. It is often observed that controlled release formulations present an initial large drug bolus release immediately after placed in the release medium previously to reaching a stable profile rate. This phenomenon is known as burst release. This feature can be viewed from two perspectives: it is often regarded as a negative affect if long-term controlled release is desired, or, in certain cases, high dose rapid release may be of interest. For antibiotics, drug levels below the minimum inhibitory concentration (MIC) may induce bacterial resistance and enhance infectious complications. Concerning experiments at pH 1.2, the rate of released drug was significantly reduced and the released drug amount may be related to amoxicillin located near to the MagAmox particle surface. This feature is interesting when it is necessary to attain drug protection against low pH values and drug release only at higher pH values. For example, for the therapy of infection induced by *H. pylori*, antibiotic protection from the acid degradation in the stomach is of importance (42). Eudragit prevented drug

### Smart Magnetic System for Antimicrobial Therapy

release at acidic pH, protecting the drug, while disintegrating at and above neutral pH to enable the drug to act locally at a bactericidal concentration. Such pH responsiveness profile may be a main asset for deep mucus layer antimicrobial delivery in the treatment of peptic ulcers, considering that it may enable optimal drug delivery at the niche of *H. pylori* with neutral pH. In fact, this is a very innovative approach as Eudragit®S100 is most often used for colon release (43). To our knowledge, it is the first time that Eudragit coating is designed and tested *in vitro* for potential mucus-penetrating particles with a view to deep mucus targeted drug delivery.

In addition to the pH responsiveness, the microparticles produced herein are magnetic responsive, as attested by their magnetization curve. Such magnetic responsiveness is the basis of the mucus-penetrating potential of the designed microparticles. One important question to address is how deep an external magnetic field can act in the stomach in order to address the microparticles to the site of interest. This issue is a quite difficult to determine. For optimal results, there should be a magnetic clinical apparatus placed near the infection site (close to the abdomen surface) so that the magnetic force should be larger than the viscosity force.

Mucus constitutes a viscous, sticky, and elastic layer that traps and eliminates molecules and particles, precluding effective drug therapies (8, 9). Mucoadhesive systems (16, 44, 45) have been widely investigated for gastric drug delivery. However, mucoadhesive system transit time depends on the physiological turnover time of mucus, which is of some hours. Additionally, mucoadhesive systems are not able to go through the mucus layer (8, 9). A current strategy to obtain mucus-penetrating particles is their coating with muco-inert low M.W. (2 kDa) polyethylene glycol polymer. Such particles were found to infiltrate human mucus with diffusivities that are only fourfold inferior to the ones obtained when comparing to data in pure water (46).

To the best of our knowledge, magnetic microparticles are herein, for the first time, suggested and tested *in vitro* as potential mucus-penetrating drug delivery systems for controlled drug delivery (Fig. 10). In this regard, it is important to mention that water availability in mucus layer for Eudragit®S100 dissolution is a key point. Dissolution

kinetics is expected to be slower in mucus, which does not mean that it will be prevented. Additionally, Eudragit®S100 dissolution is not supposed to be total in order to achieve drug release. As dissolution will start, the formation of pores in Eudragit®S100 capsules will take place enabling drug release onset through them. It is also important to mention that nanoparticles composed of Eudragit®S100 have already been proposed mucosal drug delivery (47). However, this approach differed from ours concerning the intended administration route (vaginal administration instead of oral administration in our case). Although *in vivo* experiments should still be performed, our study represents the first step towards a deep mucus targeted antimicrobial delivery in the treatment of peptic ulcers.

### CONCLUSION

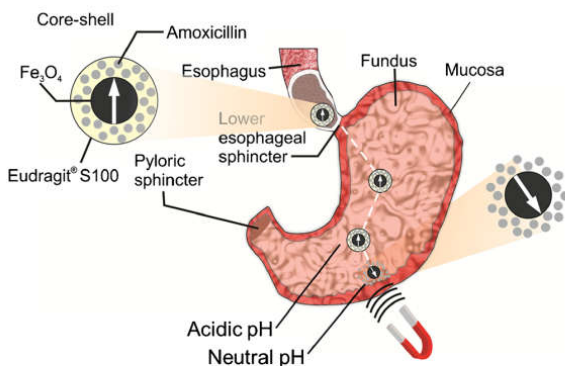
In this work, the preparation of the mesoporous polymer-coated amoxicillin microparticles, presenting a mean diameter of 17.2  $\mu\text{m}$ , with superparamagnetic magnetite core was demonstrated. According to the drug release assay, a significant decrease on drug release at gastric (pH 1.2) compared to the higher pH was found. Therefore, it was shown that Eudragit coating successfully prevented the drug dissolution at low pH. Regarding the oral administration of magnetic systems, this is an interesting feature, since the drug release takes place in response to the pH of the media enabling selective delivery of the drug in the deep mucous niche of *H. pylori*. Indeed, the antimicrobial activity of the system was attested for a model microorganism (*M. luteus*). Besides the antimicrobial properties and pH responsiveness, the designed particles were also magnetic field-responsive, as attested by magnetization curves. Magnetic field responsiveness is expected to constrain the penetration of the system across the mucus layer to reach bacterium niche by means of magnetic field gradient created by an external permanent magnet. Although *in vivo* tests are yet to be performed, the *in vitro* results obtained herein indicate that the unique features of the designed particles may hold great promises for deep mucus layer antimicrobial delivery in the treatment of peptic ulcers.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by the Brazilian research agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are grateful to the Núcleo de Petróleo de Gás Natural (NEPGN, UFRN) for the SEM images, to the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ, Brazil) for the bacterial strain and to the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for the NSD and BET/BJH analysis and to the Laboratório Central Dr. Almino Fernandes (LACEN-RN) for the microbiological analysis.

### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.



**Fig. 10.** Schematic representation of the pH and magnetic responsiveness of MagAmox for gastric antimicrobial therapy

## REFERENCES

- Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306–23. 385.
- Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect*. 2000;2(1):55–60.
- Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(11):699–709.
- Archimandritis A, Avgerinos A, Nakos A, Viazis N, Skandalis N, Tzivras M. Open-label study of a regimen consisting of 1 week of lansoprazole, clarithromycin, and amoxicillin followed by 3 weeks of lansoprazole in healing peptic ulcer and eradicating *Helicobacter pylori*. *Curr Ther Res*. 2000;61(7):406–13.
- Genta RM, Huberman RM, Graham DY. The gastric cardia in *Helicobacter pylori* infection. *Hum Pathol*. 1994;25(9):915–9.
- Rajinikanth PS, Balasubramaniam J, Mishra B. Development and evaluation of a novel floating in situ gelling system of amoxicillin for eradication of *Helicobacter pylori*. *Int J Pharm*. 2007;335(1–2):114–22.
- Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(2):75–85.
- Plapied L, Duhem N, des Rieux A, Pr eat V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2011;16(3):228–37.
- Lai SK, Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(2):158–71.
- Jagdale SC, Agavekar AJ, Pandya SV, Kuchekar BS, Chabukswar AR. Formulation and evaluation of gastroretentive drug delivery system of propranolol hydrochloride. *AAPS Pharm Sci Technol*. 2009;10(3):1071–9.
- Nama M, Gonugunta CSR, Veerareddy PR. Formulation and evaluation of gastroretentive dosage forms of clarithromycin. *AAPS Pharm Sci Technol*. 2008;9(1):231–7.
- Hejazi R, Amiji M. Stomach-specific anti-H. pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *Int J Pharm*. 2002;235(14112):87–94.
- Oth M, Franz M, Timmermans J, M oes A. The bilayer floating capsule: a stomach-directed drug delivery system for misoprostol. *Pharm Res*. 1992;9(3):298–302.
- Klausner EA, Lavy E, Friedman M, Hoffman A. Expandable gastroretentive dosage forms. *J Control Release*. 2003;90(2):143–62.
- Chen J, Blevins WE, Park H, Park K. Gastric retention properties of superporous hydrogel composites. *J Control Release*. 2000;64(1–3):39–51.
- Higo S, Ori K, Takeuchi H, Yamamoto H, Hino T, Kawashima Y. A novel evaluation method of gastric mucoadhesive property in vitro and the mucoadhesive mechanism of tetracycline-sucralfate acidic complex for eradication of *Helicobacter pylori*. *Pharm Res*. 2004;21(3):413–9.
- Carriço AS, Silva ÉL, Medeiros AC, Egito EST, Carvalho JF, Pontes TRF. Sistema magnético para vetoriza o de antibióticos para tratamento de infec es por *Helicobacter pylori*. *Brasil 2012* 26/06/2012.
- Silva AKA, Silva-Freitas É, Carvalho J, Pontes TF, Araújo-Neto R, Silva KL, *et al.* Magnetic particles in biotechnology. Drug targeting to tissue engineering. Rijeka. InTeck; 2012.
- Saravanan M, Balaji A, Kavitha P, Kingsley J. Controlled delivery of ranitidine in the stomach using magnetic field. *W Indian Med J*. 2009;58:87–91.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36:R167–81.
- Silva AKA, Silva ÉL, Carvalho JF, Pontes TRF, Araújo-Neto RP, Carriço AS, *et al.* Drug targeting and other recent applications of magnetic carriers in therapeutics. *Key Eng Mater*. 2010;441:357–78.
- Kaminski MD, Rosengart AJ. Detoxification of blood using injectable magnetic nanospheres: a conceptual technology description. *J Magn Magn Mater*. 2005;293(1):398–435 403.
- Paipa C, Mateo M, Godoy I, Poblete E, Toral MI, Vargas T. Comparative study of alternative methods for the simultaneous determination of Fe<sup>+3</sup> and Fe<sup>+2</sup> in leaching solutions and in acid mine drainages. *Miner Eng*. 2005;18(11):1116–9.
- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn*. 1981:1247–8.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voillea A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int*. 2007;40(9):1107–21.
- Pons M-N, Vivier H, Delcour V, Authelin J-R, Paill eres-Hubert L. Morphological analysis of pharmaceutical powders. *Powder Technol*. 2002;128(2–3):276–86.
- Barrett E, Joyner L, Halenda P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J Am Chem Soc*. 1951;73:373–80.
- Silva-Freitas  E, Carvalho J, Pontes TF, Araújo-Neto R, Carriço A, Egito E. Magnetite content evaluation on magnetic drug delivery systems by spectrophotometry: a technical note. *AAPS Pharm Sci Technol*. 2011;12(2):521–4.
- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493–6.
- Berry V, Jennings K, Woodnutt G. Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(8):1859–61.
- de Cassia Bergamaschi C, Motta RH, Franco GC, Cogo K, Montan MF, Ambrosano GM, *et al.* Effect of sodium diclofenac on the bioavailability of amoxicillin. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(5):417–22.
- Morales MA, Mascarenhas AJS, Gomes AMS, Leite CAP, Andrade HMC, de Castilho CMC, *et al.* Synthesis and characterization of magnetic mesoporous particles. *J Colloid Interface Sci*. 2010;342(2):269–77.
- Z-q F, Wang L-j, Li D, Adhikari B. Effects of partial gelatinization on structure and thermal properties of corn starch after spray drying. *Carbohydr Polym*. 2012;88(4):1319–25.
- Vallet-Regi M, Doadrio JC, Doadrio AL, Izquierdo-Barba I, Pérez-Pariente J. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics*. 2004;172(1–4):435–9.
- Ahuja G, Pathak K. Porous carriers for controlled/modulated drug delivery. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(6):599–607.
- Zhang Y, Wang J, Bai X, Jiang T, Zhang Q, Wang S. Mesoporous silica nanoparticles for increasing the oral bioavailability and permeation of poorly water soluble drugs. *Mol Pharm*. 2012;9(3):505–13.
- Salonen J, Laitinen L, Kaukonen AM, Tuura J, Bj orkqvist M, Heikkilä T, *et al.* Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *J Control Release*. 2005;108(2–3):362–74.
- Bebu A, Szab  L, Leopold N, Berindean C, David L. IR, Raman, SERS and DFT study of amoxicillin. *J Mol Struct*. 2011;993(1–3):52–6.
- Castillo-Ortega MM, N ajera-Luna A, Rodríguez-Félix DE, Encinas JC, Rodríguez-Félix F, Romero J, *et al.* Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2011;31(8):1772–8.
- Zhang L, He R, Gu H-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2006;253(5):2611–7.
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:6003–9.
- Erah PO, Goddard AF, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39(1):5–12.
- Khan MZI, Prebeg  Z, Kurjakovi  N. A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation of drug release using Eudragit  L100-55 and Eudragit  S100 combinations. *J Control Release*. 1999;58(2):215–22.

**Smart Magnetic System for Antimicrobial Therapy**

44. Karn PR, Vanić Z, Pepić I, Škalko-Basnet N. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(4):482–8.
45. Alam N, Beg S, Rizwan M, Ahmad A, Ahmad FJ, Ali A, *et al.* Mucoadhesive elementary osmotic pump tablets of trimetazidine for controlled drug delivery and reduced variability in oral bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;41(4):692–702.
46. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R, *et al.* Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1482–7. 500.
47. Yoo JW, Giri N, Lee CH. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *Int J Pharm.* 2011;403:262–7.

## 6 - COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

### 6.1 – Projeto original

Os resultados obtidos nos bioensaios estão listados na Tabela 4. É possível observar que a amostra de magnetita padrão, nas diferentes concentrações, teve crescimento superior a 100.000 unidades formadoras de colônias, tal qual o controle de crescimento. Podemos inferir assim, que o crescimento da bactéria testada não sofre interferência da magnetita sem ativação magnética, nas concentrações testadas (Figuras 1A, 1B e 1C).

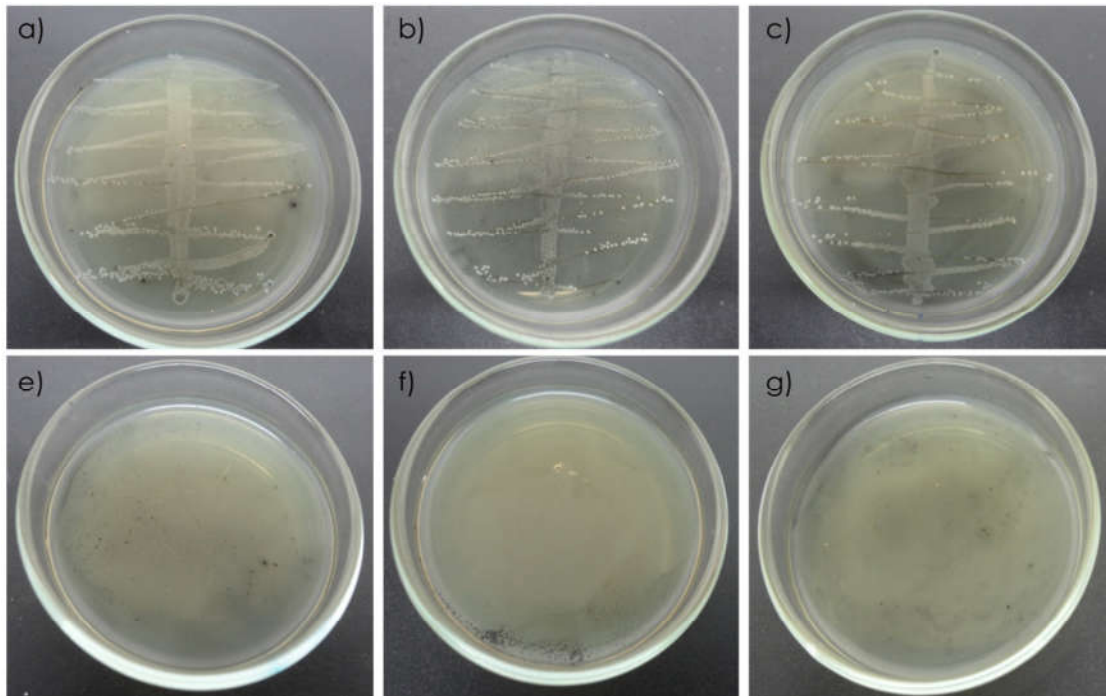


Figura 1 – Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas com as 3 concentrações de magnetita padrão: a) e e) 10 mg/ml; b) e f) 20 mg/mL; c) e g) 30 mg/mL. A primeira linha contém as placas teste inoculadas com o microrganismo (a, b, c) e a segunda linha contém os controles negativos de crescimento, sem inóculo (e, f, g)).

**Tabela 4** – Sumarização dos resultados obtidos com cultivo de MRSA 4395 CCBH.

<b>Quadruplicatas</b>	<b>Padrão de magnetita</b>			<b>Magnetita@Oxacilina</b>	<b>Controles</b>		
<b>Amostra</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CC</b>
<b>Concentração</b>	5 mg/500 µl	10 mg/500 µl	15 mg/500 µl	22 mg/200 µl			
<b>Placa 1</b>	>100.000*	>100.000*	>100.000*	- <sup>a</sup>	0	R	>100.000*
<b>Placa 2</b>	>100.000*	>100.000*	>100.000*	- <sup>a</sup>	0	R	>100.000*
<b>Placa 3</b>	>100.000*	>100.000*	>100.000*	- <sup>a</sup>	0	R	>100.000*
<b>Placa 4</b>	>100.000*	>100.000*	>100.000*	- <sup>a</sup>	0	R	>100.000*

Nota: CC: Controle de Crescimento; CP: Controle Positivo: uso de Cefoxitina; (\*) UFC; (a) Ausência de crescimento; R: Resistente; 0: sem crescimento.

Fonte: Própria

Contudo, os resultados avaliando as nanopartículas de magnetita conjugadas à Oxacilina, sob ação de campo magnético estático ativador da magnetita, mostraram atividade anti-estafilocócica, caracterizada pela inibição total do crescimento bacteriano (Figura 2).

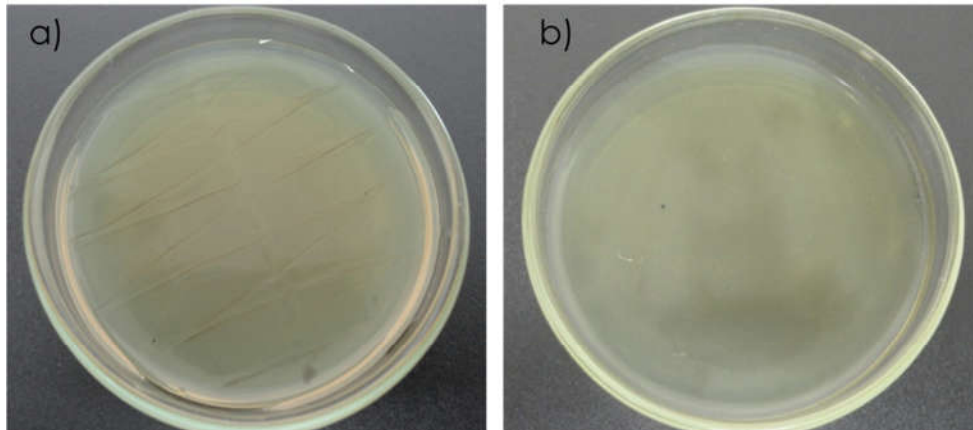


Figura 2 – Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas contendo magnetita@Oxacilina: **a)** placa teste inoculadas com o microrganismo e **b)** controle negativo de crescimento, sem inoculo.

O crescimento e a inibição são observados comparando-se as placas com as amostras com a triplicata do controle de crescimento (Figura 3A), no qual houve desenvolvimento de > 100.000 UFC. Além deste, os controles positivos (Figuras 3B) e negativo (Figuras 1D, 1E, 1F e 2B), validaram os experimentos.

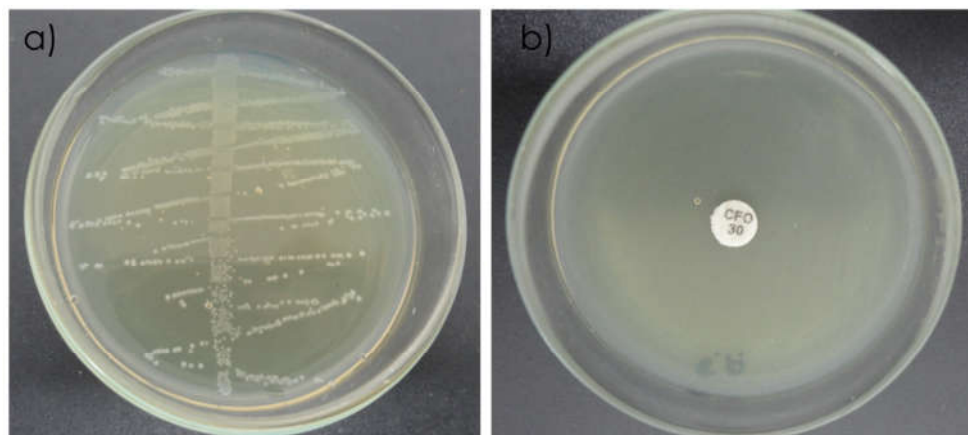


Figura 3 – Crescimento de MRSA 4395 CCBH em placas: **a)** controle de crescimento e **b)** controle positivo (inoculo + Cefoxitina (De acordo com a padronização / CLSI para confirmar a resistência da *S. aureus* MRSA).



O crescimento celular das linhagens estudadas foi acessado pelas absorbâncias das células expostas ao MTT, comparando o controle, sem amostra, com as células com amostra nas concentrações-teste.

As absorbâncias obtidas das células de linhagem fibroblástica murínica 3T3 são apresentadas, em termos de porcentagem, no GRÁFICO 1.

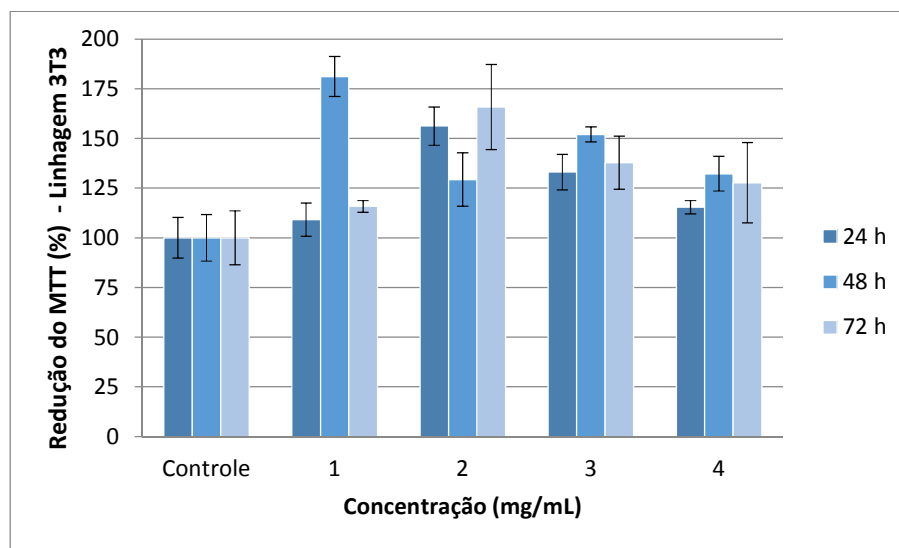


Gráfico 1 – Porcentagem de redução de MTT por células 3T3 em concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/mL em culturas de 24, 48 e 72 horas. Controle de células sem adição de amostra (magnetita@Oxacilina).

É possível notar que em nenhuma das concentrações adicionada, houve inibição do crescimento das células. Ao contrário do efeito tóxico, em todas as concentrações houve um aumento no crescimento em relação ao padrão sem amostra. Entretanto, parece haver uma relação dose-dependente nas amostras de 24 e 72 horas, há uma tendência crescente até a concentração de 1 mg/mL, quando se observa uma redução no crescimento, podendo indicar que doses muito superiores às testadas podem vir a apresentar atividade citotóxica.

Com relação à linhagem de células embrionárias renais, HEK -293, (GRÁFICO 2), as concentrações de 10 e 100 mg/mL parecem inibir o crescimento celular após 24 horas de exposição. Dado curioso não observado após tempos de 48 e 72 horas, nos quais, as amostras de magnetita@Oxacilina parecem não ter apresentado qualquer efeito inibitório,

mais uma vez, como nas células 3T3, o que se observa é um maior crescimento celular em relação ao grupo controle,

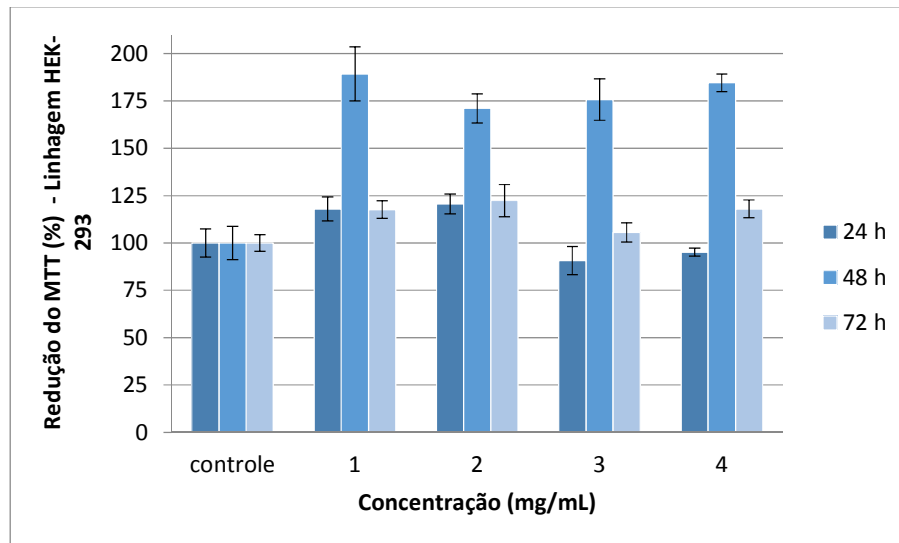


Gráfico 2 – Porcentagem de redução de MTT por células 3T3 em concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/mL em culturas de 24, 48 e 72 horas. Controle de células sem adição de amostra (magnetita).

Os valores bioquímicos encontrados foram bem variáveis, inclusive dentro das triplicatas, entretanto, alguns dados encontrados chamaram atenção para uma das cobaias inoculada apenas com solução salina: essa apresentava valores altos de ureia, indicando função inadequada dos rins; outro dado destoante do grupo foi uma baixíssima contagem de linfócitos, que podendo significar uma deficiência imunológica ou que a infecção se instalou de forma mais severa.

Os padrões bioquímicos elevados da transaminase TGO já eram esperados uma vez que o músculo da coxa dos animais foi incidido para instalar a infecção, bem como o aumento nos valores de segmentados, primeira linha de defesa contra o *S. aureus*. Entretanto, fora um dos resultados do grupo tratado com salina, os demais resultados bioquímicos foram equiparáveis entre os grupos estudados.

Além desses resultados não publicados, algumas caracterizações desejadas inicialmente, como o teste de liberação *in vitro* não puderam ser concluídos devido às alterações no projeto inicial.

O plano original da pesquisa foi delineado para ser puramente *in vitro*: preparo do sistema, caracterização, testes em bactérias e em células

eucarióticas. Pois tínhamos submetido o projeto ao comitê de ética, mas ainda não tínhamos o parecer. Quando o projeto foi aprovado o trabalho teve que ser alterado para conter também os estudos *in vivo*.

Outros experimentos, propostos no projeto refeito também findaram não sendo executados, como o exame de imagem nas cobaias: o técnico do equipamento não pertencia mais à universidade, então não conseguimos desvendar, em tempo hábil, o manejo do equipamento.

## 6.2 - Multidisciplinaridade

O projeto em questão foi desenvolvido e realizado por mim, farmacêutica, estudante do programa de pós-graduação de Ciências da Saúde e integrante do Grupo de Magnetismo (GM).

O GM nasceu de uma parceria da Farmácia, parcela biomédica e experimental, com a Física, departamento teórico e de criação.

Ao decorrer dos projetos do GM, uma nova parceria foi viabilizada com o Departamento de Cirurgia através do grupo do Núcleo de Cirurgia Experimental-UFRN, com o intuito de levar as pesquisas desenvolvidas o mais próximo das necessidades e aplicações clínicas.

Novas parcerias se fizeram necessárias, com a Bioquímica e a Microbiologia, para ampliar o acesso aos equipamentos, às técnicas e à expertise dos profissionais dessas áreas.

## 6.3 - Evolução intelectual

Durante toda minha trajetória na pesquisa, participei do desenvolvimento e escrita de 8 artigos, dos quais 6 estão publicados, 1 submetido e 1 sob revisão e atualização; 2 capítulos de livros e 4 patentes.

Nesse percurso, participei de vários congressos (como ouvinte e apresentando trabalhos) e minicursos; fiz curso para manipulação de equipamentos e para refino de dados; auxiliei no trabalho de conclusão de curso de 6 alunos de iniciação científica (sendo 1 na coorientação), e 2 alunos de mestrado.

#### 6.4 - Metas atingidas e perspectivas

As metas atingidas estão expressas nos resultados que obtivemos, nos contatos feitos e no que foi aprendido. Afora meu trabalho individual, ainda colaborei com a conclusão de 1 doutorado, 2 mestrados e 3 graduações. Fizemos parceria e projeto de colaboração com a universidade francesa Université Paris 13. Enveredamos por novas ideias como efeito do campo magnético sobre microrganismos gram-positivos e gram-negativos; tratamento magnético de água e desenvolvimento de magneto-lipossomas.

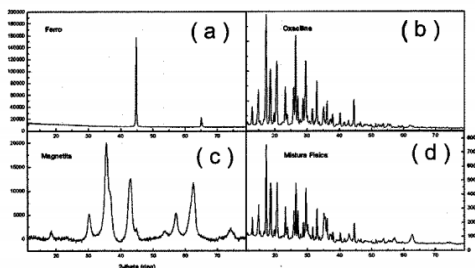
Minhas perspectivas são fazer novos testes com cepas gram-negativas e estudar o efeito do campo magnético estático e alternado sobre células eucarióticas e procarióticas - sua influência no crescimento e desenvolvimento celular e eventuais alterações bioquímicas.

Pretendo continuar colaborando com o GM, e fazer concurso para integrar uma instituição de ensino superior.

## 6.5 – Produção Intelectual

**(21) BR 10 2013 011902-4 A2**

(22) Data de Depósito: 15/03/2013

(43) Data da Publicação: 18/11/2014  
(RPI 2289)**(51) Int.Cl.:****A61K 47/02****A61K 31/426****B82Y 5/00****(54) Título:** NANOXACIL: SISTEMA MAGNÉTICO PARA VETORIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**(72) Inventor(es):** ALDO DA CUNHA MEDEIROS, ARTUR DA SILVA CARRIÇO, JULIANA FERNANDES DE CARVALHO, KATIA LIRA DA SILVA, RAFAEL PEREIRA DE ARAUJO NETO, RODOLFO BEZERRA DA SILVA, SUZANA NOBREGA DE MEDEIROS, THALES RENAN FERREIRA PONTES, ÉRICA LIRA DA SILVA**(57) Resumo:** NANOXACIL: SISTEMA MAGNÉTICO PARA VETORIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES. Patente de invenção de sistema magnético para vetorização de antibióticos para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes. O sistema proposto nesse invento consiste na vetorização do antimicrobiano por meio de partículas superparamagnéticas guiadas através de um campo externo para o sítio de ação. O sistema de vetorização permite aumentar a permanência do medicamento no sítio de ação, aumentar a concentração do antimicrobiano no sítio da infecção, potencializar o poder bactericida do antibiótico pelas mudanças impostas pelo campo magnético das nanopartículas, e diminuir a concentração inibitória mínima. O sistema proposto baseia-se na administração por via intravenosa do antibiótico complexado ao vetor magnético, formando nanopartículas com resposta magnética. Um ímã externo localizado próximo do sítio da infecção deve ser utilizado a fim de guiar e promover a permanência das partículas no local de interesse. A força atrativa exercida pelo campo magnético é utilizada para induzir o extravasamento através do tecido epitelial do vaso sanguíneo e a concentração de doses elevadas de nanopartículas com antibiótico no tecido afetado pela infecção. Essa técnica é capaz de reduzir a quantidade de fármaco e/ou frequência de administrações.



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014028968-2 A2

(22) Data do Depósito: 24/10/2014

(43) Data da Publicação: 27/09/2016



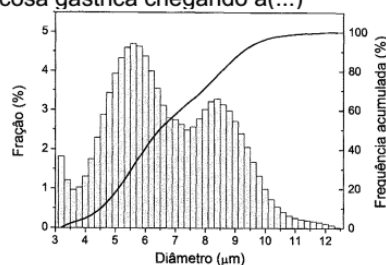
**(54) Título:** SISTEMA MAGNÉTICO POLIMERIZADO DESTINADO À VETORIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS CONJUGADOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR HELICOBACTER PYLORI

**(51) Int. Cl.:** A61K 9/24; A61K 47/02; A61K 47/30; A61K 31/424; A61K 31/7048; (...)

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO - UFRS

**(72) Inventor(es):** ARTUR DA SILVA CARRIÇO, JOSÉ HUMBERTO DE ARAUJO, ALDO DA CUNHA MEDEIROS, MARCO ANTONIO MORALES TORRES, ERYVALDO SÓCRATES TABOSA DO EGITO, ANA LÚCIA DANTAS, GUSTAVO DE OLIVEIRA GURGEL REBOUÇAS, THALES RENAN FERREIRA PONTES, ERICA LIRA DA SILVA FREITAS, JULIANA FERNANDES DE CARVALHO, RAFAEL PEREIRA DE ARAUJO NETO, KATIA LIRA DA SILVA, ÍTALO HENRIQUE MEDEIROS DAMASCENO

**(57) Resumo:** SISTEMA MAGNÉTICO POLIMERIZADO DESTINADO À VETORIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS CONJUGADOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR Helicobacter pylori" Tem por objetivo a invenção de sistema magnético para vetorização dos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por Helicobacter pylori (amoxicilina e claritromicina). O sistema é composto de partículas magnéticas revestidas por polímero gastroresistente, contendo antimicrobianos e é uma alternativa para superar os inconvenientes do esquema terapêutico atual. Este invento propõe-se à vetorização de antimicrobianos por meio de partículas magnéticas moduladas através de um campo magnético externo para o local de ação. O sistema proposto baseia-se na administração oral dos antimicrobianos dispersos em matriz polimérica gastroresistente associado a partículas magnéticas em uma estrutura do tipo Core-shell. Um ímã externo localizado no abdômen deve ser utilizado a fim de promover a permanência das partículas no local de interesse. A força atrativa exercida pelo campo magnético é utilizada para que o sistema magnético polimerizado ultrapasse a camada da mucosa gástrica chegando a(...)





República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015025185-8 A2

(22) Data do Depósito: 01/10/2015

(43) Data da Publicação: 23/05/2017



\* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 5 1 8 5 A

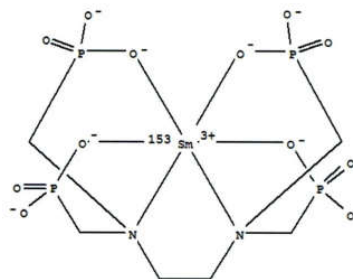
**(54) Título:** SISTEMA PARA VETORIZAÇÃO MAGNÉTICA DE RADIOFÁRMACO DESTINADO AO ALÍVIO DA DOR OCACIONADA POR DOENÇA ÓSSEA.

**(51) Int. Cl.:** A61K 51/12; A61K 103/00; A61K 9/51; A61K 47/36; A61K 47/02; (...)

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE- UERN, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO - UFRSA

**(72) Inventor(es):** ARTUR DA SILVA CARRIÇO; ANA LÚCIA DANTAS; ALDO DA CUNHA MEDEIROS; ANDRÉIA CAVALCANTI DE LIMA; GUSTAVO DE OLIVEIRA GURGEL REBOUÇAS; JOSÉ HUMBERTO DE ARAÚJO; JULIANA FERNANDES DE CARVALHO; MARCO ANTONIO MORALES TORRES; SUZANA NÓBREGA DE MEDEIROS

**(57) Resumo:** RESUMO Resumo da Patente de Invenção para "SISTEMA PARA VETORIZAÇÃO MAGNÉTICA DE RADIOFÁRMACO DESTINADO AO ALÍVIO DA DOR OCACIONADA POR DOENÇA ÓSSEA" Tem por objetivo patentear a invenção que visa a vetorização magnética de radiofármaco ligado a um polímero ou material biológico, com afinidade por qualquer estrutura presente no micro-ambiente de uma metástase óssea, ou de uma doença óssea de qualquer natureza, a exemplo do EDTMP-153Sm, e sistema de partículas magnéticas, destinado ao tratamento da dor ocasionada pela doença óssea. O sistema será composto por partículas magnéticas biocompatíveis, para aplicação intravenosa, na proximidade da lesão óssea. Esta patente de invenção propõe o carregamento do radiofármaco ao tecido ósseo lesionado, por meio da ação de partículas magnéticas moduladas por um campo magnético externo, para destruir as terminações nervosas e eliminar a dor. O ímã externo fará com que as partículas sejam retidas pelo maior tempo possível na proximidade da lesão óssea, para que o material biológico ou polímero com afinidade por qualquer estrutura do microambiente de metástases ós(...)



• 5 H<sup>+</sup>



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015025184-0 A2

(22) Data do Depósito: 01/10/2015

(43) Data da Publicação: 05/12/2017



\* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 5 1 8 4 \*

**(54) Título:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO PARA HIPERTERMIA E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

**(51) Int. Cl.:** A61K 9/00; B82Y 30/00

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN

**(72) Inventor(es):** ARTUR DA SILVA CARRIÇO; ANA LÚCIA DANTAS; ANA KAROLINNA GOMES DE ARAÚJO; ANDRÉIA CAVALCANTE DE LIMA; CARLOS AUGUSTO DE MORAES IGLESIAS; FELIPE BOHN; JOSÉ HUMBERTO DE ARAUJO; JULIANA FERNANDES DE CARVALHO; MARCO ANTONIO MORALES TORRES; RODOLFO BEZERRA DA SILVA; SILAS SARMENTO PEDROSA; SUZANA NOBREGA DE MEDEIROS

**(57) Resumo:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO PARA HIPERTERMIA E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS  
Tem por objetivo patentear uma invenção que visa a vetorização de um sistema magnético multifuncional, direcionável através do uso de um campo magnético externo para alvos como tumores sólidos, ou infecções bacterianas ou fúngicas, podendo ser usado para destruição de tumores sólidos por aquecimento produzido por hipertermia magnética, que resulta do aquecimento das nanopartículas magnéticas pela aplicação de um campo magnético externo oscilatório no tempo, ou para entrega seletiva e controlada externamente, de fármacos que são liberados da formulação mediante o uso de aquecimento produzido por um campo externo oscilatório no tempo, havendo ou não a liberação do fármaco, dependendo da temperatura da formulação. O sistema, para aplicação intravenosa, é composto por partículas magnéticas biocompatíveis, como Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, em associação com materiais ferromagnéticos ou ligas metálicas de alta magnetização, como por exemplo CoFe<sub>2</sub>, contendo ainda antibióticos, ou anti-neoplásicos, ou antifúngicos, e moléculas bioquímicas, ou outro material (...)



## 6.6 – Considerações finais

Como conclusões tem-se que o sistema magnetita@Oxacilina, desenvolvido, sintetizado e caracterizado durante meu mestrado foi prontamente reproduzido, e, os testes *in vitro* e *in vivo* para verificação da atividade terapêutica revelaram resultados promissores no tratamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (cepa padronizada obtida do Instituto Fiocruz).

Os estudos *in vitro* realizados com o microorganismo patogênico tiveram como resultado a completa inibição de crescimento da bactéria em todas as concentrações testadas, enquanto os testes-controle asseguraram: esterilidade do sistema e controle da cepa como MRSA. Os demais estudos *in vitro*, com células, comprovam a não-toxicidade do sistema em frente as linhagens celulares testadas, demonstrando poder ser empregados com segurança em seres vivos.

Os estudos *in vivo* despontaram com animadores resultados de contagem de colônias reduzidas e concentração aumentada do fármaco no sítio da infecção, bem como características de infecção mais amenas nos animais tratados com o sistema magnético.

Testes adicionais utilizando cepas selvagens de MRSA e estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação do vetor magnético como adjuvante antibiótico ainda precisam ser investigados, mas os resultados obtidos já nos direcionam à um novo e esperançoso tratamento físico de infecções causadas por microrganismos multirresistente.

## 7 - REFERÊNCIAS

1. Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*. 1990;19(0300-9610 (Print)):1S-8S.
2. DAVID J. HETEM SHMR, MIQUEL B. EKKELENKAMP. Infectious Diseases E-Book. In: Jonathan Cohen WGP, Steven M. , editor. SECTION 8 Clinical Microbiology: Bacteria - Staphylococci and Micrococci: ELSEVIER; 2017.
3. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol*. 2016 May 23;11:343-64.
4. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. *PLOS ONE*. 2010;5(5):e10598.
5. Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;21:531-41.
6. Golubchik T, Batty EM, Miller RR, Farr H, Young BC, Lerner-Svensson H, et al. Within-Host Evolution of *Staphylococcus aureus* during Asymptomatic Carriage. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e61319.
7. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009;9(1):32-47.
8. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005 2017/05/24;5(12):751-62.
9. Beceiro A, Tomás M, Bou Gn. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(2):185-230.
10. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*. 2015;13(1740-1534 (Electronic)):529-43.
11. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11:505.
12. Messina JA, Thaden JT, Sharma-Kuinkel BK, Fowler VG. Impact of Bacterial and Human Genetic Variation on *Staphylococcus aureus* Infections. *PLoS Pathogens*. 2016;12(1):e1005330.

13. Spaan AN, Surewaard Bg Fau - Nijland R, Nijland R Fau - van Strijp JAG, van Strijp JA. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. 2013(1545-3251 (Electronic)).
14. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):603-61.
15. Guggenberger C, Wolz C, Morrissey JA, Heesemann J. Two Distinct Coagulase-Dependent Barriers Protect *Staphylococcus aureus* from Neutrophils in a Three Dimensional in vitro Infection Model. *PLOS Pathogens*. 2012;8(1):e1002434.
16. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG, et al. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(10):2461.
17. Bestebroer J, van Kessel KPM, Azouagh H, Walenkamp AM, Boer IGJ, Romijn RA, et al. Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. *Blood*. 2009;113(2):328.
18. de Haas CJC, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJB, Heezius ECJM, et al. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;199(5):687.
19. Smith EJ, Visai L, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ. The Sbi Protein Is a Multifunctional Immune Evasion Factor of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 2011 September 1, 2011;79(9):3801-9.
20. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(1):218-34.
21. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science (New York, NY)*. 2013;342(6160):863-6.
22. Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *Journal of Clinical Nursing*. 1995;4(1):5-12.
23. Asaoka K, Endo S, Suzuki Y, Komuro S, Nemoto T, Kaku M. Hand hygiene using a new hand-cleansing formulation without sanitizers: Effect on *Staphylococcus aureus* removal and recovery of properties against skin damage. *American Journal of Infection Control*. 2016 2017/06/12;44(8):e129-e32.
24. van Bijnen EME, Paget J, de Lange-de Klerk ESM, den Heijer CDJ, Versporten A, Stobberingh EE, et al. Antibiotic Exposure and Other Risk

**Factors for Antimicrobial Resistance in Nasal Commensal *Staphylococcus aureus*: An Ecological Study in 8 European Countries.** PLoS ONE. 2015;10(8):e0135094.

25. Colebrook L. **INFECTION ACQUIRED IN HOSPITAL.** The Lancet. 1955 2017/05/24;266(6896):885-91.

26. Wenzel RP. **The Antibiotic Pipeline - Challenges, Costs, and Values.** New England Journal of Medicine. 2004;351(6):523-6.

27. Fair RJ, Tor Y. **Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century.** Perspectives in Medicinal Chemistry. 2014;6:25-64.

28. Debabov D. **Antibiotic resistance: Origins, mechanisms, approaches to counter.** Applied Biochemistry and Microbiology. 2013;49(8):665-71.

29. Chambers HF. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?** Emerging Infectious Diseases. 2001 Mar-Apr;7(2):178-82.

30. Martins A, Pereira VC, Cunha MdLRS. **Oxacillin Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from the University Hospital of Botucatu Medical School in Brazil.** Chemotherapy. 2010;56(2):112-9.

31. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. **A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000;44(6):1549-55.

32. Carvalho JFd, Fontes FL. **Revisão dos achados sobre Cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010 2013.** Arquivos de Ciências da Saúde. 2014;21(3):28-35.

33. Coates AR, Halls G Fau - Hu Y, Hu Y. **Novel classes of antibiotics or more of the same?** 2011(1476-5381 (Electronic)).

34. Bell AM, King St Fau - Barber KE, Barber Ke Fau - Adcock KG, Adcock Kg Fau - Wagner JL, Wagner JI Fau - Stover KR, Stover KR. **Managing acute bacterial skin and skin structure infections: Focus on new lipoglycopeptides.** 2017(1538-8662 (Electronic)).

35. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. **Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for Ventilator-Associated Pneumonia.** Chest. 2002;122(1):262-8.

36. Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzã³n J, Violi D, Prignoni A, et al. **Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia.** European Respiratory Journal. 2006;27(1):158.

37. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest*. 2000;118(1):146-55.
38. Micek ST, Roubinian N Fau - Heuring T, Heuring T Fau - Bode M, Bode M Fau - Williams J, Williams J Fau - Harrison C, Harrison C Fau - Murphy T, et al. Before-after study of a standardized hospital order set for the management of septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(11)(0090-3493 (Print)):2707-13.
39. Kurutkan MN, Kara O, Eraslan IH. An implementation on the social cost of hospital acquired infections. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(3):4433-45.
40. Gould IM, Reilly J, Bunyan D, Walker A. Costs of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its control. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(12):1721-8.
41. DeDent A, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Exploring *Staphylococcus aureus* pathways to disease for vaccine development. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(2):317-33.
42. Parker D. Humanized Mouse Models of *Staphylococcus aureus* Infection. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:512.
43. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011;24(1):71-109.
44. Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology*. 2017;133:152-63.
45. Devasahayam G, Scheld WM, Hoffman PS. Newer Antibacterial Drugs for a New Century. Expert opinion on investigational drugs. 2010;19(2):215-34.
46. Regiel-Futyra A, DÄ...browski JM, Mazuryk O, Åšpiewak K, KyzioÅ, A, Pucelik B, et al. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coordination Chemistry Reviews*. 2017.
47. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011;156(2):128-45.
48. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM. 2015;2015:246012.
49. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(13):1803-15.

50. Silva AKA, Silva EL, Egito ASCaEST. Magnetic Carriers: A Promising Device for Targeting Drugs Into the Human Body. *Current Pharmaceutical Design*. 2007;13(11):1179-85.
51. SILVA AKA, Silva EL, Carvalho JF, Pontes TRF, Neto RPdA, Carriço AdS, et al. Drug targeting and other recent applications of magnetic carriers in therapeutics. *Key Engineering Materials*. 2010;441:357-78.
52. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:2767-81.
53. Nath D, Banerjee P. Green nanotechnology - a new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013(1872-7077 (Electronic)).
54. Chen C, Chen L, Yi Y, Chen C, Wu L-F, Song T. Killing of *Staphylococcus aureus* via Magnetic Hyperthermia Mediated by Magnetotactic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82(7):2219-26.
55. Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*. 2010;5:277-83.
56. Klein S, Sommer A, Distel LVR, Neuhuber W, Kryschi C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;425(2):393-7.
57. Rodríguez-Chueca J, Mediano A, Ormad MP, Mosteo R, Ovelleiro JL. Disinfection of wastewater effluents with the Fenton-like process induced by electromagnetic fields. *Water Research*. 2014;60:250-8.
58. Pan W-Y, Huang C-C, Lin T-T, Hu H-Y, Lin W-C, Li M-J, et al. Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomposites. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016 2017/06/18;12(2):431-8.
59. Singh N, Jenkins GJS, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*. 2010;1:10.3402/nano.v1i0.5358.
60. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles - A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*. 2009;188(2):112-8.
61. Szalay B, Tatrai E Fau - Nyiro G, Nyiro G Fau - Vezer T, Vezer T Fau - Dura G, Dura G. Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in vivo and in vitro experiments. 2011(1099-1263 (Electronic)).

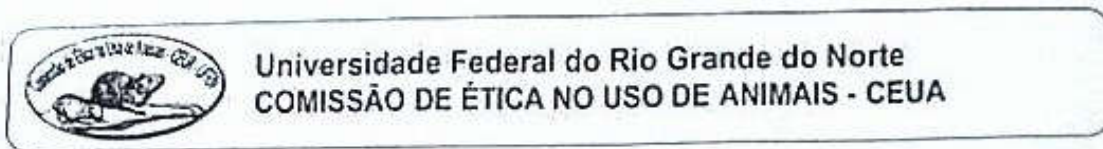
62. Strašák L, Vetterl Vr, Šmarda J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*. 2002;55(1):161-4.
63. D'Inzeo G, Pisa S, Tarricone L. Ionic channel gating under electromagnetic exposure: a stochastic model. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*. 1993;29(3):289-304.
64. Tsong TY, Chauvin F, Astumian RD. Interaction of Membrane Proteins with Static and Dynamic Electric Fields via Electroconformational Coupling. In: Blank M, Findl E, editors. *Mechanistic Approaches to Interactions of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems*. Boston, MA: Springer US; 1987. p. 187-202.
65. Bauréus Koch CLM, Sommarin M, Persson BRR, Salford LG, Eberhardt JL. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics*. 2003;24(6):395-402.
66. Darwish MS, Nguyen NH, Sevcu A, Stibor I, Smoukov SK. Dual-modality self-heating and antibacterial polymer-coated nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Material Science & Engineering*. 2016;63(1873-0191 (Electronic)):88-95.
67. Kim M-H, Yamayoshi I, Mathew S, Liln H, Nayfach J, Simon SI. Magnetic nanoparticle targeted hyperthermia of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection. *Annals of biomedical engineering*. 2012;41(3):598-609.
68. Anghel I, Grumezescu AM. Hybrid nanostructured coating for increased resistance of prosthetic devices to staphylococcal colonization. *Nanoscale Research Letters*. 2013;8(1):6-.
69. Durmus NG, Taylor EN, Kummer KM, Webster TJ. Enhanced Efficacy of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Against Antibiotic-Resistant Biofilms in the Presence of Metabolites. *Advanced Materials*. 2013;25(40):5706-13.
70. El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Lourenço PJ, Costa MA, et al. Impact of Biohybrid Magnetite Nanoparticles and Moroccan Propolis on Adherence of Methicillin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2016;21(9).
71. Silva ÉL, Carvalho JF, Pontes TRF, Oliveira EE, Francelino BL, Medeiros AC, et al. Development of a magnetic system for the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009;321(10):1566-70.
72. Carvalho JF, Medeiros SN, Morales MA, Dantas AL, Carriço AS. Synthesis of magnetite nanoparticles by high energy ball milling. *Applied Surface Science*. 2015;275:84-7.

73. Araújo Neto R, Silva E, Carvalho J, Pontes T, Silva K, Damasceno I, et al. Monodispersive sodium oleate coated magnetite high susceptibility nanoparticles for hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2014;364:72-9.
74. Carriço A, Carvalho J, Medeiros A, Silva E, Pontes T, Araújo Neto R, et al., inventors; NANOXACIL: SISTEMA MAGNÉTICO PARA VETORIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES. Brasil. 2013.
75. Carvalho JF, Medeiros SN, Morales MA, Dantas AL, Carriço AS. Synthesis of magnetite nanoparticles by high energy ball milling. *Applied Surface Science*. 2013;275:84-7.
76. Bush K, Heep M, Macielag MJ, Noel GJ. Anti-MRSA B-lactams in development, with a focus on ceftobiprole: the first anti-MRSA B-lactam to demonstrate clinical efficacy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2007;16(4):419-29.
77. Lepak AJ, Zhao M, Andes DR. Comparative Pharmacodynamics of Telavancin and Vancomycin in the Neutropenic Murine Thigh and Lung Infection Models against *Staphylococcus aureus*. . 2017(1098-6596 (Electronic)).
78. Freeman J, Morris A. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Wolters Kluwers; 2016.
79. Jain A, Agarwal A, Verma RK. Cefoxitin disc diffusion test for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(8):957-61.
80. Oh SJ, Ryu Js Fau - Shin JW, Shin Jw Fau - Yoon EJ, Yoon Ej Fau - Ha H-J, Ha Hj Fau - Cheon JH, Cheon Jh Fau - Lee HK, et al. Synthesis of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. 2002(0969-8043 (Print)).
81. Xiao W, Gu H, Li D, Chen D, Deng X, Jiao Z, et al. Microwave-assisted synthesis of magnetite nanoparticles for MR blood pool contrast agents. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2012;324:488–94.



## 8 – ANEXO

## 8.1 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



PROTOCOLO N.º 051/2014 (2)

Professor/Pesquisador: *ALDO DA CUNHA MEDEIROS*

Natal (RN), 07 de novembro de 2014.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "EFEITO DE ANTIBIÓTICO VETORIZADO COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR BACTÉRIA MULTI-RESISTENTE", após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída.

Relatório: MARÇO 2017.

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,



John Fontenele Araujo  
Coordenador da CEUA