



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais

Lurian Maciel Alves

**Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e fotoantimicrobiano de
nanoestruturas de Bismutato de Cobre e Óxido de Cobre contra bactérias
Gram-positiva e Gram-negativa**

Dissertação de Mestrado

Campo Grande
2020

Lurian Maciel Alves

Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e fotoantimicrobiano de nanoestruturas de Bismutato de Cobre e Óxido de Cobre contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Coorientadora: Prof. Dra. Carla Santos de Oliveira

Campo Grande
2020

RESUMO

Controlar ou mesmo inibir o desenvolvimento de colônias de bactérias em contexto médico e/ou laboratorial é um problema que a humanidade enfrenta há muito tempo valendo-se de inúmeras tecnologias. Desde o uso de substâncias nocivas chamadas antibióticas, até técnicas mais sofisticadas, como o uso de radiação ionizante e não-ionizante, a ciência vem combatendo a proliferação desses microrganismos. Neste trabalho, fizemos uma avaliação das propriedades antimicrobianas e fotoantimicrobianas de nanomateriais constituídos de óxido de cobre e Bismutato de Cobre. Para isso, realizamos a caracterização fotofísica e fotoquímica desses materiais e avaliamos a sua produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), avaliamos a liberação de íons em solução aquosa por parte dos materiais e também realizamos ensaios biológicos em cepas Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus* e *E. coli*). Os ensaios em conjunto mostraram que os materiais têm potencial aplicabilidade para esses fins, sendo que dos 4 designs testados, 1 deles foi capaz de inibir cepas de *E. Coli*, sob a irradiação de luz azul (425 nm), com 1h30 de irradiação à irradiância de 8,3 mW/cm² à concentração de 50 ppm. Além disso, 3 das 4 apresentaram propriedades bacteriostáticas e frearam o crescimento das bactérias. Houve boa correlação entre a velocidade e a produção das EROs e esses efeitos fotobacteriostáticos e fotobactericidas observados.

Palavras-chave: Controle fotodinâmico. Bismutato de Cobre. Óxido de Cobre. Nanomateriais. Bactérias.

ABSTRACT

Controlling or even inhibiting the development of bacterial colonies in a medical and / or laboratory context is a problem that humanity has faced for a long time using technologies. From the use of harmful substances called antibiotics, to more sophisticated techniques, such as the use of ionizing and non-ionizing radiation, science has been combating the proliferation of microorganisms. In this work, we evaluated the antimicrobial and photoantimicrobial properties of nanomaterials made up of copper oxide and copper bismutate. For this, we carried out the photophysical and photochemical characterization of these materials and evaluated their production of reactive oxygen species (ROS), we also evaluated the release of ions in aqueous solution by these materials and we performed biological tests on Gram-positive and Gram-negative strains. (*S. aureus* and *E. coli*). The tests in hand set that the materials have potential applicability, being that of the 4 designs tested, 1 of them was able to inhibit strains of *E. Coli*, under an irradiation of blue light (450 nm), with 1.5h of irradiation to irradiance of 8.3 mW / cm² at a concentration of 50 ppm. In addition, 3 of the 4 bacteriostatic properties and slowed the growth of bacteria. There was a good correlation between the speed and the production of ROS and these observed photobacteriostatic and photobactericidal effects.

Keywords: Photodynamic control. Copper Bismuthate. Copper Oxide. Nanomaterials. Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tábua egípcia mostrando a cultura de exposição ao sol como forma de manter a saúde.	12
Figura 2 – Exemplo de FS de segunda geração.	14
Figura 3 – Ilustração da geração de EROs por um nanomaterial na presença de luz.	15
Figura 4 – Alinhamento de bandas e reações eletroquímicas de produção de EROs.	17
Figura 5 – Bioensaio de Li et al, 2012, comparando nanoestruturas e microestruturas.	18
Figura 6 – Diagrama de Jablonski simplificado.	22
Figura 7 – Mecanismo de produção da espécie fluorescente DCF, que pode ser utilizada como um marcador para EROs do tipo I.	23
Figura 8 – Amostras preparadas para o ensaio de liberação de íons.	28
Figura 9 – Imagem MEV da amostra CBO. Escala: 2 μm	31
Figura 10 – Imagem MEV da amostra CBO. Escala: 200 nm.	31
Figura 11 – Imagem MEV da amostra HJ-E. Escala: 2 μm	32
Figura 12 – Imagem MEV da amostra HJ-E. Escala: 200 nm.	32
Figura 13 – Imagem MEV da amostra HJ-C. Escala: 5 μm	33
Figura 14 – EDS das amostras utilizadas.	34
Figura 15 – Difrátograma de Raio-X dos materiais utilizados	35
Figura 16 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras estudadas	36
Figura 17 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra CuO.	37
Figura 18 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra CBO.	38
Figura 19 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra HJ-E.	39
Figura 20 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra HJ-C.	40
Figura 21 – Gráfico de produção de EROs para o marcador DCFH-DA das quatro amostras usadas.	41
Figura 22 – Amostras de <i>S. aureus</i> irradiadas.	44
Figura 23 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras não irradiadas. Os rótulos correspondentes são: CuO (a), HJ-E (b), HJ-C (c), CBO (d) e HO (e).	45
Figura 24 – Gráfico geral <i>S. aureus</i>	46
Figura 25 – Gráfico amostras irradiadas <i>S. aureus</i>	47
Figura 26 – Gráfico amostras não irradiadas <i>S. aureus</i>	48

Figura 27 – Amostras com <i>S. aureus</i> irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Os rótulos correspondentes são: CBO (a), CuO (b), HJ-C (c), HJ-E (d), HO (e).	49
Figura 28 – Amostras com <i>S. aureus</i> não-irradiadas e plaqueadas 24h após a dispersão dos nanomateriais. Os rótulos correspondentes são: CBO (a), CuO (b), HJ-C (c), HJ-E (d), HO (e).	50
Figura 29 – Gráfico de barras para o plaqueamento de <i>S. aureus</i> 24h após a irradiação	51
Figura 30 – Valores médios das UFC/mL de <i>S. aureus</i> submetidas aos nanomateriais na presença de irradiação da luz azul, plaqueadas 24h após o dano da irradiação.	52
Figura 31 – Valores médios das UFC/mL de <i>S. aureus</i> não irradiadas, plaqueadas 24 horas após o dano da irradiação. Não houve significativa diferença estatística entre nenhuma das amostras, feito o Teste-t.	53
Figura 32 – Imagens ilustrativas das amostras irradiadas com <i>E. coli</i>	54
Figura 33 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras de <i>E. coli</i> não-irradiadas. Os rótulos correspondentes são: HO (a), CBO (b), HJ-E (c), HJ-C (d) e CuO (e).	55
Figura 34 – Gráfico geral <i>E. coli</i>	56
Figura 35 – Gráfico amostras irradiadas <i>E. coli</i>	57
Figura 36 – Gráfico amostras não irradiadas <i>E. coli</i>	58
Figura 37 – Amostras com <i>E. coli</i> irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Os rótulos correspondentes são: H ₂ O (a), HJ-C (b), CBO (c), CuO (d), HJ-E (e).	59
Figura 38 – Amostras com <i>E. coli</i> não irradiadas, mas plaqueadas 24h após a dispersão dos nanomateriais. Os rótulos correspondentes são: H ₂ O (a), HJ-C (b), CBO (c), CuO (d), HJ-E (e).	60
Figura 39 – UFC/mL das amostras irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Ao realizar o teste-T simples, percebemos que para $p < 0,05$ não há diferenciação estatística significativa entre as amostras e o controle, exceto para a amostra HJ-C, que apresentou efeito bactericida.	61
Figura 40 – UFC/mL das amostras não irradiadas e plaqueadas 24h após a submissão aos nanomateriais. Ao realizar o teste-T simples, percebemos que para $p < 0,05$ há diferenciação estatística significativa entre as amostras e o controle, exceto para a amostra HJ-C, que apresentou indiferença.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indicação das amostras estudadas e suas abreviações. O significado do excesso de cobre e da proporção equilibrada mencionada é explicada posteriormente na seção 5.1.	25
Tabela 2 – Parâmetros de configuração do ICP-OES para experimento de liberação de íons	27
Tabela 3 – Liberação de íons de Bismuto em 48h.	42
Tabela 4 – Liberação de íons de Cobre em 48h.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três Dimensões
AG	Algoritmo Genético
ATR	Attenuated Total Reflectance (Refletância Total Atenuada)
CBO	Bismutato de Cobre (em inglês)
CIS	Cruzamento inter-sistema
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
CO	Monóxido de Carbono
CS	Cosine Similarity
CSA	Comunity Supports Agriculture
D2	Massa com 2% de diopsídio
DCF	Decision Cost Function
DHE	Dihidroetídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	fotossensibilizador
FTIR	Fourier Transform Infrared Radiation
H2O	Água
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HE	Etídio
ICP	Índice de Percepção da Corrupção
IF	Instituto Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica

II	Instituto de Identificação Civil e Criminal
LED	Light Emitting Diode
LNNA	Laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia Aplicada
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MP	Megapixel
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
NP	Nanopartícula
O2	Oxigênio
OH	HIDROXILO
PCA	Ágar padrão para contagem (em inglês)
RGB	Red, Green, Blue
ROS	Reactive Oxygen Species
RV	Relaxação Vibracional
S.A	Sociedade Anônima
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	Ultra Violeta
XIX	Século 19
XX	Século 20
XXI	Século 21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	Aspectos históricos do controle fotodinâmico	12
2.2	Uso de fotossensibilizadores nanoparticulados	14
2.3	Uso do controle fotodinâmico em bactérias	17
2.4	Mecanismos fotodinâmicos	20
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Caracterização morfológica dos materiais	25
4.2	Caracterização fotofísica dos materiais	25
4.3	Ensaio de produção de EROs	26
4.4	Liberação de íons	26
4.5	Ensaio biológico	29
4.5.1	Preparo das soluções de nanomateriais e de bactérias	29
4.5.2	Grupo irradiado e grupo não irradiado	29
4.5.3	Plaqueamento	29
4.5.4	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Caracterização morfológica dos materiais	31
5.1.1	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	31
5.1.2	Difração de Raio-X (DRX)	34
5.2	Caracterização óptica dos materiais	35
5.2.1	Espectros de Absorção UV-Vis	35
5.3	Avaliação do potencial tóxico e citotóxico	36
5.3.1	Ensaio de produção de EROs	36
5.3.2	Liberação de íons	41
5.4	Ensaio biológicos	43
5.4.1	Ensaio com <i>Saureus</i>	44
5.4.2	Ensaio com <i>Ecoli</i>	53
5.5	Avaliação dos mecanismos de toxicidade dos nanomateriais	62

6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos desde o seu desenvolvimento na década de 1920 até os dias atuais, seja para controle de pragas ou mesmo para o controle de infecções bacterianas em humanos, tem induzido o surgimento de populações de bactérias multirresistentes. Observa-se que esses microrganismos desenvolveram mutações genéticas adaptativas capazes de produzir gerações imunes a certas categorias de antibióticos. (DEMEREC, 1948)

Essa guerra contra as infecções causadas por bactérias super-resistentes, chamadas de superbactérias, tem se tornado um dos grandes desafios do século XXI no que se refere à saúde humana, em geral, controle de ou mesmo de laboratórios e plantações. (ARIAS; MURRAY, 2009).

Na tentativa de combater essas superbactérias, a comunidade tem tentado inúmeras estratégias inovadoras, desde o 'design' e síntese de novos antibióticos (método mais tradicional), até o desenvolvimento de engenharia genética para vírus bacteriófagos (FERNEBRO, 2011).

É na busca por alternativas que surge a inativação fotodinâmica, também chamada de terapia fotodinâmica (TFD), que busca a inativação de células nocivas utilizando a ação da luz, combinada com substâncias fotossensibilizadoras como ativadores de processos químicos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs) que agridem a célula do patógeno (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992). Essa técnica se mostrou eficaz no controle de carcinomas, e suas vantagens frente aos controles populacionais convencionais, por possuírem uma ação multissítio, dificultam muito a ação de mecanismos de adaptação dos microrganismos, o que inviabiliza um processo de desenvolvimento de resistência.

Neste trabalho será explorada a utilização de um conjunto de materiais nanoestruturados formados por óxido de cobre (CuO) e bismutato de cobre (CuBi₂O₄) como potenciais agentes fotossensibilizadores (FS) para a inativação de colônias não resistentes a antibióticos, discutindo seus mecanismos de ação, suas características morfológicas, químicas e físicas. O sucesso dessa forma de aplicação nos permite vislumbrar a aplicação contra populações de micro-organismos multi-resistentes, oferecendo uma alternativa para a inativação destes micro-organismos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos históricos do controle fotodinâmico

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na utilização de três componentes para a destruição de um tecido ou célula alvo: Luz, oxigênio molecular (O_2) e uma molécula fotossensibilizadora. Assim sendo, o uso desse mecanismo para fim medicinal remonta às civilizações antigas do Egito, da Grécia e da Índia, quando eram utilizados extratos de ervas para tratamento de algumas infecções (DANIELL; HILL, 1991). Em registros antigos de papiros de civilizações que datam de 3000 a.C. são observadas, por exemplo, instruções para a cura de vitiligo utilizando plantas e exposição solar.

A descoberta das propriedades medicinais do Sol por parte dessas civilizações antigas é reflexo de uma questão mais profunda, de cunho religioso. Para estas civilizações, o Sol era um Deus digno de adoração e profunda reverência, por lhes possibilitar a vida (MCDONAGH, 2002). Essa reverência é encontrada em diversos achados arqueológicos como o exposto na figura 1. Nela, podemos observar uma tábua com a figura de um faraó em forma de esfinge, uma criatura mítica. A esfinge segura uma espécie de oferta à divindade, o Sol.

Figura 1 – Tábua egípcia mostrando a adoração religiosa ao Sol. Essa profunda reverência pode ser relacionada à posterior descoberta das propriedades medicinais da exposição solar. (MCDONAGH, 2002)



Fonte: ABDEL-KADER, Mahmoud. Photodynamic Therapy From Theory to Application. Cairo, Egito. Editora Springer, 2014.

Por milhares de anos, a técnica ficou impraticada, até sua redescoberta no mundo moderno no final do século XIX e início do século XX. O Suíço Arnold Rikli é considerado o pai da terapia fotodinâmica (ZUPANIC-SLAVEC; TOPLAK, 1998). Em seus estudos, relatou

que a exposição solar poderia ser benéfica para a saúde humana, uma vez que ativaria mecanismos de defesa do nosso corpo, uma técnica chamada de Helioterapia.

A ideia de utilizar corantes como FS foi relatada pela primeira vez em 1897 por Oscar Raab, um estudante da universidade de Munique (MOAN; PENG, 2003). Ele percebeu que o efeito tóxico de corante de acridina em paramécios era muito menor em dias nublados do que em comparação com dias ensolarados, sugerindo que talvez houvesse um efeito da interação deste tipo de medicamento com a luz, ou seja, ele cogitou a possibilidade de que a luz produzisse algum efeito através do corante capaz de matar o paramécio. De fato, essa hipótese se confirmou e abriu um novo campo da ciência, conhecido como fotobiologia.

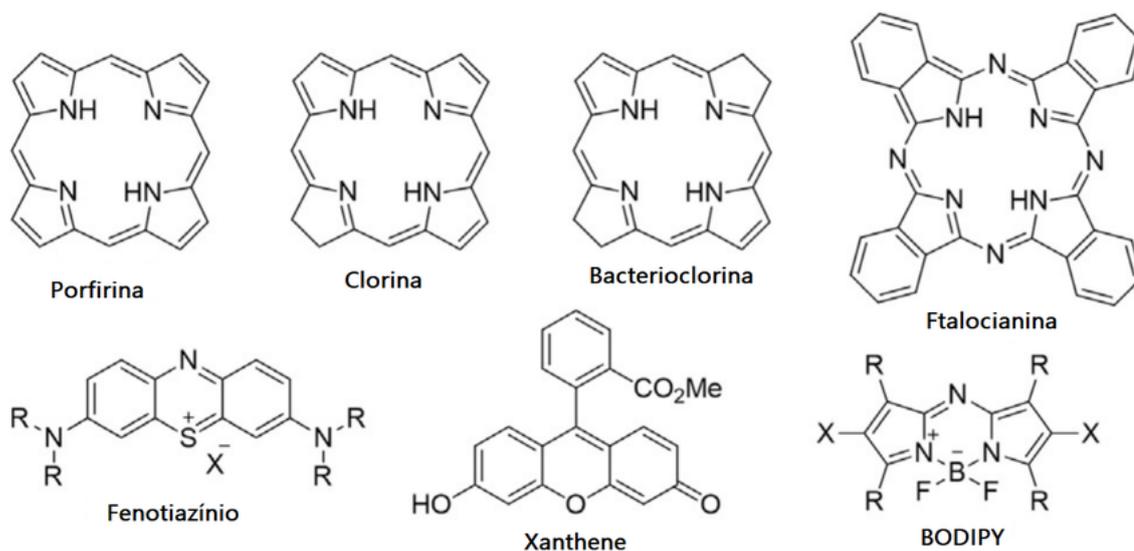
O professor H. Tappeiner, que supervisionava o estudo de Raab utilizou pela primeira vez o termo “Ação fotodinâmica” em 1904. Seu grupo começou a desenvolver pesquisas para utilizar essa forma de ação para controlar infecções tais como lúpus, tumores diversos e doenças de pele, combinando o uso da luz natural e artificial com uma variedade de corantes. (MCDONAGH, 2002)

Estes corantes artificiais, que eram empregados e são empregados até hoje, são considerados os fotossensibilizadores de primeira geração, e ainda são feitos estudos para obter protocolos de uso em diversas aplicações de TFD.

Uma das barreiras encontradas por essas substâncias pioneiras, era a sua dificuldade de ultrapassar as membranas de algumas células e penetrar nas partes vitais das mesmas e, por este motivo, algumas delas torna seu uso inviável em algumas aplicações (PERRIA et al., 1988).

O uso de clorinas, porfirinas e outras moléculas derivadas da clorofila podem ser agrupadas como a segunda geração de fotossensibilizadores (GOMER, 1991). São macromoléculas que possuem afinidades eletrônicas tais que possibilitam uma melhor localização das mesmas em tecidos-alvo. Um exemplo de molécula deste tipo é a Ftalocianina, exibida na Figura 2. Uma quantidade razoável dessa classe de fotossensibilizador alcançou o uso comercial (BLISS et al., 2004) (SENIGE; BRANDT, 2011).

Figura 2 – Exemplo Fotossensibilizadores de segunda geração.



Fonte: Zhang et al., 2018.

Ainda enfrentando problemas para contornar a penetrabilidade dessas moléculas, surgiram os fotossensibilizadores nanoestruturados, bem como estruturas de óxidos metálicos. (HE et al., 2015)

2.2 Uso de fotossensibilizadores nanoparticulados

Os fotossensibilizadores de nova geração são uma alternativa para resolver o problema da difícil penetrabilidade de célula através do uso de fotossensibilizadores em escala nanométrica, que reconhecidamente apresentam alta penetrabilidade em diversos tecidos biológicos. (WANG et al., 2004)

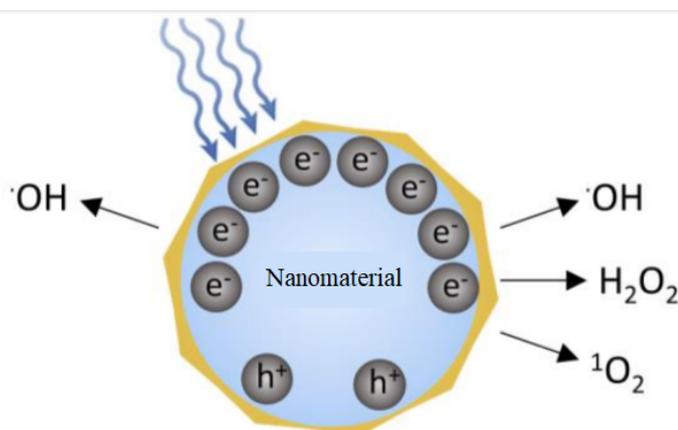
Outra vantagem desses fotossensibilizadores é a área superficial aumentada, que permite um contato maior com o tecido, podendo estender o ataque fotodinâmico por toda a célula. Além disso, essas estruturas apresentam uma eficácia maior na absorção de luz durante o processo fotodinâmico. (GILSON et al., 2017)

Outra possibilidade é a criação de nanomateriais biocompatíveis, uma vez que são conhecidas diferentes técnicas de síntese que podem ser empregadas com o desejo de se obter propriedades vantajosas, como a compatibilidade química com determinado tecido biológico, ou ainda a facilidade do corpo eliminá-lo através de uma manipulação físico-química dos materiais dentro do corpo. (FAN; MOON, 2015)

A comunidade tem se esforçado também em desenvolver nanomateriais funcionalizados com substâncias de reconhecida atividade fotodinâmica de modo a garantir uma entrega eficaz do fotossensibilizador nas células-alvo. (OHULCHANSKY et al., 2007) (WANG et al., 2013).

Um desafio que os pesquisadores encontram no que se refere ao uso de material nanoparticulado como FS está na preocupação com sua toxicidade; seja pela liberação de íons nocivos à saúde humana, seja pela dificuldade de órgãos de eliminar eventuais acúmulos desses materiais (FU et al., 2014). A Figura 3 mostra, de forma resumida, como se dão os mecanismos de produção das EROs em semicondutores via processo fotodinâmico. A luz absorvida pelo nanomaterial leva elétrons para a banda de condução, produzindo pares elétrons-buracos. Estes pares elétrons-buracos podem, por sua vez, interagir com o oxigênio dissolvido no meio, ou mesmo com a água, produzindo diversas espécies radicalares de alta reatividade. (GARCEZ et al., 2011)(AHMAD; MUKHTAR, 2000)

Figura 3 – Ilustração da geração de EROs por um nanomaterial na presença de luz.



Fonte: Gilson 2017 (adaptada)

O mecanismo de produção de EROs por um material semicondutor pode ser entendido em sua estrutura de bandas. Em semicondutores, devido às suas características ópticas e eletrônicas, existem bandas de energia que podem ser acessadas pela absorção de um fóton. Através da teoria de estrutura de bandas, conseguimos calcular esses níveis de energia, bem como determinar a energia mínima necessária para conseguir realizar uma excitação óptica do material (HEINEMANN; EIFERT; HEILIGER, 2013). Essa energia é conhecida pelo termo em inglês *band gap* e está relacionado com a diferença de potencial gerada pela separação das cargas de um semicondutor excitado opticamente (LEWIS, 1990). Essa diferença de carga, de forma simplificada, gera uma diferença de potencial elétrico nos semicondutores, levando à produção de regiões negativas (elétrons em excesso) e regiões de vacância eletrônica (buracos)(KOFFYBERG; BENKO, 1982). Em geral, alguns materiais têm uma elevada probabilidade de que ocorra uma recombinação (RAPPAPORT et al., 2002), que é quando o elétron excitado retorna para seu nível energético original, emitindo um fóton. Note que esse efeito diminui a eficiência do processo fotodinâmico, uma vez que a separação das cargas é necessária para iniciar o mecanismo. Em contrapartida, alguns materiais têm características tais que permitem uma separação de cargas suficientemente duradoura para que ocorra transferência dessa carga, ou mesmo

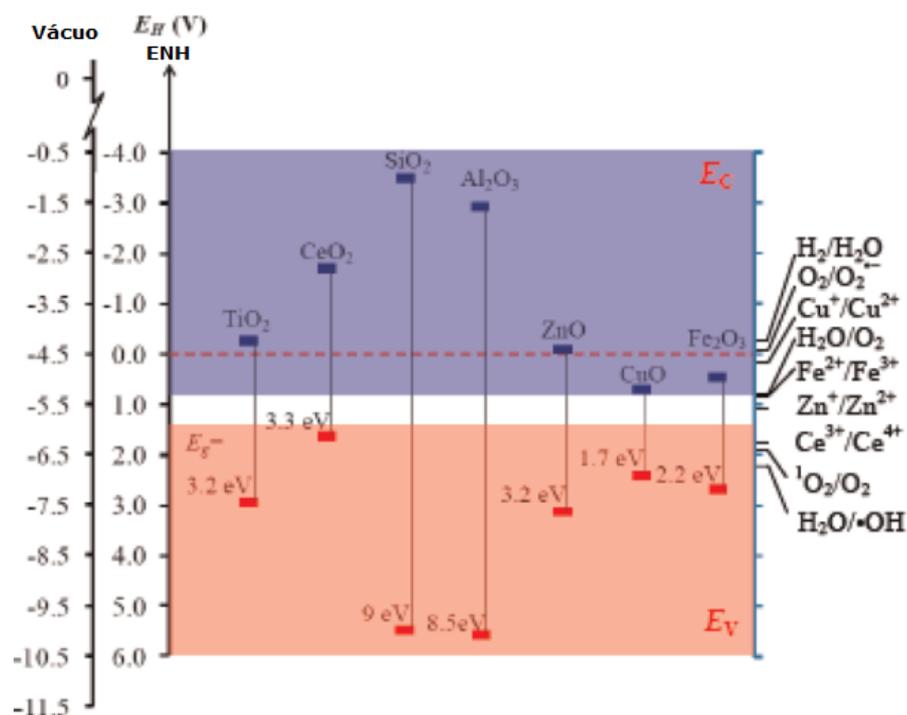
da energia gerada por essa separação para que ocorram reações químicas de interesse (GÉLINAS et al., 2014).

Então, para compreender os mecanismos de produção das EROs em nanomateriais semicondutores, precisamos entender as reações químicas que as geram, e quais suas condições eletroquímicas para que ocorram. E ainda, precisamos saber se um nanomaterial, ao ser excitado por alguma radiação, se essa excitação tem uma separação de cargas com as condições ideais para que a reação das EROs ocorra, além de avaliar se a recombinação ocorre em uma taxa baixa o bastante para permitir a ocorrência dessas reações.

(LI et al., 2012) reportou um estudo em que avaliou as condições e a produção de EROs de diversos nanomateriais, em especial os compostos de óxidos metálicos. Ele verificou uma boa correlação entre os *band gaps* alcançados pela irradiação de luz UV e os potenciais necessários para ocorrência das reações de produção das diversas EROs, bem como identificou as EROs que foram efetivamente detectadas experimentalmente. O alinhamento das bandas, isto é, a energia do fóton incidente com energia superior à energia do *band gap* dos materiais, com a condição necessária para ocorrer a reação de produção da ERO foi, em todos os casos, observado. No entanto, cabe ressaltar que essa separação de cargas pode resultar em outros tipos de reações, como a formação de íons em solução. Essas reações, em muitos casos, concorre com a produção de EROs e deve ser avaliada também durante a caracterização dos materiais.

A figura 4 mostra as reações de produção de diversas EROs e as estruturas de bandas dos nanomateriais testados por (LI et al., 2012).

Figura 4 – Estrutura de Bandas de alguns materiais. E_v representa o potencial da banda de valência e E_c o da banda de condução. Os potenciais foram tirados em relação Eletrodo Normal de Hidrogênio (ENH) e da escala absoluta de vácuo. Vemos também a energia do *band gap* cada um deles em eV. À direita da figura, vemos o potencial necessário para que ocorram diversas reações, como reações de ionização e de produção de EROs.



Fonte: Li et al., 2012, adaptado.

Ao conhecer as reações de produção de EROs, podemos avaliar a estrutura de bandas dos materiais e em seguida dizer se é esperado que eles gerem as espécies, bem como quais espécies esperamos que eles produzam. Como exemplo, observa-se na figura que o oxigênio singlete tem um potencial de reação em torno de 2,0 V em relação ao eletrodo normal de Hidrogênio. No entanto, o CeO_2 tem uma energia da banda de valência de aproximadamente 1,6 V, inferior ao potencial necessário para que a reação do oxigênio singlete ocorra. Assim sendo, não devemos esperar a produção dessa espécie pelo CeO_2 , o que é confirmado experimentalmente (LI et al., 2012).

2.3 Uso do controle fotodinâmico em bactérias

No que se diz respeito ao controle fotodinâmico de bactérias, vários avanços já foram feitos empregando fotossensibilizadores de segunda e primeira geração, inclusive para inativar bactérias resistentes a antibióticos (CAIRES et al., 2018) (MINNOCK et al., 1996).

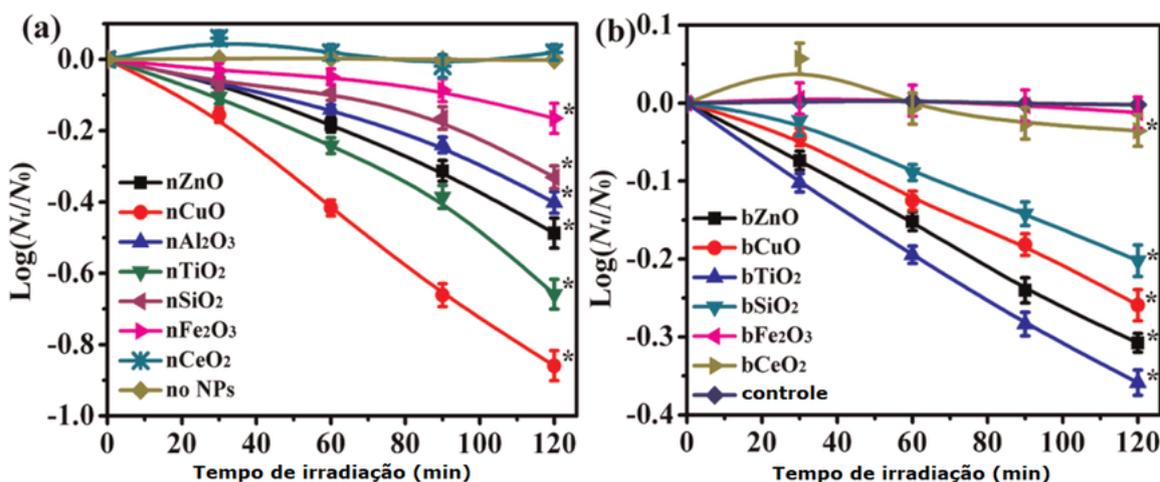
Estudos *in vivo* mostram, por exemplo, uma eficácia próxima de 100% quando aplicada a técnica da IFD em infecções por *S. aureus* em modelos animais (ratos) (ZOL-

FAGHARI et al., 2009) (LAMBRECHTS et al., 2005).

No que tange ao tratamento de infecções resistentes a antibióticos, recentes estudos têm utilizado de maneira efetiva, diferentes FS para esta finalidade, tais como metaloporfirinas (SKWOR et al., 2016), nanoestruturas óxido-metálicas (WANG et al., 2019) e nanoestruturas funcionalizadas com FS convencionais. (AGEL et al., 2019).

Alguns estudos realizaram também uma análise de diferentes nanoestruturas óxido-metálicas, avaliando suas capacidades em produzir espécies reativas de oxigênio e procurando uma correlação entre essa produção e a inativação das bactérias. Na Figura 5, (LI et al., 2012) mostram que tanto os materiais nanoparticulados quanto de seus granulados (bulk) foram capazes de induzir a inativação bacteriana através da luz Ultravioleta ($\lambda=365$ nm). Todavia, nota-se que a inativação promovida pelos nanomateriais é mais efetiva, quando comparados com os materiais de mesma composição química em dimensões macrométricas (bulks). Isso deixa claro que o tamanho dos materiais é relevante, uma vez que a concentração de espécies reativas produzidas é diretamente relacionada com a área superficial dos materiais. Essa área é maior para os materiais nanoestruturados, quando comparados com os bulks à mesma concentração, o que os confere uma reatividade maior.

Figura 5 – Evolução temporal da quantidade de bactérias que se desenvolvem após irradiação de luz Ultra-Violeta de nanomateriais (a) em comparação com suas versões precursoras macrométricas (bulk) (b). Observa-se uma eficácia maior dos materiais nanoparticulados. As amostras com asterisco foram significativamente diferentes do controle com 95% de confiabilidade. N_t representa o número de unidades formadoras de colônia por mL de solução, e N_0 representa O número de colônias no início do experimento.



Fonte: Li et al, 2012. Adaptado.

Ademais, Li et al. 2012 estudaram os mecanismos de fototoxicidade dos materiais, demonstrando, por exemplo, que devido à formação de íons Cu/Cu^{2+} ser incentivada pela absorção de fótons UV pelo material, acontece um aumento significativo de sua toxicidade para as células bacterianas, ainda que essa toxicidade não seja pela produção de EROs (*i.e.*, via processo fotodinâmico).

Outro estudo interessante reporta o uso de materiais a base de cobalto e bismuto, irradiados com luz visível para o controle de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA do inglês Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*) (WANG et al., 2019). Esse estudo mostra a importância de se sintetizar um material com boa separação de cargas e com um “band gap” suficiente para a produção das espécies reativas. A luz utilizada foi a azul (420 nm) com uma irradiância de 100 mW/cm² e avaliou-se o efeito dessa iluminação ao longo do tempo. O estudo concluiu um efeito bactericida em 30 minutos de irradiação, tanto para a colônia comum, quanto para a multi resistente. Além das análises *in vitro*, esse estudo também empregou o tratamento em ratos, obtendo sucesso na cura de ferimentos infectados por *S. aureus* e MRSA.

Em um outro estudo, (LIN et al., 2015) observaram que o TiO₂ apresentou um efeito bacteriostático, isto é, reduziu a velocidade do crescimento bacteriano, sem que as bactérias fossem totalmente inativadas logo após a irradiação. No entanto, 48h após a irradiação, deixando a solução no escuro, observou-se que houve um efeito bactericida, isto é, as bactérias não foram capazes de se desenvolverem, e todas as células morreram. Esse efeito previamente reportado é chamado de “memória catalítica pós-iluminação”. Isso ocorre porque o fotocatalisador permanece ativo, produzindo espécies reativas de oxigênio, mesmo que não esteja mais sob efeito da luz.

Uma discussão importante no que se refere aos fotossensibilizadores de nova geração é a respeito dos mecanismos de inativação de bactérias que são possíveis. (THILL et al., 2006) enumera pelo menos três mecanismos que são induzidos por esses materiais: (i) adsorção na membrana das bactérias; (ii) geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs); e (iii) produção de íons metálicos citotóxicos.

O primeiro mecanismo se dá pela atração entre os sítios eletricamente excitados dos materiais com a indução de carga elétrica na superfície das células bacterianas, gerando atração coulombiana. Essa adsorção, a longo prazo, pode impedir a célula de realizar corretamente seu metabolismo. Como as células têm um tamanho médio da ordem de alguns micrômetros, enquanto a membrana celular tem uma espessura aproximada de 40 nm, essa relação de tamanho permite que choques ocorram entre as partículas e as células, podendo impactar o funcionamento da membrana celular, provocando a morte celular.

O segundo mecanismo é, sem dúvida, o predominante na maioria dos ensaios que envolvem fotoinativação de bactérias. Nele, pode ocorrer transferência de energia ou carga na produção de espécies reativas induzindo processos oxidativos em múltiplos sítios da célula. Esse ataque pode ser na superfície da célula (degradação da membrana celular), ou ainda na região interna da célula (desintegração do DNA e organelas).

Por fim, a terceira forma de ataque celular se dá pela produção de íons citotóxicos que têm um potencial de redução próprio. Esses mecanismos podem ser ativados mesmo sem a irradiação, mas são amplificados quando os materiais são excitados por luz ultravioleta (LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008). Nesse caso, a reatividade dos materiais

umenta muito, e isso, além de ser obviamente nocivo para as bactérias, pode ser preocupante na aplicação em organismos vivos, visto que pode ser nocivo também para o tecido saudável.

Assim sendo, podemos dizer que o emprego de nanoestruturas óxido-metálicas para a inativação de bactérias é um importante passo na consolidação dos FS de nova geração e poder compreender suas características permitirá que a comunidade prossiga para um desenho mais inteligente na busca por novos FS e por materiais de aplicabilidade diversa. Cabe ressaltar que muitas vezes um material pode ter mais de uma aplicação. Por exemplo, atividades como a fotocatalise são aplicações que ocorrem através de mecanismos muito similares aos de ação fotodinâmica, mas buscando a degradação de substâncias não-biológicas na conservação ambiental. Nesse cenário, materiais semicondutores têm sido amplamente empregados para esta finalidade (SAMIA; CHEN; BURDA, 2003). Desta forma, tendo em vista a aplicabilidade desses materiais em atividade fotocatalítica (ARAI et al., 2007), a possibilidade de usá-los também como FS da IFD confere a esses materiais um maior interesse científico e tecnológico.

2.4 Mecanismos fotodinâmicos

Considerando o efeito fotodinâmico promovido pelos FS convencionais, existem dois mecanismos para produção de espécies reativas de oxigênio após a fotoexcitação do FS (HUANG et al., 2012). O mecanismo tipo I, que consiste em um processo onde há transferência de carga elétrica (transferência do elétron) do fotossensibilizador para o oxigênio molecular (O_2) presente no substrato alvo, formando espécies chamadas radiculares, como OH, O_2 , H_2O_2 , entre outros. Já o mecanismo tipo II consiste em um processo onde há transferência de energia do FS excitado para o O_2 , promovendo o elétron do estado fundamental da molécula do oxigênio, que está no seu estado triplete (3O_2), para o primeiro estado excitado singlete (1O_2) e, conseqüentemente, formando uma espécie molecular altamente reativa/tóxica.

Já o mecanismo tipo II consiste em um processo onde há transferência de energia de uma molécula excitada para um estado ressonante do O_2 molecular, formando uma espécie altamente tóxica, conhecida como oxigênio singlete (1O_2).

Uma forma de detectar a produção dessas espécies é através do uso de técnicas espectroscópicas, utilizando moléculas marcadoras que sofrem alterações em seus espectros de absorção e/ou fluorescência quando interagem/reagem com essas espécies radiculares. O uso das técnicas espectroscópicas pode ser feita tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FLORS et al., 2006)(BURNS et al., 2012) e existem vários marcadores que podem ser utilizados para esta finalidade (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). É importante, ao realizar este tipo de análise, identificar as reações químicas induzidas pela luz e que alterações essas reações provocam no espectro das amostras ao longo do tempo. Podem ocorrer novas emissões

ou absorções, ou ainda supressões de emissões dessas moléculas. Além disso, deve-se identificar se os produtos gerados são reflexos de reações do tipo I ou tipo II.

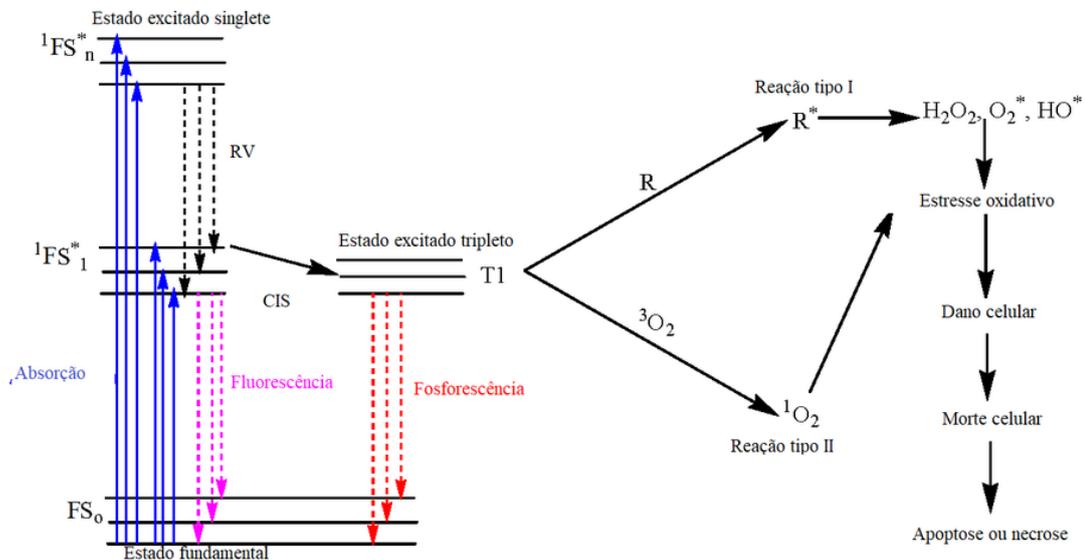
Apesar de existirem diferenças entre um FS convencional e um nanomaterial, é interessante entendermos os fenômenos envolvidos na interação da luz com a matéria durante o processo fotodinâmico. Para a produção de EROs, é necessário que: (i) inicialmente o fotossensibilizador absorva a radiação luminosa incidente; e (ii) que posteriormente, o FS excitado transfira a carga (elétron excitado) ou energia para um oxigênio molecular. Podemos representar esses processos por meio do diagrama de Jablonski, como mostrado na Figura 6.

Na Figura 6 podemos observar os possíveis “caminhos” que um fóton absorvido (flecha azul) por um FS pode tomar. Existe uma certa probabilidade de cada fenômeno acontecer para uma molécula ou material que absorve luz, de modo que podemos associar a cada um dos processos um rendimento quântico. (FRACKOWIAK, 1988)

Ao absorver o fóton, a molécula acessará níveis energéticos superiores ao fundamental (flecha azul). Esse excesso de energia pode ser dissipado por processos não-radiativos como a relaxação vibracional (RV - seta preta pontilhada), ou ainda por processos radiativos, como a fluorescência (seta rosa).

Existe ainda a probabilidade de que ocorra uma inversão de spin do elétron excitado, levando a molécula a um estado tripleto. Este processo se chama conversão inter-sistema (CIS - seta preta cheia). Essa energia pode ser devolvida para o meio através de um processo radiativo, a fosforescência (seta vermelha). Caso isto não ocorra, a molécula pode ficar neste estado tempo o bastante para ceder esta carga para o oxigênio molecular (Reação tipo I), ou ainda transferir a energia excedente para a formação do oxigênio singleto (Reação tipo II).

Figura 6 – Diagrama de Jablonski simplificado. À direita da figura, temos uma extensão aos fenômenos descritos pelo diagrama, aplicando-os para os dois mecanismos fotodinâmicos da IFD.

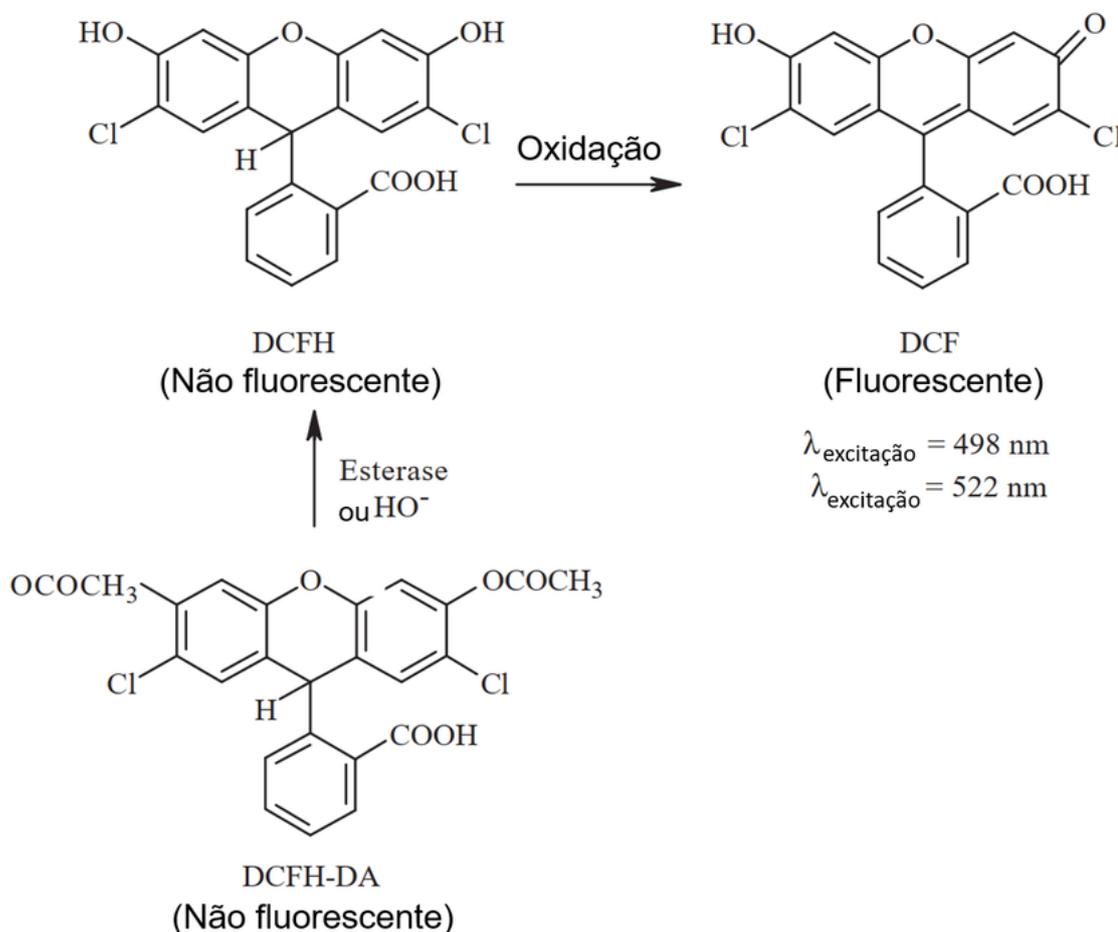


Fonte: DEBELE et al. (adaptado)

As moléculas que têm maior potencial de serem bons fotossensibilizadores são aquelas que apresentam maiores rendimentos quânticos na produção de oxigênio singleto (Tipo II) ou outros EROs (Tipo I). Isto é, aquelas em que favorecem um maior ocorrência de cruzamentos inter-sistema (CIS).

Para medir essas eficiências, existem algumas sondas que podem ser usadas junto a técnicas de espectroscopia. Uma delas é a 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), que é uma molécula não fluorescente. No entanto, quando na presença das EROs, em especial daquelas expressas pelas reações de Tipo I, forma-se uma espécie fluorescente, a Diclorofluoresceína (DCF). Esta molécula, por sua vez, possui uma fluorescência em torno de 525 nm quando excitada em 490 nm (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010) (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). A figura 7 mostra o mecanismo de produção dessa sonda fluorescente.

Figura 7 – Mecanismo de produção da espécie fluorescente DCF, que pode ser utilizada como um marcador para EROs do tipo I.



fonte: A. Gomes et al. (2005). Adaptado.

Desta forma, podemos investigar o rendimento quântico de formação de outras EROs (Tipo I) por meio da correlação entre o aumento da fluorescência em torno dessas regiões e a produção dessas EROs. No entanto, a sonda DCFH-DA não é uma sonda específica, e este tipo de ensaio não nos permite afirmar qual a espécie predomina em sua reação. Por outro lado, é uma sonda que nos permite avaliar como um todo o potencial de produção de EROs por um FS. Todavia, vale a pena destacar que existem outros marcadores que possibilitam identificar qual a espécie exata que está sendo gerada. Uma análise mais robusta para esse tipo de caracterização pode ser feita utilizando o marcador “singlet-oxygen sensor green” (SOSG), que identifica a presença de oxigênio singlete e consegue garantir a existência ou não do mecanismo tipo II (FLORS et al., 2006). Ácido para-clorobenzóico (BURNS et al., 2012), que marca reações induzidas por $\bullet\text{OH}$. Álcool Furfuril (LI et al., 2012), que indica a geração de oxigênio singlete. E, também o XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), que identifica O_2 , entre outros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e fotoantimicrobiana de nanoestruturas de Bismutato de Cobre e Óxido de Cobre no processo de inativação de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as dimensões e as características morfológicas e estrutural dos nanomateriais nanoestruturas de Bismutato de Cobre (CuBi_2O_4), Óxido de Cobre (CuO) e heterojunções dos dois compostos por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raio-X por dispersão de energia (EDS) e Difração de Raios-X (DRX) .
- Realizar a caracterização óptica dos nanomateriais, determinando suas capacidades de absorverem luz na região do UV-Vis.
- Avaliar o potencial citotóxico e fotocitotóxico dos nanomateriais por meio da determinação de liberação de íons e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) via experimentos de membrana de diálises e marcadores fluorescentes, respectivamente;
- Determinar o potencial antimicrobiano das nanoestruturas por meio de testes *in vitro* avaliando a capacidade em inativar as bactérias *S. aureus* e *E. coli*;
- Avaliar o potencial fotoantimicrobiano dos nanomateriais via testes *in vitro* determinando a capacidade em fotoinativar as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização morfológica dos materiais

Para determinar o tamanho e morfologia dos materiais aplicados, foram realizadas medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de raio-X por dispersão de energia (EDS) e Difração de Raios-X (DRX). A caracterização morfológica, bem como a síntese dos materiais utilizadas nesse trabalho foi feita em colaboração com o Laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia Aplicada (LNNA) da UFMS (NOGUEIRA et al., 2019).

Na Tabela 1, podemos observar quais foram as amostras utilizadas, bem como suas respectivas abreviações.

Tabela 1 – Indicação das amostras estudadas e suas abreviações. O significado do excesso de cobre e da proporção equilibrada mencionada é explicada posteriormente na seção 5.1.

Amostra	Sigla utilizada
Bismutato de Cobre puro (CuBi_2O_4)	CBO
Óxido de Cobre II puro	CuO
Heterojunção Bismutato de Cobre/Óxido de Cobre - Cobre em excesso	HJ-C
Heterojunção Bismutato de Cobre/Óxido de Cobre - Proporção equilibrada	HJ-E

Para determinar as fases cristalinas das amostras, foi utilizado um equipamento DRX modelo D2 Phaser da Bruker. O ajuste da configuração foi para a transição do Cobre $K\alpha$ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) com a variação angular de $20^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$, com passos de $0,02^\circ$ e contando 5 segundos a cada ponto. Para a obtenção das imagens do MEV, os materiais previamente sintetizados em granulado foram dispersos na superfície da fita de carbono montada sobre a base de liga de alumínio padrão. O tamanho de abertura do equipamento foi ajustado para $60 \mu\text{m}$, e a voltagem de aceleração foi de 15 kV, com uma distância de trabalho de 8 mm. Para determinar a composição química e o mapeamento químico da amostra, foi acoplado um acessório EDS da Oxford.

4.2 Caracterização fotofísica dos materiais

Para a caracterização fotofísica e fotoquímica dos materiais, foram preparadas 2 mL das soluções à concentração de 100 ppm em Dimetilsulfóxido (DMSO) das quatro amostras estudadas.

Foram realizadas medidas de absorção UV-Vis de cada uma delas, utilizando uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico o Espectrômetro Lambda 265 da PerkinElmer. O experimento foi conduzido à temperatura ambiente, e com os espectros coletados de 250 nm a 800 nm.

4.3 Ensaio de produção de EROs

Para este ensaio, a fim de determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizamos a sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), capaz de identificar espécies reativas para reações fotodinâmicas do tipo I, através de mudanças em seu espectro de Fluorescência (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005).

Foi preparada uma solução 5 mM de DCFH-DA em etanol, bem como uma solução a 100 ppm em água destilada do nanomaterial a ser analisado. Em seguida, foi feita uma diluição de ambos até que se obtenha 2 mL de solução com concentrações de 0,34 mM e 1,5 ppm do marcador e do nanomaterial, respectivamente. Foi feita, então a obtenção de seu espectro de fluorescência, utilizando um Espectrofluorímetro FS-2 da Scinco, configurado para excitação em 490 nm e emissão entre 500 nm e 600 nm (CAIRES et al., 2020).

Inicialmente, a solução teve sua fluorescência monitorada de minuto em minuto, sem que fosse submetida a irradiação por 10 minutos para determinar a capacidade de produção de EROs na ausência da luz. Posteriormente, avaliou-se a capacidade de produção de EROs quando submetidos a irradiação da luz azul (450 nm), a irradiância de 8,3 mW/cm², emitida por um sistema de LED. Ambas as medidas, na presença e na ausência da luz, as amostras foram colocadas e monitoradas diretamente numa cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados de um em um minuto durante um tempo total de 30 minutos (10 sem iluminação, 20 com iluminação), de modo a avaliar o aumento de intensidade de fluorescência devido a geração de EROs. Para a coleta dos espectros, as amostras foram excitadas em 490 nm e coletada a emissão entre 500 nm e 600 nm.

4.4 Liberação de íons

Para determinar a taxa de liberação de íons Cu²⁺ e BiO₃⁻, foi realizado um experimento que quantifica a liberação dessas substâncias por parte das amostras, utilizando a técnica ICP-OES (Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente - em inglês). Essa técnica consiste na produção, em uma amostra introduzida sob forma de neblina no centro do plasma, átomos excitados que emitem radiação em comprimentos de onda na faixa de 125 a 950 nm, característicos dos elementos nela presentes. A quantificação pode ser feita através de uma curva de calibração utilizando uma amostra com concentração de átomos conhecida, podendo ser construída uma correlação entre a intensidade da emissão e a concentração dos átomos nas amostras.

Para realizar essa medida, foi preparada uma solução contendo os nanomateriais a serem utilizados sob a concentração de 500 ppm em água destilada. Em seguida, 10 mL dessa solução são colocados em tubo de diálise (Sigma-Aldrich) com MWCO de 12000 Da, com diâmetro aproximado de 2,5 nm. Esse tubo é colocado, então, em um béquer contendo 40 mL de água destilada, com um volume final total de 50 mL, com concentração a 100 ppm. Após 48 horas, coleta-se 25 mL da parte da solução externa ao tubo de diálise, em tubo Falcon, para análise do ICP-OES, equipamento Thermo iCAP 6300 Duo ICP OES (Thermo Fisher Scientific). Foi construída uma curva de calibração com as concentrações de 0,005 mg/L a 2,0 mg/L. A Tabela 2 mostra as configurações do equipamento.

Tabela 2 – Parâmetros de configuração do ICP-OES para experimento de liberação de íons.

Parâmetros de análise	
Parameters	Setting
Sample Introduction Used	Nebulizer
Pump Tubing Type	Tygon Orange/White
Sample Flush Time (s)	30,00
Pump Stabilization Time (s)	5,00

Parâmetros de análise	
Nebulizer Gas Flow (L/min)	0,70
Auxillary Gas Flow (L/Min)	0,50
Flush Pump Rate (rpm)	50
RF Power (W)	1150
Analysis Pump Rate (rpm)	50
Coolant Gas Flow (L/Min)	12,00

Fonte: autor

A figura 8 mostra as membranas de diálise preparadas para o processo de difusão dos íons.

Figura 8 – Amostras preparadas para o processo de diálise. Após 48h, são coletados 10 mL da parte exterior às lâminas para avaliar a liberação de íons através dos poros da célula de diálise.



Fonte: autor

4.5 Ensaio biológico

4.5.1 Preparo das soluções de nanomateriais e de bactérias

Para este ensaio, foram preparadas 10 ml de cada uma de solução aquosa com os nanomateriais a uma concentração de 100 ppm em água esterilizada. Para obter uma dispersão satisfatória, as soluções com as nanoestruturas foram colocadas em banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas até uma concentração de 50 ppm na solução com as bactérias. Importante destacar que foram realizados ensaios pilotos em que se testaram concentrações diversas, obtendo a concentração de 50 ppm como a ideal para os testes desejados.

Durante os bioensaios foram utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29523) e de *Escherichia Coli*. Para conservação, elas foram colocadas em Caldo Muller Hinton (CMH) acrescidas de glicerol 20% e mantidas em freezer. Para a execução do experimento, as bactérias foram ativadas por meio da dispersão de 10 μL dessa solução concentrada com CMH obtendo um volume de 2 mL em tubo de ensaio. Essa solução mais diluída foi colocada em estufa a 37° por 18h.

Para tornar possível o cálculo das UFCs, após serem submetidas aos nanomateriais, o inóculo foi diluído em solução salina até que se obtivesse uma turvação de 0,5 na escala McFarland ($1,5 \cdot 10^8 \text{UFC/mL}$). Isso foi feito acrescentando-se gradativamente o inóculo à solução salina.

Os tubos contendo as substâncias e as bactérias, o controle contendo apenas água esterilizada foram envolvidos em papel alumínio e colocados em agitação a 37°C por 30 minutos para que ocorra a internalização do nanomaterial nas células das bactérias.

4.5.2 Grupo irradiado e grupo não irradiado

Após a internalização, utilizando a placa de 96 poços, dispersa-se um volume de 300 μL em cada poço. O grupo irradiado foi levado à exposição luminosa utilizando o painel de LED's ligado com luz azul (450 nm) à irradiância de $8,3 \text{ mW.cm}^{-2}$. A exposição luminosa durou 1,5 horas, resultando em uma dose de energia de $44,82 \text{ J.cm}^{-2}$. Em contrapartida, o grupo não irradiado foi mantido protegido da luz até o momento do plaqueamento.

4.5.3 Plaqueamento

Imediatamente após a irradiação, são feitos os plaqueamentos das bactérias. Na placa de 96 poços utilizada, são feitas duas novas diluições, de modo a obter uma solução final na proporção de 1:16 e em seguida 1:32 de bactérias.

Coloca-se, então 1 μL de cada uma das soluções (irradiadas e não irradiadas) em triplicata, nas placas Petri preparadas previamente com meio PCA (Ágar padrão para contagem). Espalha-se utilizando uma alça esterilizada de microbiologia por toda a placa. A placa de 96 poços e as placas Petri são, por fim, seladas com papel insulfilm para evitar contaminação das mesmas.

Em seguida, as placas Petri e a placa de 96 poços são colocadas em estufa à temperatura de 37°C para favorecer o crescimento das bactérias. Após 16 horas, as colônias já estarão formadas, e pode-se iniciar o processo de contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) que conseguiram se desenvolver.

4.5.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

Para a contagem das unidades formadoras de colônia, foram feitas imagens em resolução aproximada de 4032 \times 2268 (9,1 MP). Essas imagens são processadas utilizando o 'software' livre ImageJ e, em seguida as unidades são contadas individualmente utilizando o 'software' livre CellCounter.

Contadas as unidades em cada placa, podemos determinar a quantidade de Unidades formadoras de colônia (UFC's) por mL de solução à base de água, utilizando a fórmula da técnica "spread" plate" (PELCZAR, 1996):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias} \times 10}{\text{Diluição}} = \text{UFC}/\mu\text{L}$$

No caso, a diluição foi 1:32 e ainda multiplicamos o valor obtido pelo fator 10³ para obter o resultado em UFC/ml.

Para análise estatística e comparação dos resultados experimentais, foi utilizado o software Origin, através do qual foi aplicado o Teste-T de amostra em pares, comumente utilizado para verificar se há diferenciação estatística entre duas amostras, comparando suas médias e desvios padrões dentro de um raio de confiança previamente estabelecido ($p < 0,05$).

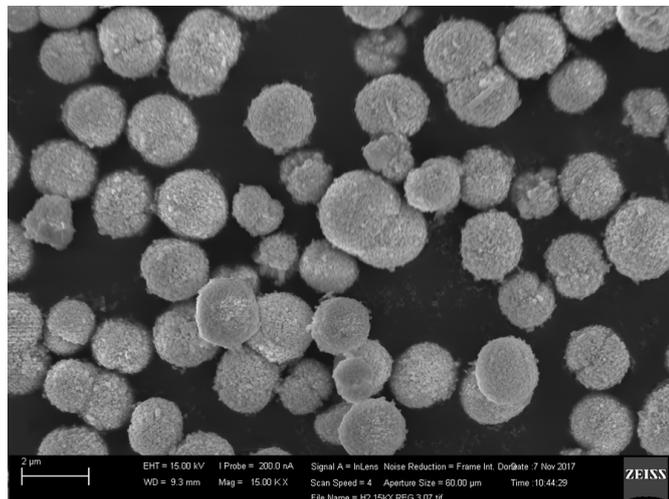
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica dos materiais

5.1.1 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

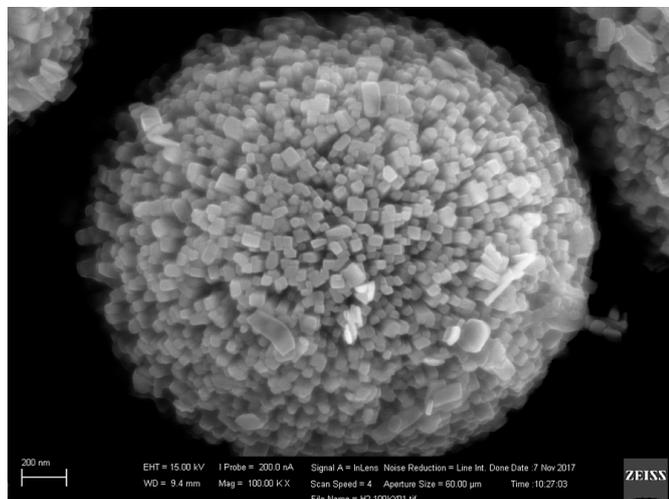
As morfologias dos nanomateriais foram analisadas utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nas figuras 9 e 10, podemos observar imagens da amostra CuBi_2O_4 (CBO)puro. A morfologia dessa amostra se apresenta em partículas com forma de nanopilares e nanocolunas que se arranjaram em formatos de microesferas com diâmetro médio de $2\ \mu\text{m}$.

Figura 9 – Imagem MEV da amostra CBO. Escala: $2\ \mu\text{m}$.



Fonte: autor

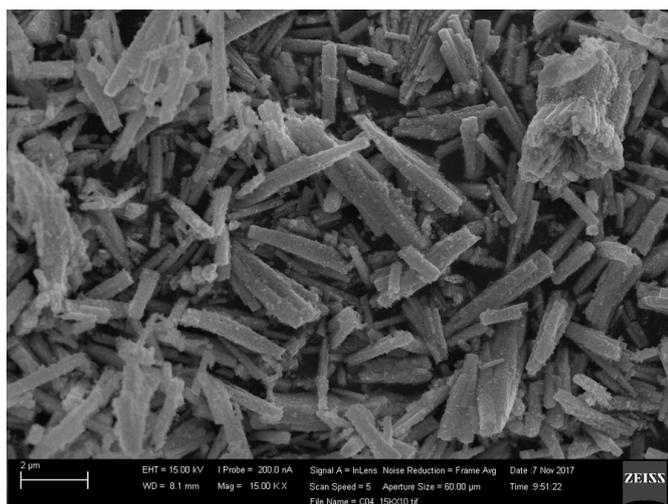
Figura 10 – Imagem MEV da amostra CBO. Escala: 200 nm.



Fonte: autor

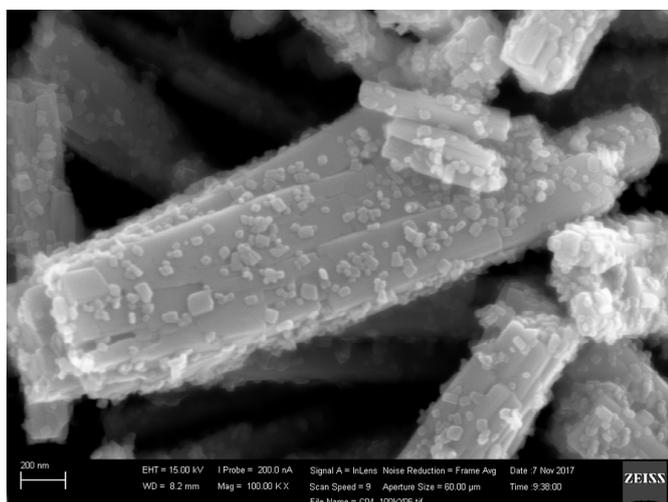
No entanto, observamos que a heterojunção CBO/CuO (Amostra HJ-E) contém nanopilares e nanocolunas de comprimento médio aproximado de 2 μm e 200 nm de diâmetro médio. Juntos, são encontrados menores grãos em formato paralelepípedo de cerca de 60 nm de tamanho, homoganeamente distribuídos ao longo da superfície das nanocolunas, conforme figuras 11 e 12.

Figura 11 – Imagem MEV da amostra HJ-E. Escala: 2 μm .



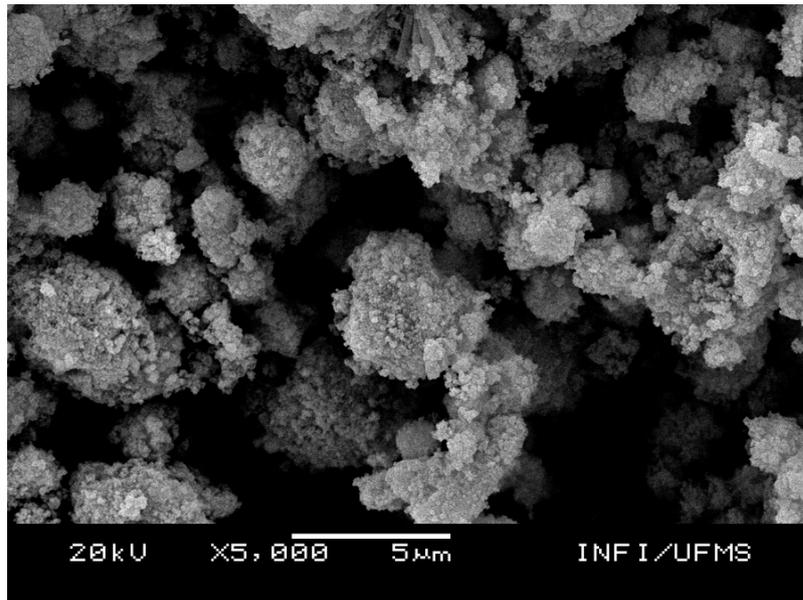
Fonte: autor

Figura 12 – Imagem MEV da amostra HJ-E. Escala: 200 nm.



Fonte: autor

A amostra HJ-C formou pequenos aglutinados semelhantes à morfologia da amostra HJ-E. No entanto, ocorreu uma formação ainda maior dos excessos de cobre em paralelepípedos. Podemos observar sua morfologia na figura 13.

Figura 13 – Imagem MEV da amostra HJ-C. Escala: 5 μm 

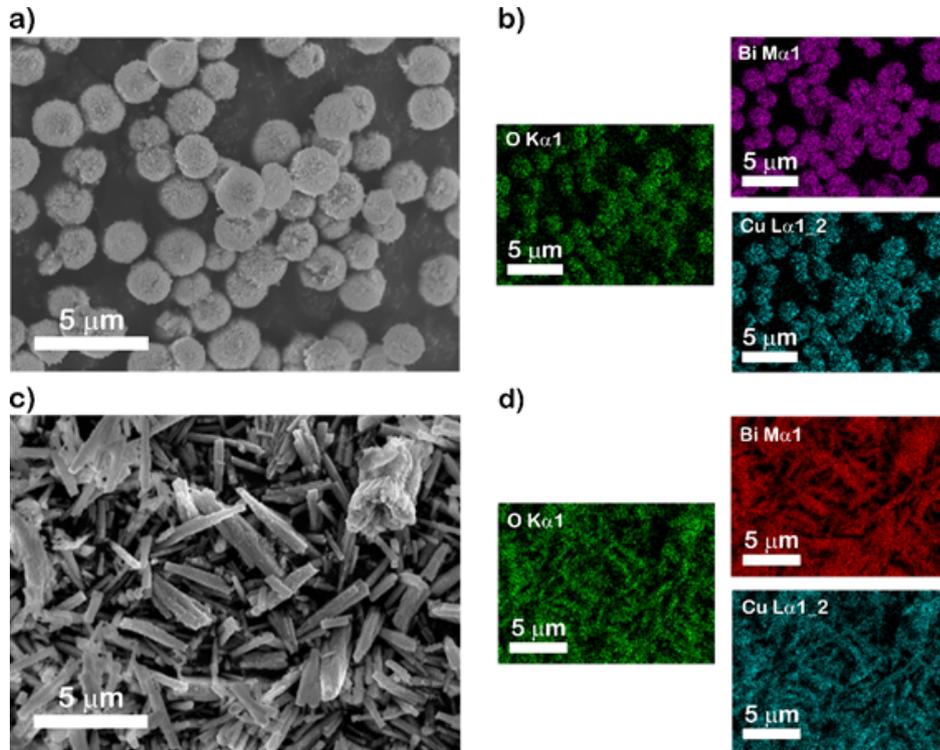
Fonte: autor

Como mostrado na Figura 14, utilizando-se a técnica EDS é possível identificar a composição química por meio da exposição a raios-X durante o mapeamento e captação de emissões atômicas, conseguimos identificar os elementos presentes nas amostras. Os elementos cobre, oxigênio e bismuto estão homogeneamente distribuídos ao longo de toda a superfície dos materiais, em todas as amostras.

Quantificando as emissões, observa-se uma razão atômica Bi:Cu igual a 2:1,2 para o CBO puro e 2:2,2 para a heterojunção HJ-E. Isso mostra que, de fato, há uma quantidade maior de Cobre na heterojunção quando em comparação com a amostra pura, e a mesma é próxima da relação estequiométrica esperada.

Observando ainda as imagens obtidas pela técnica EDS, observa-se uma concentração ainda maior de Cobre quando a região selecionada são os pequenos nanoparalelepípedos na superfície dos nanotubos da amostra HJ-E. Isto indica que essas partes menores são formadas quase que exclusivamente de nanopartículas de CuO, o que é confirmado pela análise do DRX. Na amostra HJ-E, observa-se um contato melhor entre os dois semicondutores, formando uma heterojunção semicondutora que favorece a separação de cargas e dificulta muito a recombinação dos pares elétrons-buraco.

Figura 14 – Imagens EDS das amostras. (a) e (b): CBO puro; (c) e (d): Heterojunção CBO/CuO (Amostra HJ-E).



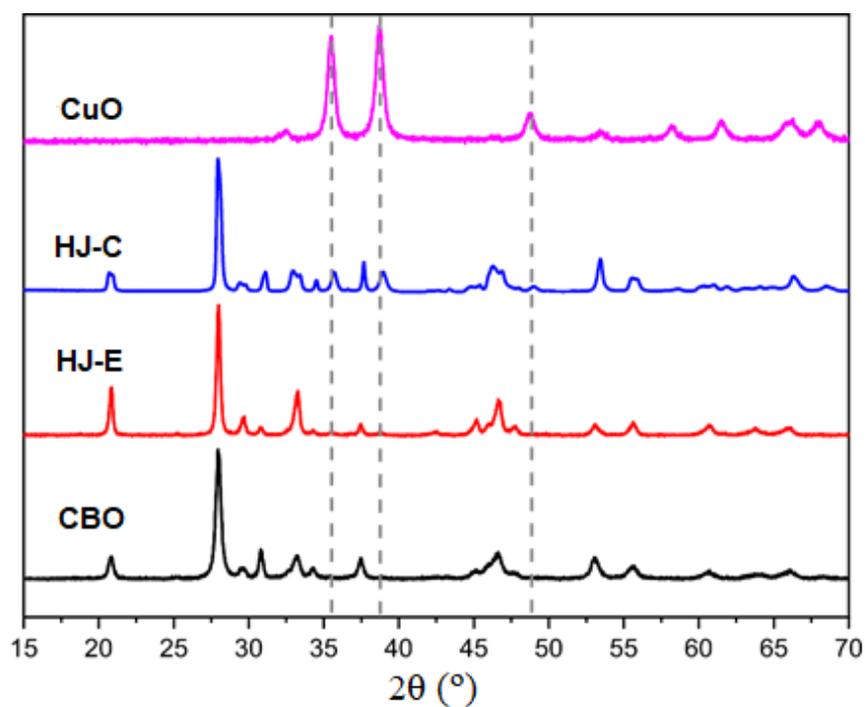
Fonte: LNNA - UFMS

5.1.2 Difração de Raio-X (DRX)

Para determinar a estrutura cristalina dos materiais, a Figura 15 mostra os difratogramas para o CuO (a), HJ-C (b), HJ-E (c) CBO (d). CuO apresentou fase monoclinica (grupo espacial C2/c código ICSD N° 29-1387), sem sinal de outras impurezas cristalinas. O padrão de difração do CBO concorda com a fase tetragonal do CuBi_2O_4 (grupo espacial P4/ncc, código ICSD N° 01-072-0493).

Para as heterojunções, conseguimos observar uma mistura dos padrões das fases cristalinas de CuO e CuBi_2O_4 . Observa-se também na Figura 15 que há picos mais intensos (linhas pontilhadas) correspondentes ao CuO na amostra HJ-C, quando em comparação com a amostra HJ-E, explicado pelo excesso de CuO induzido na etapa de síntese. (NOGUEIRA et al., 2019)

Figura 15 – Difratomogramas de Raio-X (DRX) dos materiais utilizados.



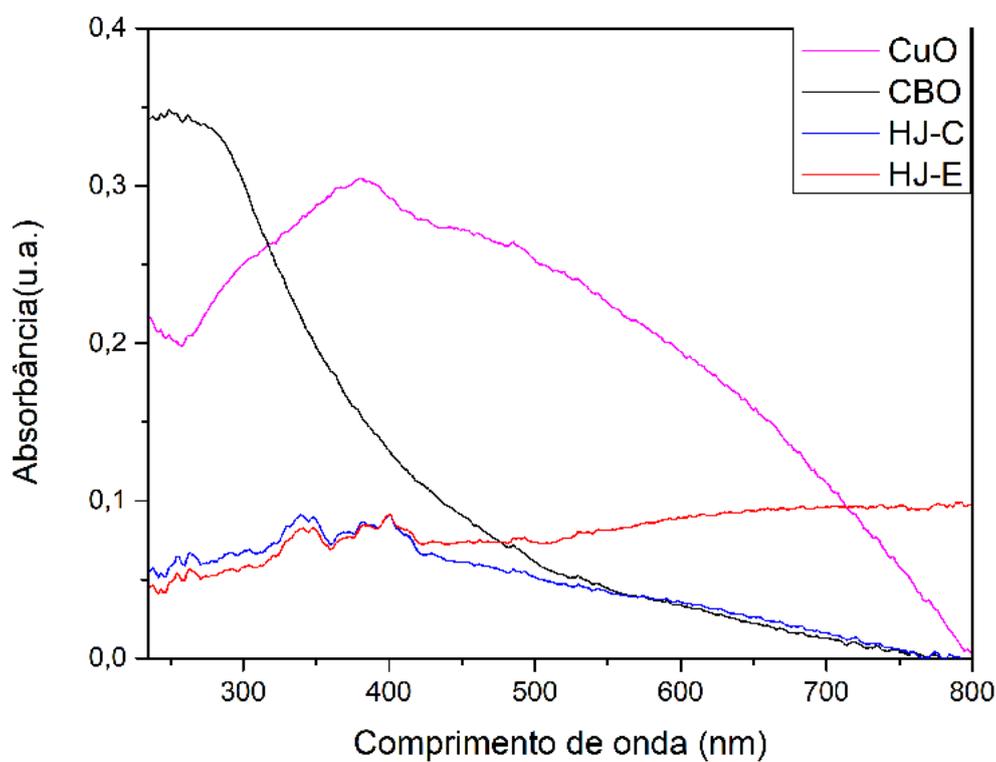
Fonte: autor

5.2 Caracterização óptica dos materiais

5.2.1 Espectros de Absorção UV-Vis

Para avaliar a capacidade de interagir com a luz dos nanomateriais, é necessário verificar a absorção luminosa por comprimento de onda que os mesmos apresentam. Para isso, foi utilizada a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis, avaliando a interação desse tipo de radiação com a amostra em solução. Os espectros dos quatro materiais utilizados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras estudadas.



Fonte: autor

Podemos observar que todas as amostras apresentam absorção na região do ultravioleta-visível. As amostras, em geral, apresentam maior absorção para ondas mais energéticas, como as de cor azul (450 nm) e violeta (abaixo de 400 nm).

Como os ensaios biológicos foram feitos com luz azul (450 nm), podemos observar que as amostras CuO e CBO são aquelas que possuem maior absorbância. Isso quer dizer que uma quantidade maior de fótons são absorvidas por essas amostras. Os espectros observados das amostras CuO e CBO confirmam os encontrados na literatura. (WANG et al., 2002) (EL-TRASS et al., 2012)(HAHN et al., 2012).

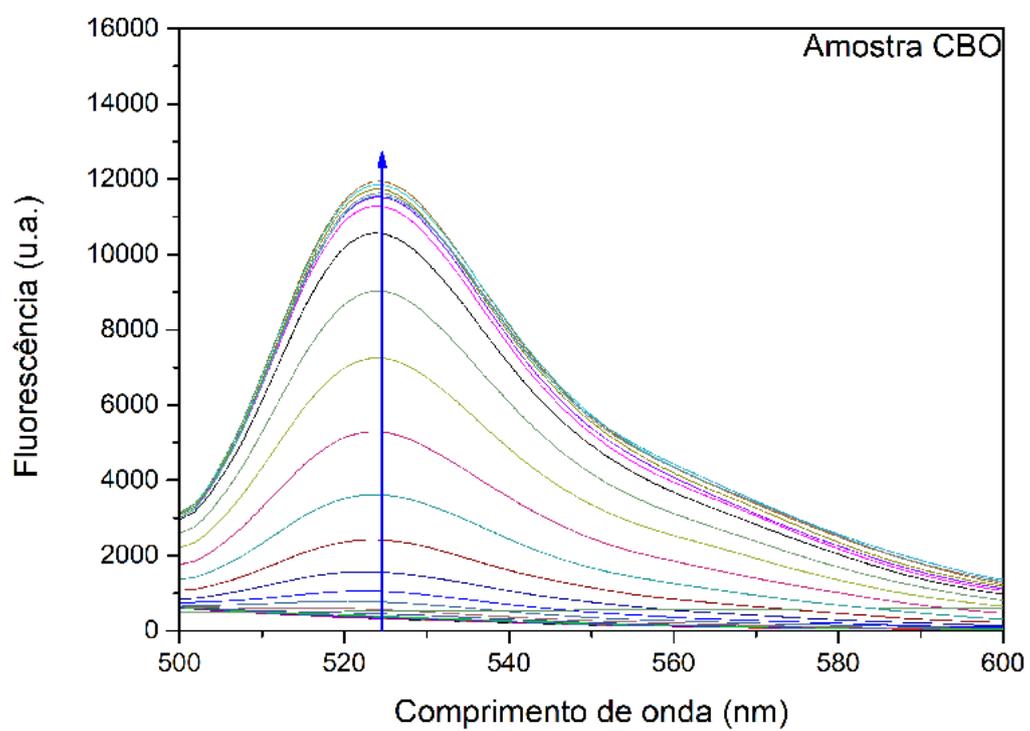
Podemos observar também que as amostras HJ-E e HJ-C possuem uma interação similar com a luz para comprimentos de onda inferiores a 400 nm. No entanto, nota-se uma maior absorção na região de 500 a 800 nm por parte da amostra HJ-E.

5.3 Avaliação do potencial tóxico e citotóxico

5.3.1 Ensaios de produção de EROs

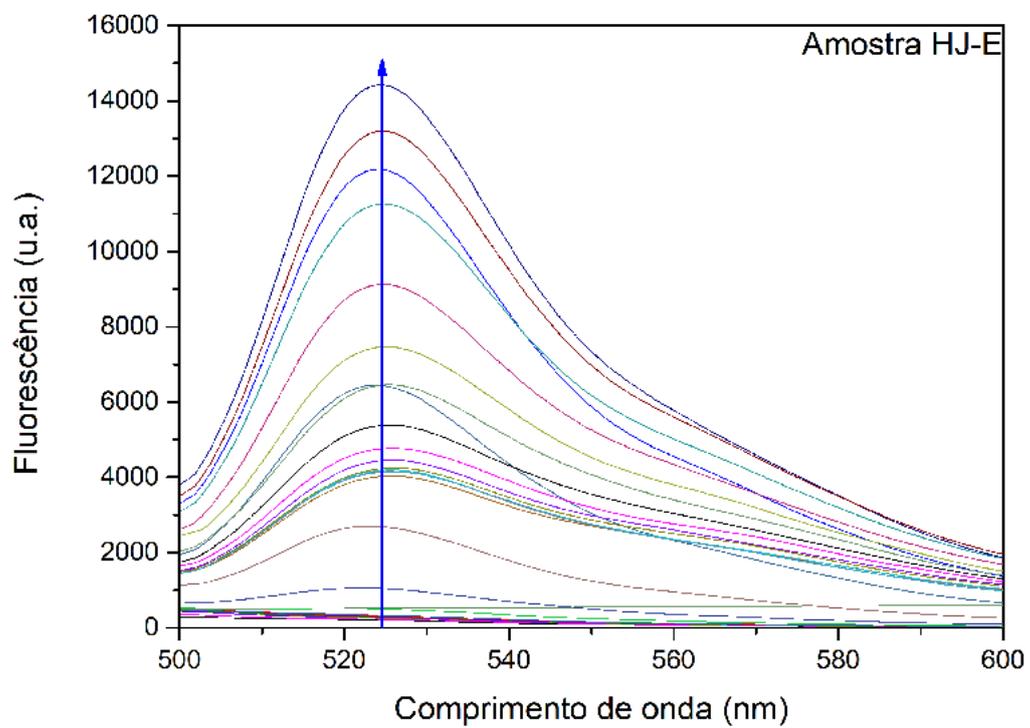
Nesse ensaio, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio dos nanomateriais através da obtenção da técnica de fluorescência de um derivado da sonda DCFH-DA.

Figura 18 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra CBO.

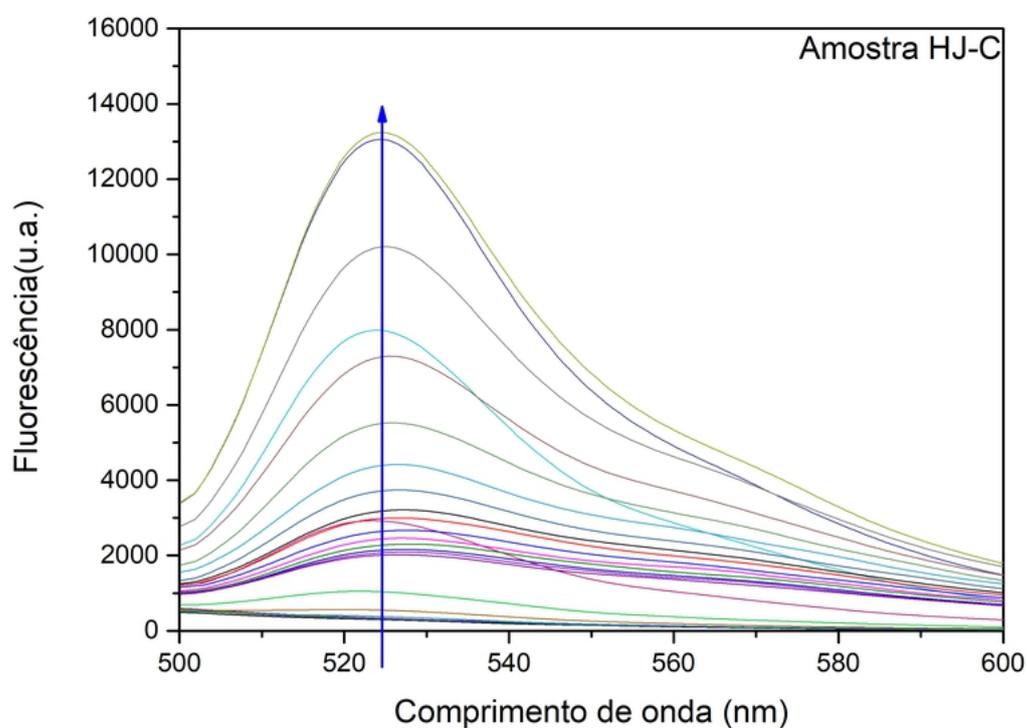


Fonte: autor

Figura 19 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra HJ-E.



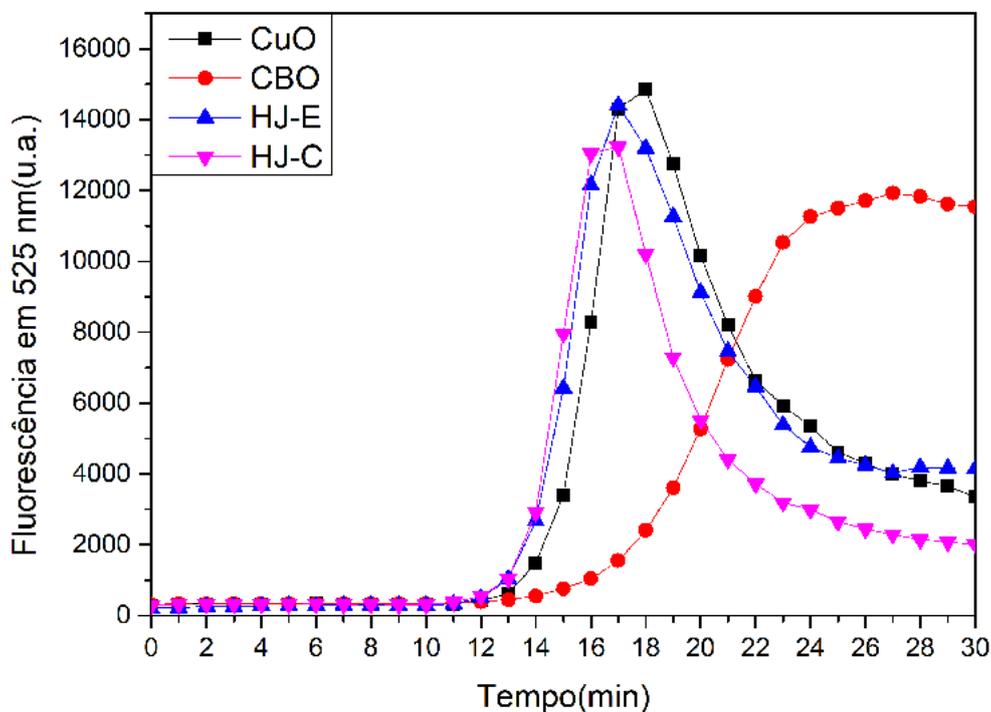
Fonte: autor

Figura 20 – Espectros de fluorescência do ensaio de ERO com DCFH-DA para a amostra HJ-C.

Fonte: autor

A Figura 21 mostra a evolução temporal dos picos de fluorescência da solução (em 525 nm) com cada uma das quatro amostras usadas no experimento. Nos 10 primeiros minutos, as amostras não foram expostas à radiação, o que mostra que o efeito de produção de EROs são dependentes da irradiação.

Figura 21 – Este gráfico mostra a evolução dos picos de fluorescência em 525 nm em função do tempo de exposição à luz. Nos primeiros 10 minutos, as amostras permaneceram sem irradiação.



Fonte: autor

Conseguimos perceber que a evolução das amostras CuO e as heterojunções HJ-E e HJ-C ocorrem de maneira bem semelhante, atingindo seu pico em torno de 7 e 8 minutos após o início da irradiação. No entanto, a amostra CBO tem uma dinâmica mais lenta, porém, mais estável. Cabe ressaltar que a diminuição dos picos de fluorescência está relacionada com o consumo total da espécie fluorescente, o DCF produzido após a interação do DCFH-DA com as EROs produzidas pelos nanomateriais, indicando que o mesmo foi degradado (ou fotodegradado) após um determinado tempo depois de sua formação.

5.3.2 Liberação de íons

Para avaliar o potencial de toxicidade de nanoestruturas via liberação de íons, foi avaliado a liberação dos íons Cu e Bi em solução aquosa por meio do experimento de diálise e os íons liberados foram quantificado pelas análises de ICP-OES conforme descrito na seção 4.4. Para os íons de Bismuto, o resultado está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Liberação de íons de Bismuto em 48h.

Amostras	Concentração liberada de íons (ppm)	Concentração inicial de íons (ppm)	% liberada	Desvio Padrão
HJ-C	0,1467	100	0,1467%	0,003
HJ-E	0,0398	100	0,0398%	0,006
CBO	0,0329	100	0,0329%	0,003

Fonte: autor

Podemos notar dos resultados, que a liberação de íons das amostras é inferior a 0,2% em todas as amostras que contêm Bismuto, o que sugere que quaisquer efeitos citotóxicos decorrentes dessas liberações tem efeitos relevantes em torno de 50 ppm (LUO et al., 2012). Podemos notar, também, que a emissão de liberação de íons de HJ-C foi significativamente superior às das demais amostras, para um limite de confiabilidade de $p < 0,05$.

Para os íons de Cobre, a liberação pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 – Liberação de íons de Cobre em 48h.

Amostras	Concentração liberada de íons (ppm)	Concentração inicial de íons (ppm)	% liberada	Desvio Padrão
CuO	0,1020	100	0,1020%	0,001
HJ-C	0,0924	100	0,0924%	0,001
HJ-E	0,0312	100	0,0312%	0,0001
CBO	0,1101	100	0,1101%	0,0007

Fonte: autor

Observamos também uma liberação próxima de 0,1% de íons de Cobre, o que mostra que, em 48h, a liberação de íons não tem um papel principal no mecanismo de inativação das bactérias, tendo em vista que poucos íons são liberados em solução. Apesar dessa baixa liberação, comparativamente entre as amostras, a amostra HJ-E apresentou valores ainda menores em relação aos demais, o que demonstra que o potencial tóxico por liberação de íons dessa amostra é ainda menos intenso.

No entanto, cabe ressaltar que ainda podemos ter um efeito químico caso as bactérias se adsorvam na superfície dos materiais, causando transferências eletrônicas sem que haja, necessariamente, a emissão de íons tóxicos.

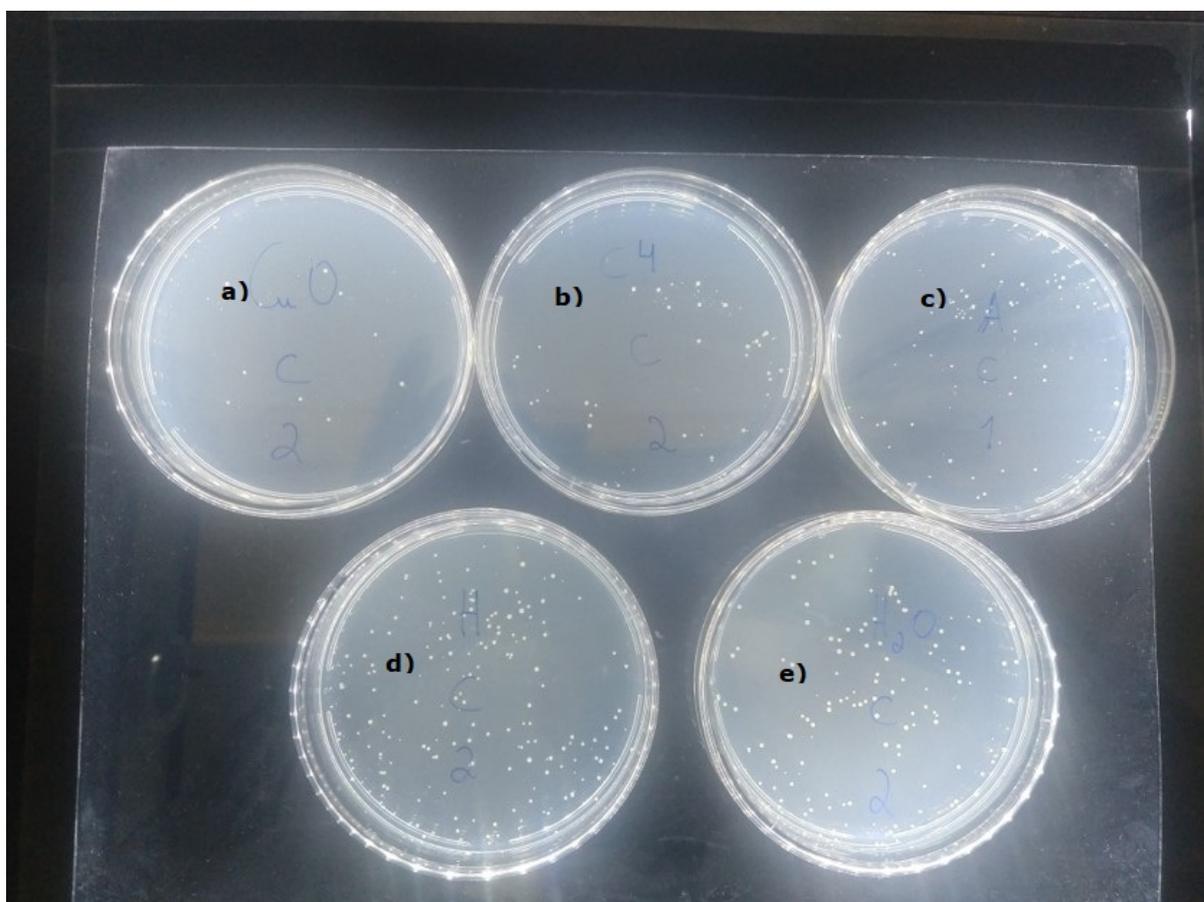
5.4 Ensaios biológicos

Nestes ensaios, avaliamos a capacidade dos materiais em promover a inibição do crescimento de bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*) na ausência da luz e sob irradiação luminosa, determinando assim suas potenciais atividades antimicrobiana e fotoantimicrobiana, respectivamente.

5.4.1 Ensaio com *Saureus*

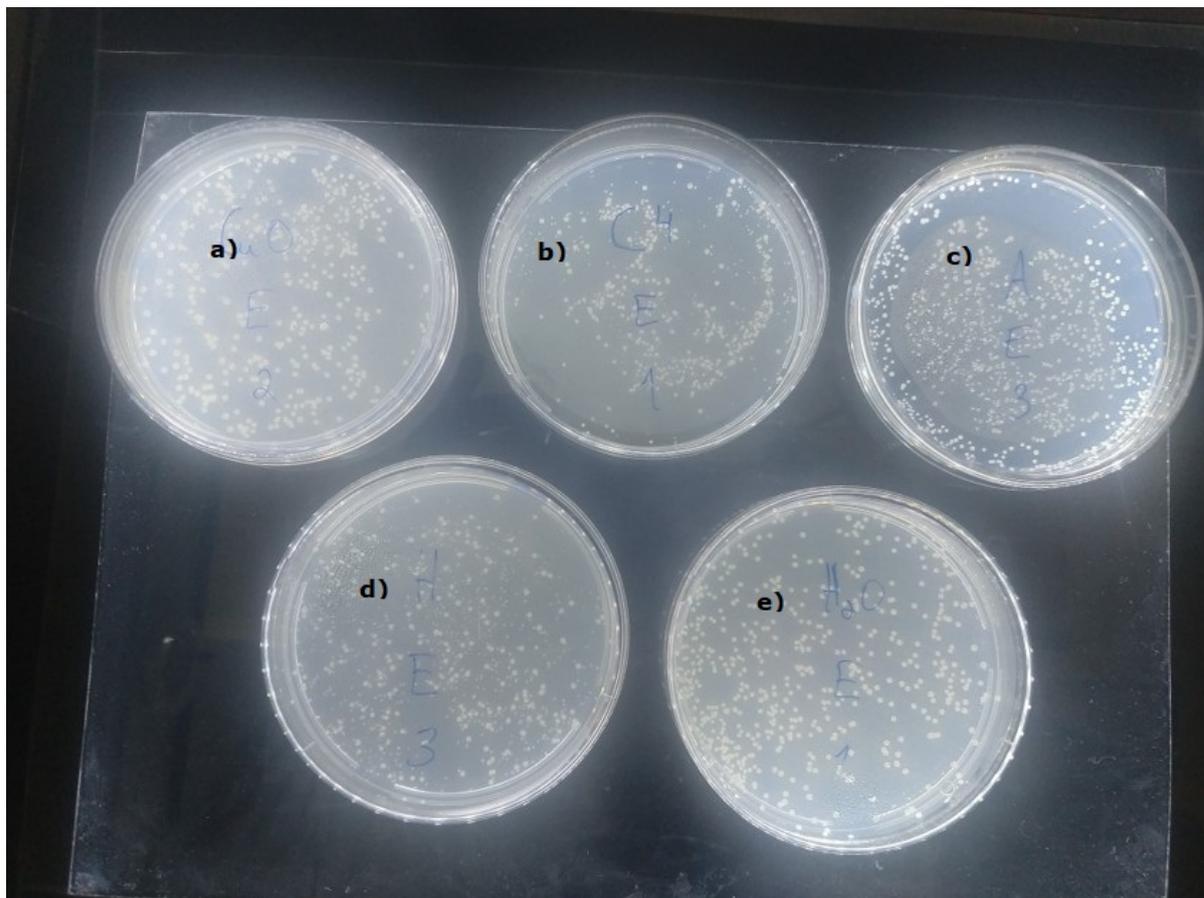
As Figuras 22 e 23 apresenta imagens representativas, em placa de Petri, das UFC da *S. aureus* quando submetidas aos nanomateriais na ausência e presença da irradiação da luz azul. Os resultados demonstram que apenas a luz azul já induz uma redução do crescimento bacteriano. Todavia, nota-se também que as nanoestruturadas CuO, HJ-E e HJ-C apresentaram ações fotoantimicrobiana induzindo uma inibição de crescimento maior do que o grupo submetido somente a luz. Com respeito às amostras não irradiadas, os resultados revelaram que elas se comportam de modo semelhante ao controle (H₂O), sugerindo que não há efeito de inibição do crescimento das bactérias promovido pelos nanomateriais na ausência da luz, ou seja, não foram bactericidas na concentração testada.

Figura 22 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras irradiadas. Os rótulos correspondentes são: CuO (a), HJ-E (b), HJ-C (c), CBO (d) e HO (e)



Fonte: autor

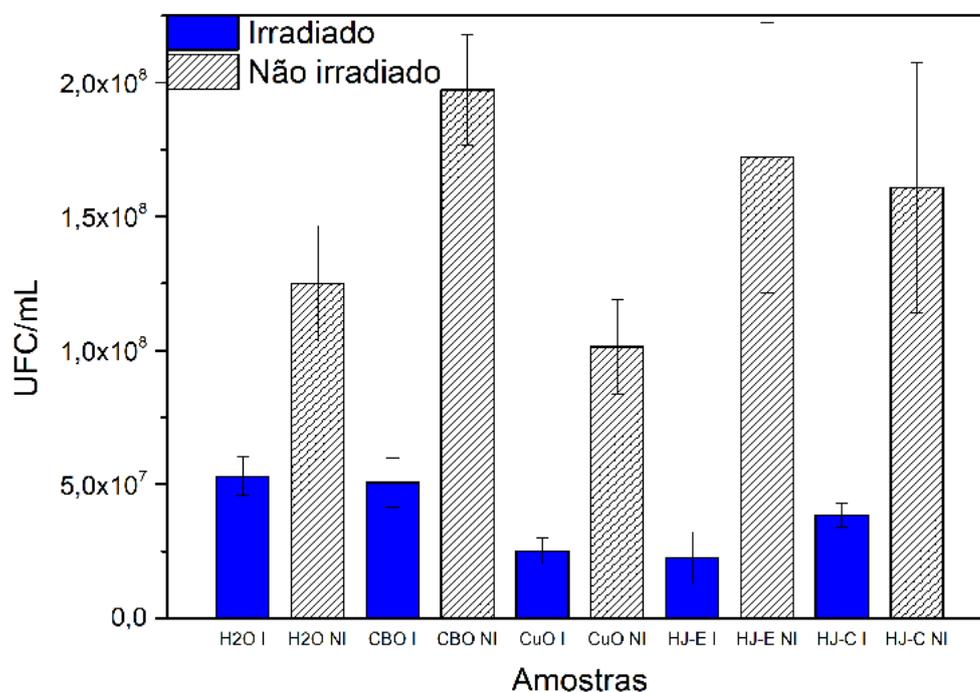
Figura 23 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras não irradiadas. Os rótulos correspondentes são: Cuo (a), HJ-E (b), HJ-C (c), CBO (d) e HO (e).



Fonte: autor

Na Figura 24, podemos observar os dados de UFC/mL de cada uma das amostras, tanto das amostras irradiadas, quanto das não irradiadas, em média, bem como seus desvios padrões. Notamos que 3 das 4 amostras irradiadas que continham os nanomateriais apresentaram, em média, um crescimento bacteriano menor, evidenciando um efeito bacteriostático decorrente da ativação do mecanismo fotodinâmico, uma vez que esse efeito foi mais evidente na presença de luz. A amostra CBO foi a única que não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Isso pode ser justificado pela liberação mais lenta de EROs como evidenciado na seção 5.3.1

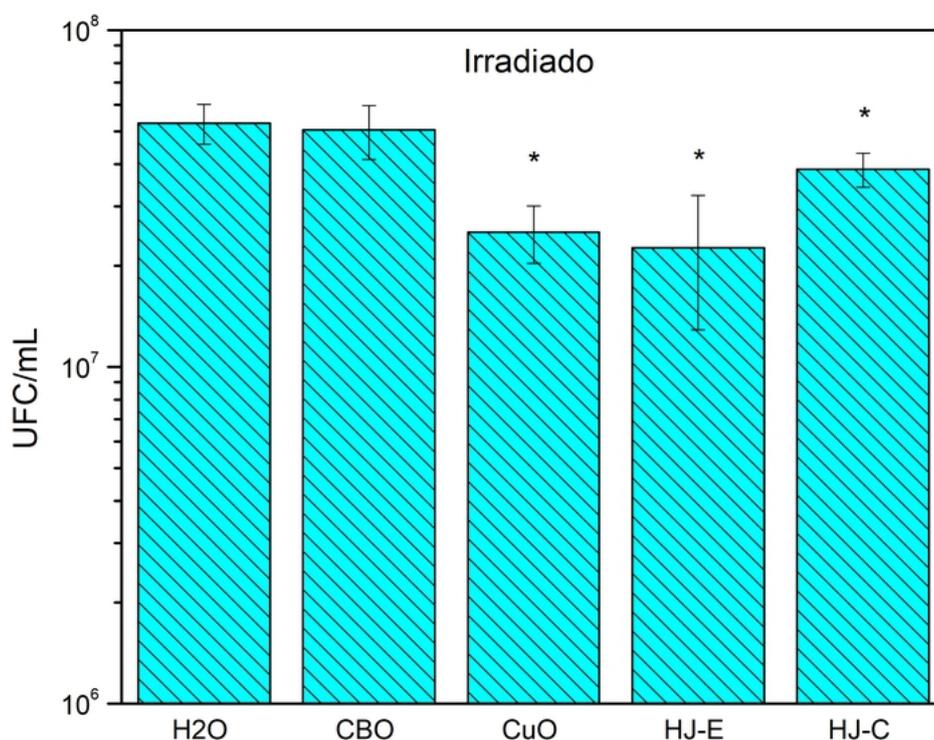
Figura 24 – Contagem de UFC/mL de *S. aureus* submetidas aos nanomateriais na presença e ausência da luz azul.



Fonte: autor

Para verificar se há diferenciação estatística entre as amostras irradiadas e o controle (H₂O), foi executado o Teste-T em pares. Na Figura 25 podemos ver os resultados obtidos desta análise, com escala logarítmica. As amostras que apresentaram significativa diferenciação estatística estão representadas com “**”.

Figura 25 – Valores médios das UFC/mL de *S. aureus* submetidas aos nanomateriais na presença de irradiação da luz azul. As amostras com “*” são aquelas que apresentam significativa diferenciação estatística em relação ao controle seguindo o Teste-T para $p < 0,05$.



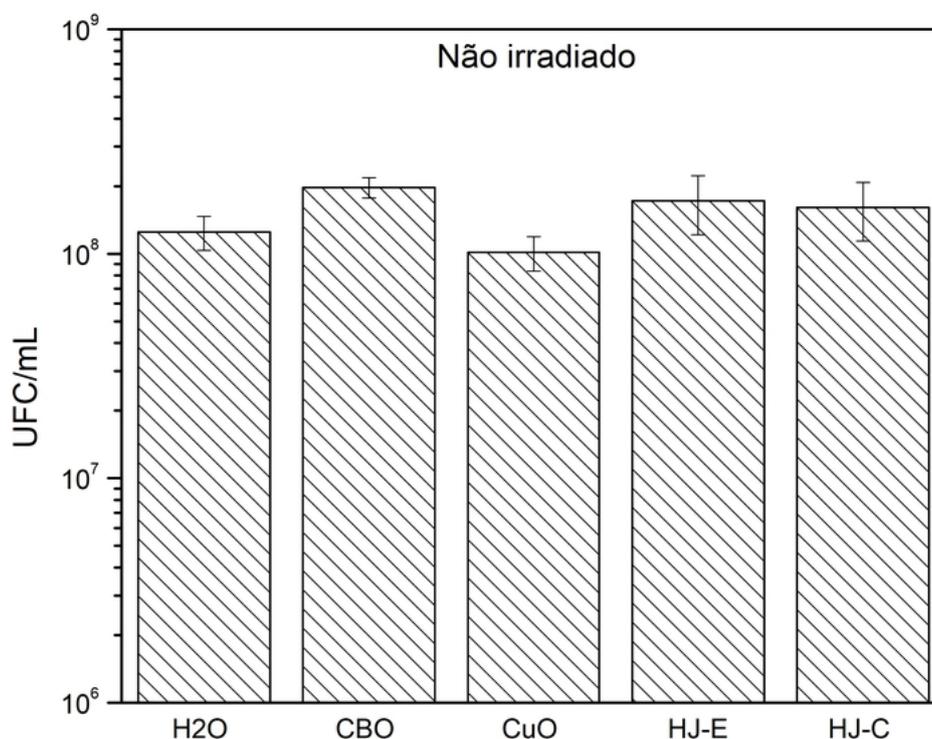
Fonte: autor

Podemos observar, então, que das quatro amostras utilizadas, apenas a amostra CBO não apresentou um efeito fotobacteriostático significativamente relevante em relação àquele induzido pelos fluoróforos endógenos das próprias bactérias *S. aureus*.

As amostras CuO e HJ-E foram as que apresentaram melhores efeitos bacteriostáticos promovidos pela luz, tendo um crescimento menor das colônias. No entanto, entre si, não há significativas diferenças estatísticas entre as amostras, feito o Teste-t.

Para verificar se o efeito é dependente da ação da luz, bem como identificar possíveis mecanismos de inativação bacteriana não induzidos por processos fotodinâmicos, verificasse o desenvolvimento das bactérias sem que sejam submetidas à ação da luz. Na Figura 26 Vemos o resultado do ensaio em escala logarítmica para a contagem de UFC/mL que se desenvolveram.

Figura 26 – Valores médios das UFC/mL de *S. aureus* não irradiadas. Não houve significativa diferença estatística entre nenhuma das amostras, feito o Teste-t.

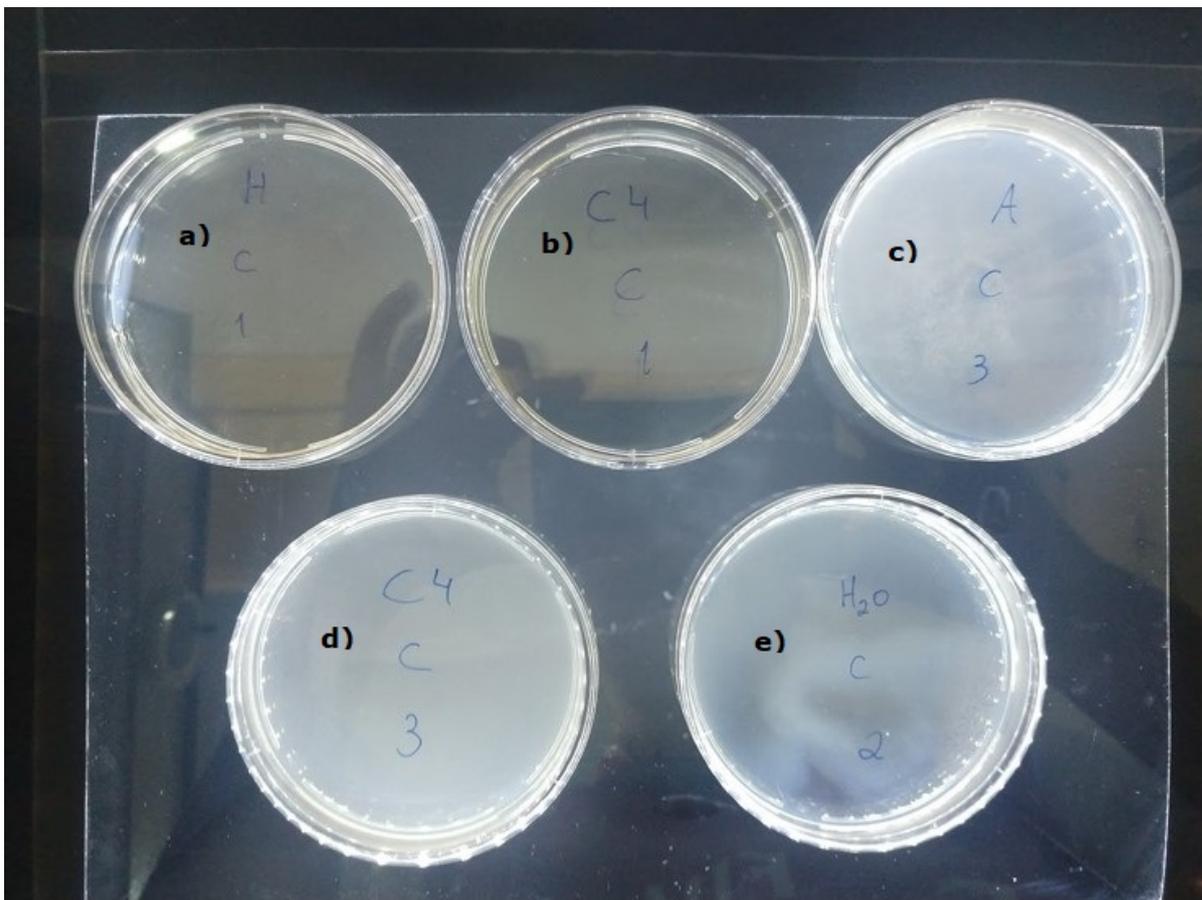


Fonte: autor

Ao realizar o Teste-t comparando as amostras CBO, CuO, HJ-E e HJ-C com o controle H₂O, verificou-se que, em um raio de confiança de $p < 0,05$, não há diferenciação estatística entre as amostras e o grupo controle. Este resultado nos diz que os efeitos químicos induzidos pelas nanopartículas que não são iniciados pela luz têm um efeito desprezível, concordante com o resultado do ensaio de liberação de íons.

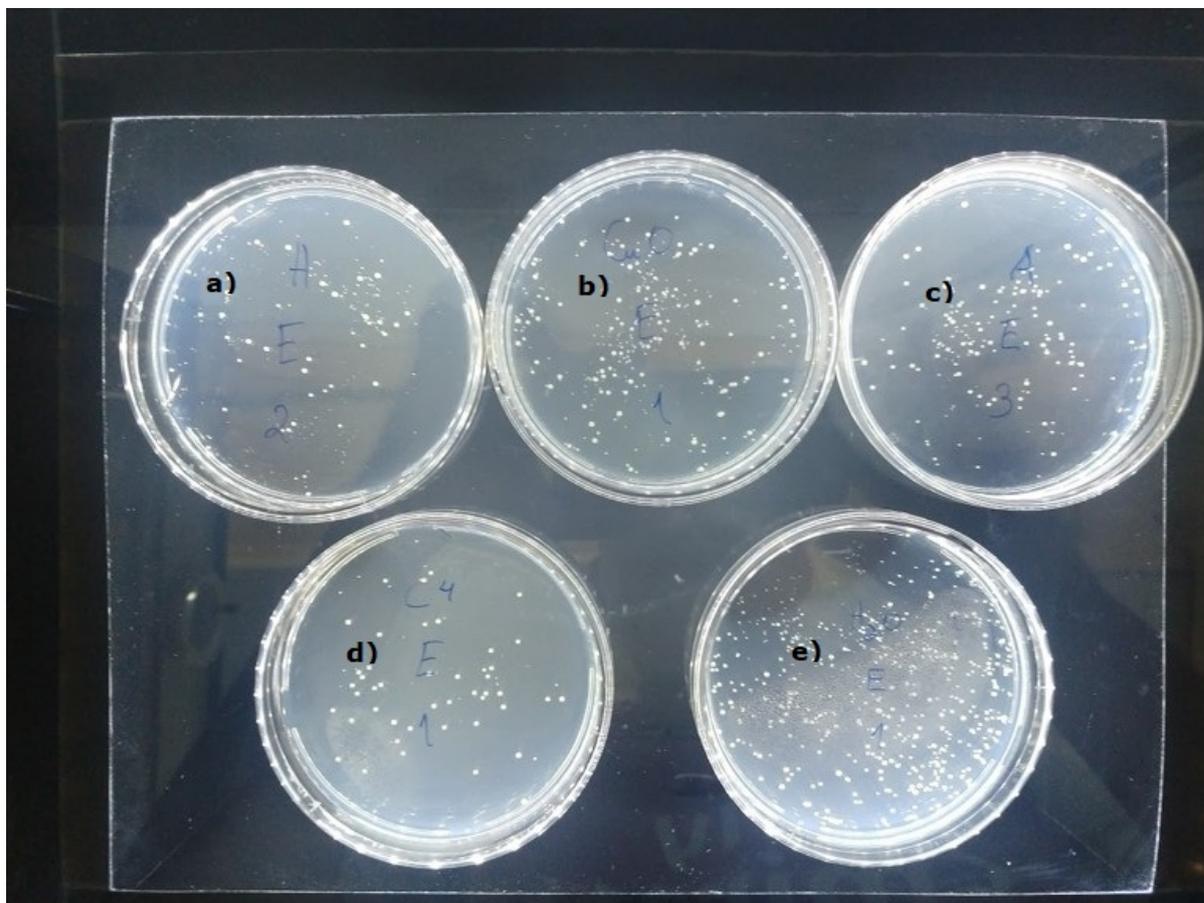
A fim de verificar um efeito temporal pós-irradiação, tanto as amostras irradiadas quanto não irradiadas foram submetidas a um segundo plaqueamento, realizado 24h após o fim do processo de irradiação. Os resultados podem ser observados nas Figuras 27 e 28.

Figura 27 – Amostras com *S. aureus* irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Os rótulos correspondentes são: CBO (a), CuO (b), HJ-C (c), HJ-E (d), HO (e).



Fonte: autor

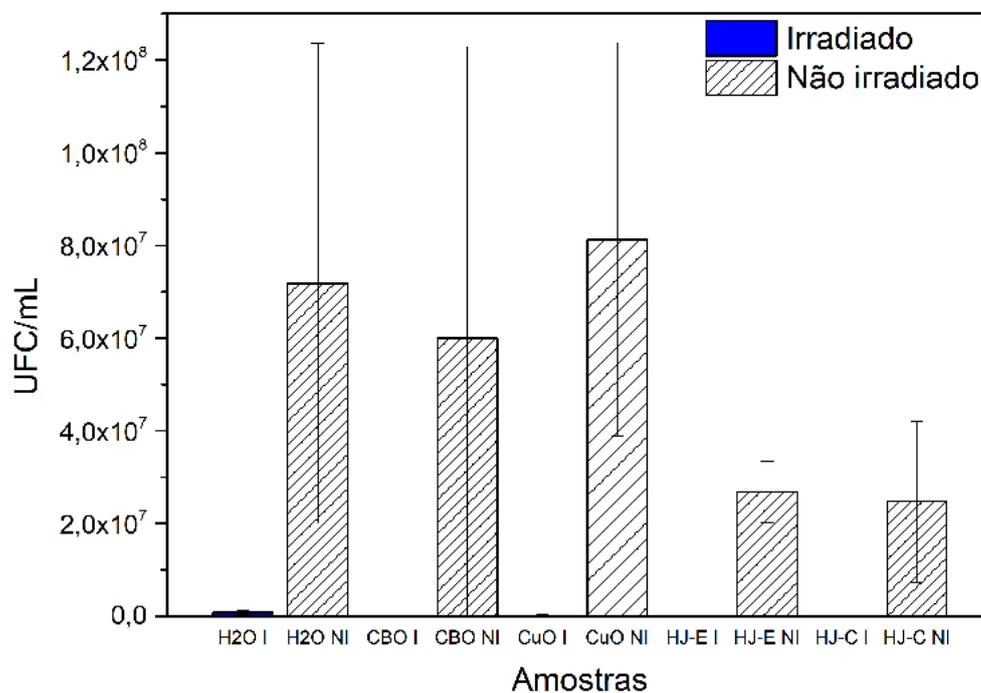
Figura 28 – Amostras com *S. aureus* não-irradiadas e plaqueadas 24h após a dispersão dos nanomateriais. Os rótulos correspondentes são: CBO (a), CuO (b), HJ-C (c), HJ-E (d), HO (e).



Fonte: autor

Observando a Figura 27, vemos que houve um efeito bactericida por parte de todos os nanomateriais, e inclusive da ação exclusiva da luz, uma vez que a amostra controle também foi inativada. A Figura 28, por sua vez, mostra que esse efeito bactericida é parcialmente químico, uma vez que houve crescimento de todas as amostras, crescimento este visualmente menor do que as da amostra controle. Nas figuras 29, 30 e 31, podemos observar os gráficos correspondentes.

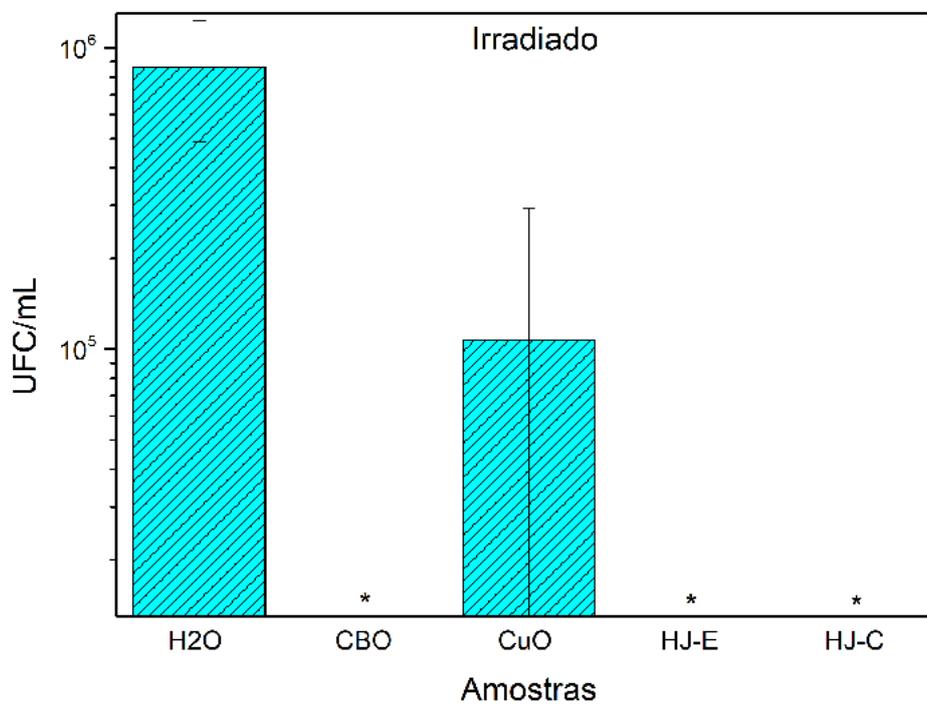
Figura 29 – Contagem de UFC/mL de *S. aureus* submetidas aos nanomateriais na presença e ausência da luz azul, plaqueadas 24h após o dano da irradiação.



Fonte: autor

Na figura 29, vemos comparativamente os valores de UFC's por mL de solução de bactérias plaqueadas após 24h da irradiação. Notamos que comparativamente, as amostras irradiadas apresentaram crescimento diminuído, confirmando o efeito bacteriostático observado na figura 27.

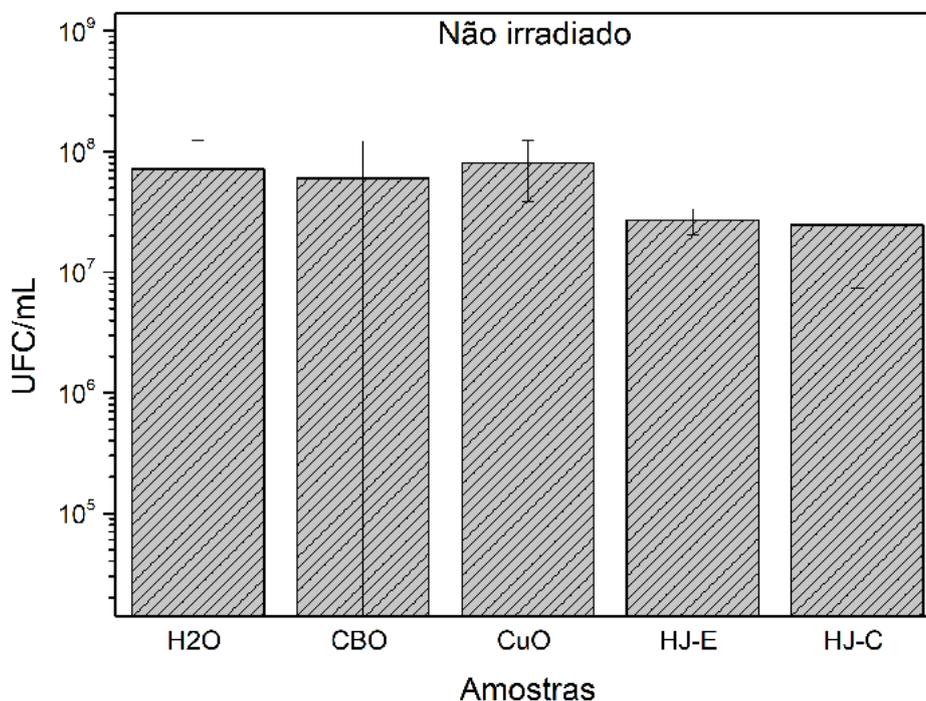
Figura 30 – Valores médios das UFC/mL de *S. aureus* submetidas aos nanomaterias na presença de irradiação da luz azul, plaqueadas 24h após o dano da irradiação.



Fonte: autor

Analisando a figura 30, vemos a confirmação do efeito bactericida sob essas condições em relação ao controle. Todas as amostras são significativamente diferentes do controle, exceto a amostra CuO, que não apresentou diferença significativa.

Figura 31 – Valores médios das UFC/mL de *S. aureus* não irradiadas, plaqueadas 24 horas após o dano da irradiação. Não houve significativa diferença estatística entre nenhuma das amostras, feito o Teste-t.



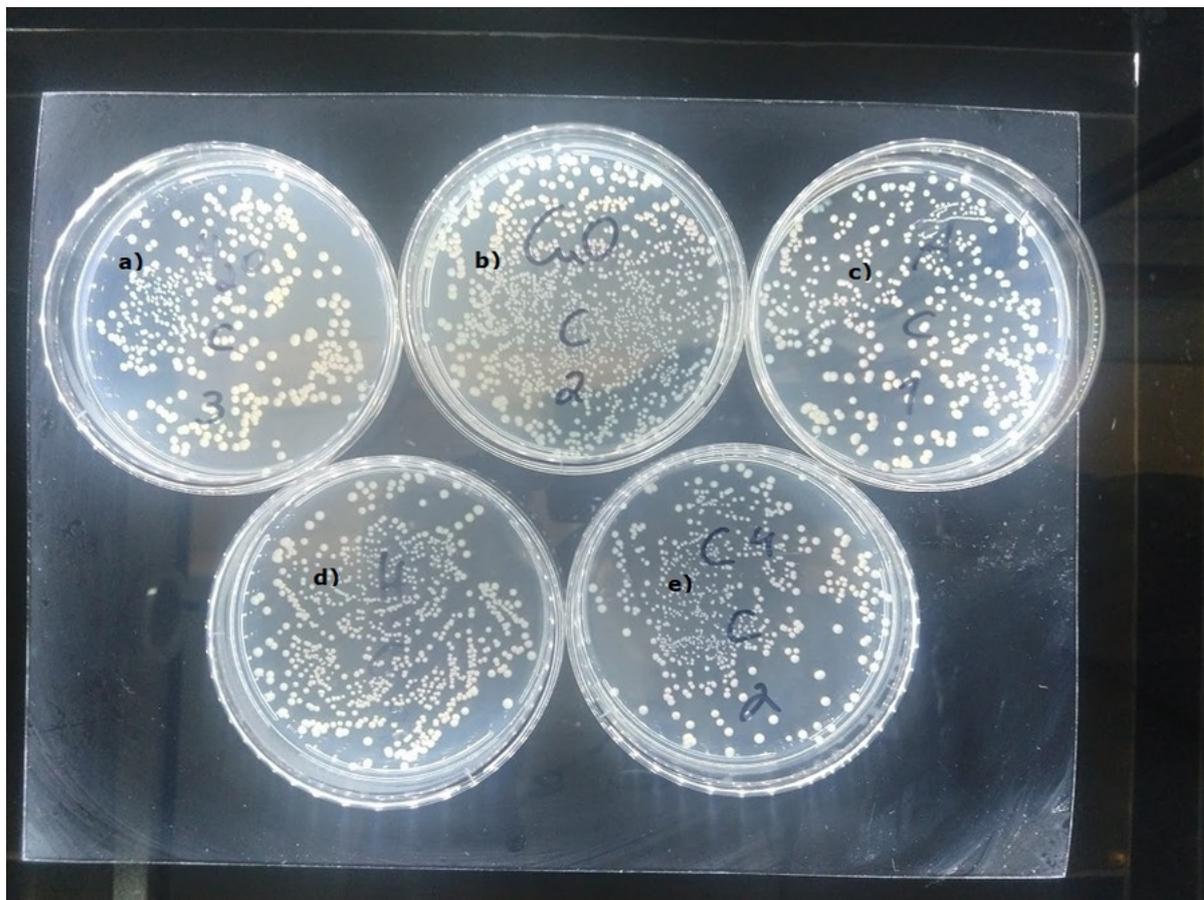
Fonte: autor

Na figura 31, vemos que mesmo com o plaqueamento 24h após a irradiação, não houve significativa diferença entre o uso das amostras e o controle. O que evidencia uma baixa atividade química não induzida opticamente para as quatro amostras testadas. Mais uma vez, esse resultado corrobora que o efeito bactericida é condicionado à presença da irradiação.

5.4.2 Ensaios com *E. coli*

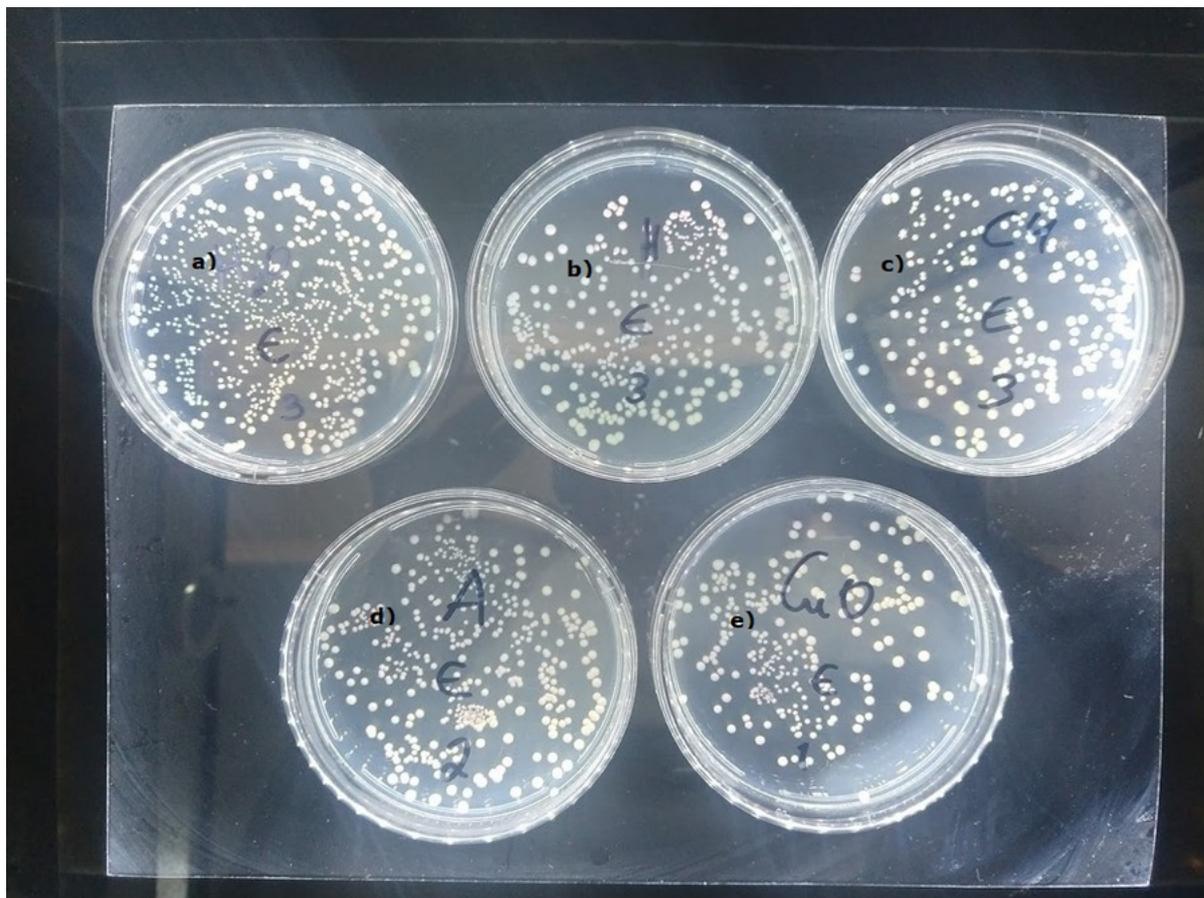
As Figuras 32 e 33 apresentam imagens representativas, em placa de Petri, das UFC da *E. coli* quando submetidas aos nanomateriais na ausência e presença da irradiação da luz azul.

Figura 32 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras de *E. coli* irradiadas. Os rótulos correspondentes são: HO (a), CuO (b), HJ-C (c), CBO (d) e HJ-E (e).



Fonte: autor

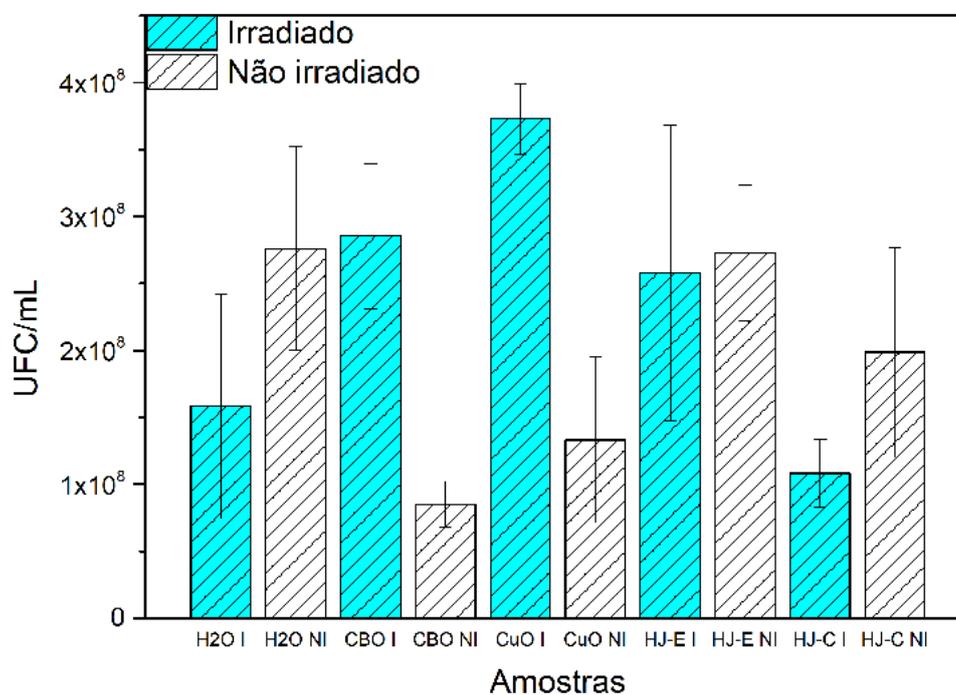
Figura 33 – Imagem ilustrativa do crescimento das amostras de *E. coli* não-irradiadas. Os rótulos correspondentes são: HO (a), CBO (b), HJ-E (c), HJ-C (d) e CuO (e).



Fonte: autor

Na figura 34 é apresentado os valores das contagens de UFC/mL das amostras. Nessa vista inicial, podemos comparar as colunas azuladas e observamos que quantitativamente, a maioria das amostras apresentou um desenvolvimento bacteriano ligeiramente facilitado pelo uso dos nanomateriais, exceto pela amostra HJ-C.

Figura 34 – Valores médios das UFC/mL de *E. coli* submetidas aos nanomateriais na ausência e presença de irradiação da luz azul.

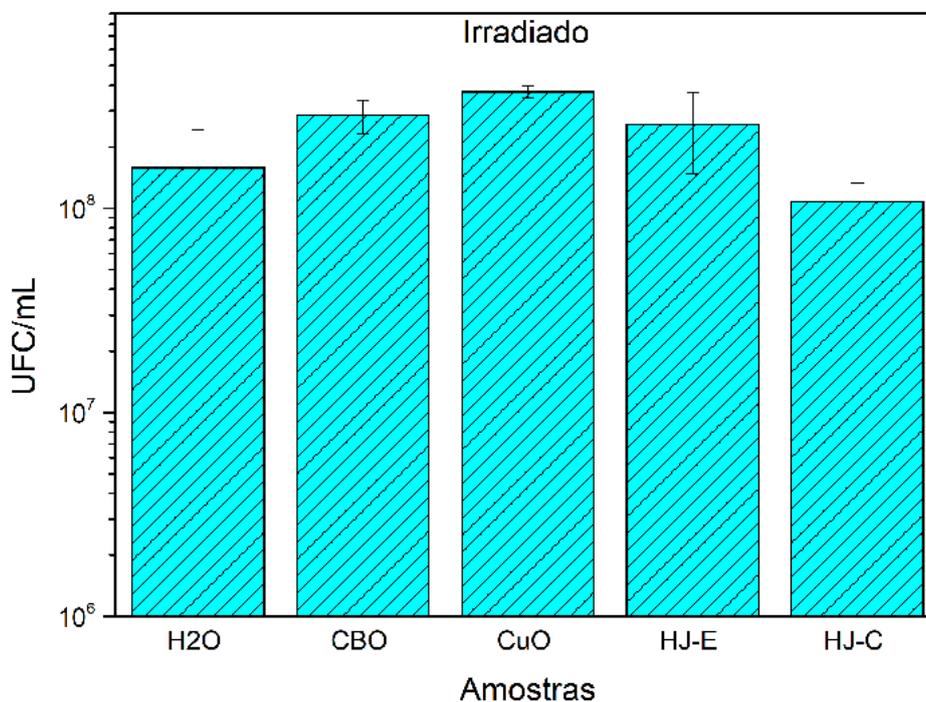


Fonte: autor

Ao compararmos as amostras não irradiadas, por sua vez, percebemos que a maioria das amostras apresentou valores médios ligeiramente inferiores no que diz respeito ao número de colônias que se formaram. Nas seções seguintes, mais detalhes são explorados.

A Figura 35 apresenta o número médio de UFC/mL da *E. coli* submetidas as nanoestruturas na presença de irradiação. Ao realizar o teste-T simples, constatou-se que não há diferença significativa entre as amostras e o controle (H₂O) para $p > 0,05$. Isso significa que, apesar a observação de uma tendência no aumento dos valores médios das UFC/mL das bactérias irradiadas na presença dos nanomateriais, quando comparado com o grupo controle (H₂O), essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Figura 35 – UFC/mL das amostras irradiadas. Ao realizar o teste-T simples, percebemos que para $p < 0,05$ não há diferenciação estatística significativa entre as amostras e o controle.

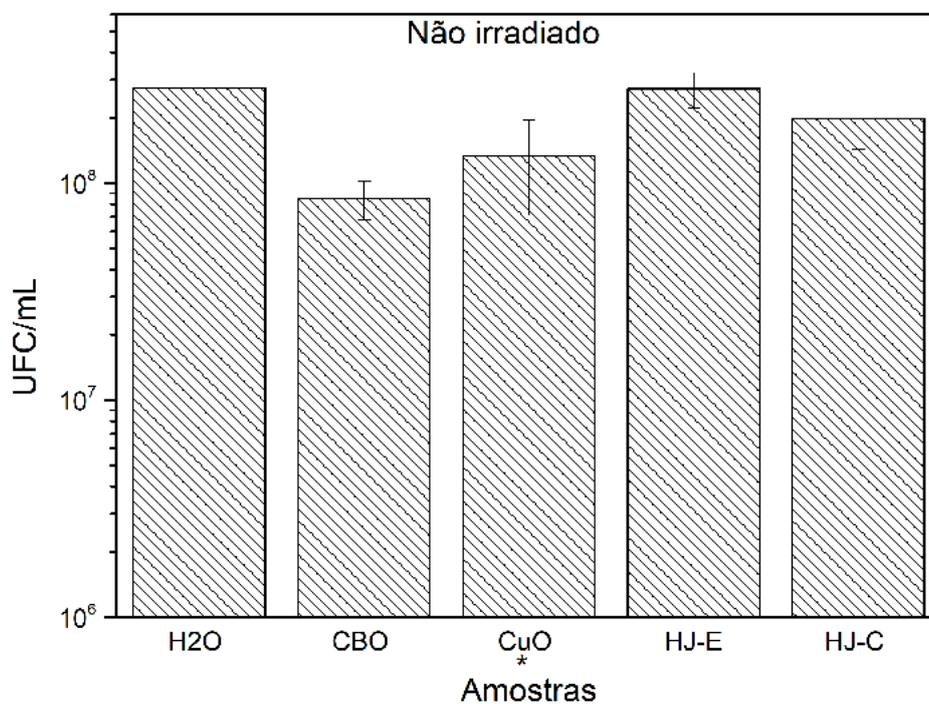


Fonte: autor

Dessa forma, com as condições empregadas, não houve efeito bacteriostático com plaqueamento imediato para nenhum dos 4 nanomateriais empregados. No entanto, foi realizado também um plaqueamento 24 horas após a irradiação. Esse plaqueamento visava avaliar se, após a exposição à luz, as EROs produzidas foram suficientes, em uma escala de tempo maior, para inibir o crescimento das bactérias em solução. Constatou-se que em todas as amostras, as colônias foram capazes de se recuperar, exceto aquelas expostas à amostra HJ-C. Assim sendo, sob essas condições, podemos afirmar que um efeito prolongado das EROs.

Ao avaliar o grupo não irradiado, nota-se que todos se comportam quantitativamente de forma semelhante. O Teste-t, no entanto, mostra que só há diferença significativa da amostra CuO em relação ao controle. Assim sendo, podemos afirmar que ela apresenta um efeito ligeiramente tóxico para a *E. coli* em solução, sem a necessidade de irradiação. Esse efeito, no entanto, está longe de ser suficiente para o controle populacional das colônias, conforme evidenciado na Figura 36.

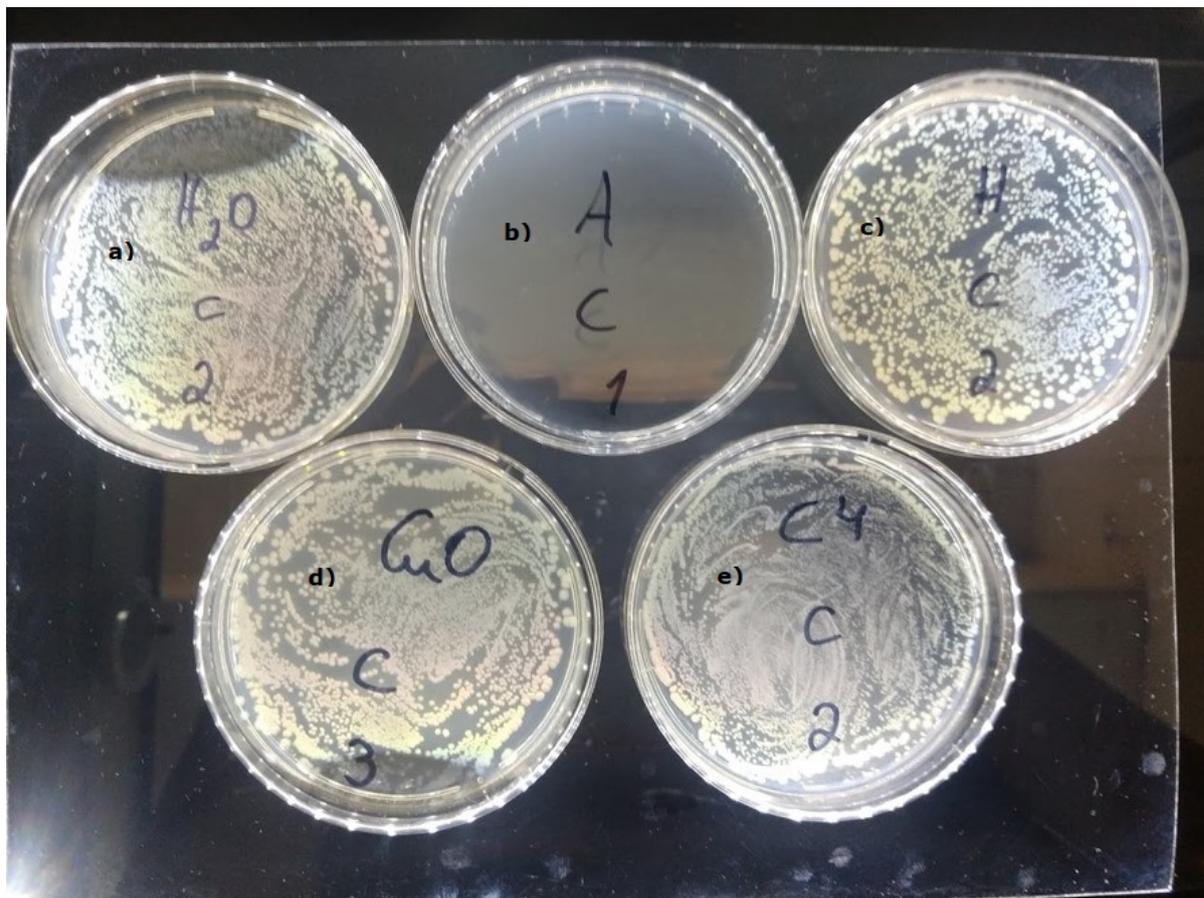
Figura 36 – O gráfico de colunas mostra a quantidade de unidades formadoras de colônia que se estabeleceram após o plaqueamento das amostras não irradiadas. Em relação ao controle, apenas a amostra CuO (marcada com “*”) mostrou-se significativamente diferente para $p < 0,05$.



Fonte: autor

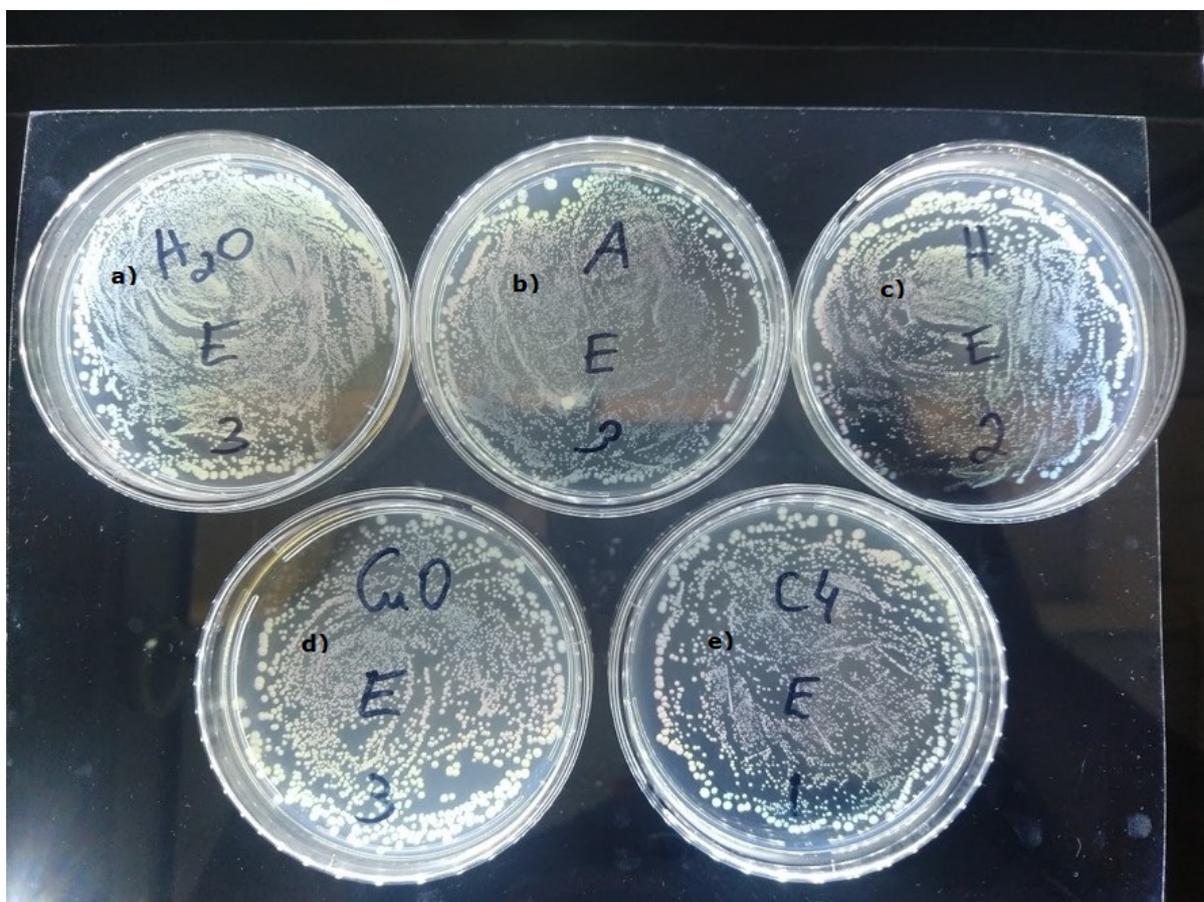
Para verificar se houve um efeito inibidor de crescimento ao longo do tempo, também foi feito um plaqueamento 24h após a irradiação das bactérias. O resultado pode ser observado nas Figuras 37 e 38.

Figura 37 – Amostras com *E. coli* irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Os rótulos correspondentes são: H₂O (a), HJ-C (b), CBO (c), CuO (d), HJ-E (e).



Fonte: autor

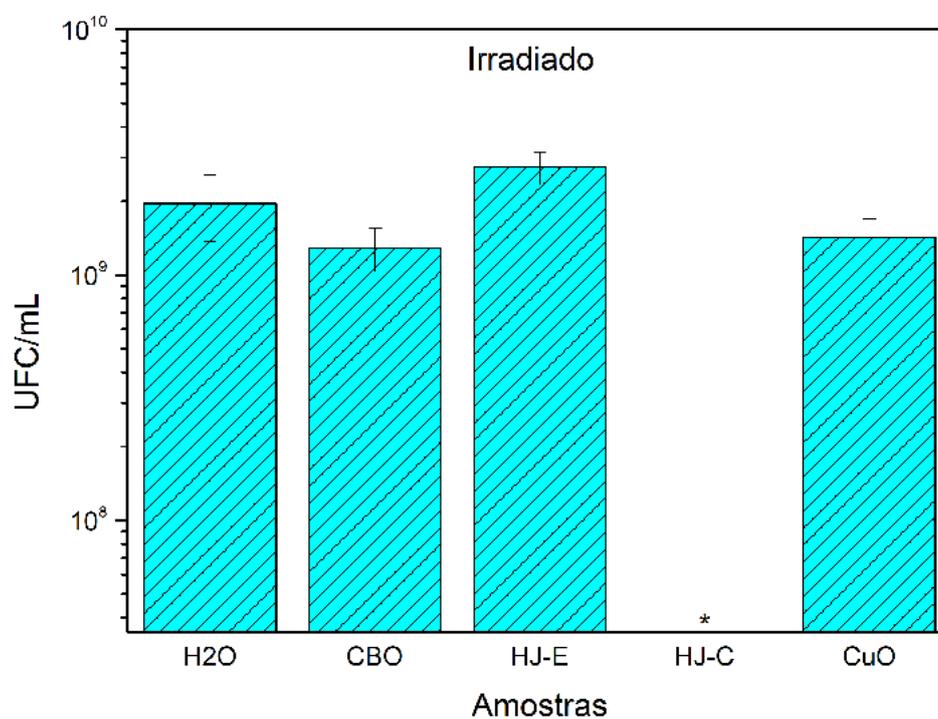
Figura 38 – Amostras com *E. coli* não irradiadas, mas plaqueadas 24h após a dispersão dos nanomateriais. Os rótulos correspondentes são: H₂O (a), HJ-C (b), CBO (c), CuO (d), HJ-E (e).



Fonte: autor

Observando a Figura 37, vemos que houve um efeito bactericida da amostra HJ-C para essas condições experimentais, enquanto as demais tiveram um crescimento normal. A Figura 38 confirma que esse efeito foi desencadeado pela irradiação prévia, o que nos permite afirmar que o mecanismo fotodinâmico é crucial para inativar as bactérias. No entanto, mais experimentos precisam ser feitos para relacionar também o efeito químico com o que foi observado, uma vez que HJ-C também foi a amostra que apresentou maior liberação de íons de Cu em relação às demais. A Figura 39 mostra o gráfico de barras referente às amostras irradiadas plaqueadas 24h após a irradiação.

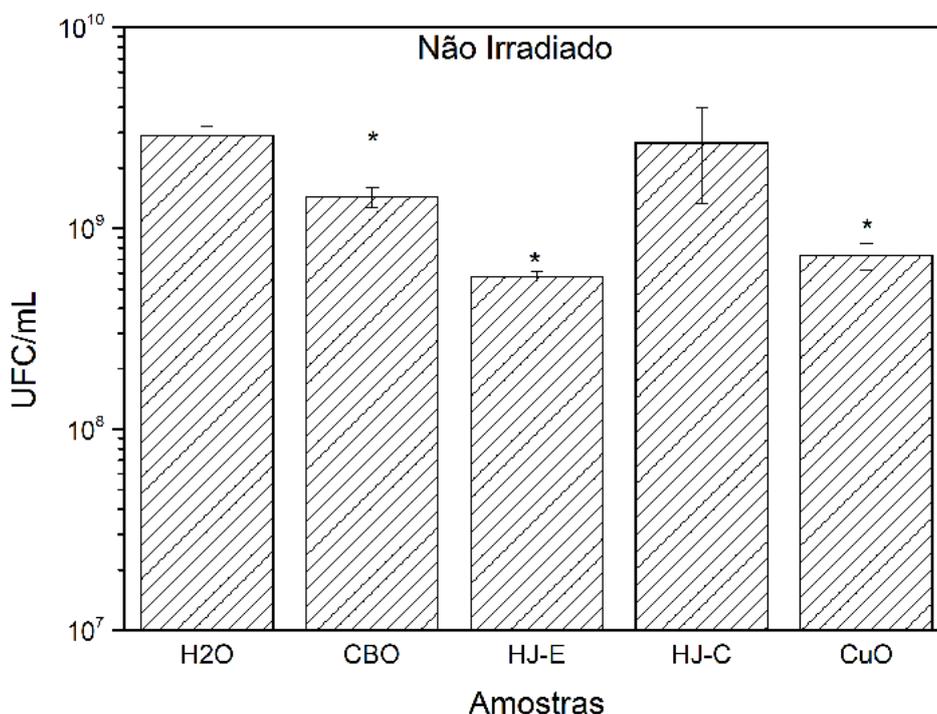
Figura 39 – UFC/mL das amostras irradiadas e plaqueadas 24h após a irradiação. Ao realizar o teste-T simples, percebemos que para $p < 0,05$ não há diferenciação estatística significativa entre as amostras e o controle, exceto para a amostra HJ-C, que apresentou efeito bactericida.



Fonte: autor

Por fim, a Figura 40 mostra o gráfico de barras referente às amostras não irradiadas plaqueadas com 24h. Podemos observar que, nessas condições, apenas as amostra HJ-C não apresenta diferença significativa em relação ao controle. Isso significa que o efeito químico prejudica o crescimento das bactérias nas amostras, mas para a amostra HJ-C, esses efeitos não são suficientes para inibir o crescimento das cepas.

Figura 40 – UFC/mL das amostras não irradiadas e plaqueadas 24h após a submissão aos nanomateriais. Ao realizar o teste-T simples, percebemos que para $p < 0,05$ há diferenciação estatística significativa entre as amostras e o controle, exceto para a amostra HJ-C, que apresentou indiferença.



Fonte: autor

5.5 Avaliação dos mecanismos de toxicidade dos nanomateriais

O estudo realizado demonstrou a possibilidade de se utilizar nanomateriais a base de Bismutato de Cobre e Óxido de Cobre e suas heterojunções como fotossensibilizadores na inativação de bactérias *S. aureus*. Das quatro amostras utilizadas no estudo, três delas apresentaram potencial bacteriostático nas condições de irradiação e concentrações desempenhadas. Com uma ação em solução de 24 horas, um segundo plaqueamento mostrou que todas as amostras, inclusive a amostra controle, apresentaram efeito bactericida. Portanto, as amostras não são eficazes para um combate bactericida nas condições testadas.

Quanto a ação em bactérias Gram-negativas, vimos que nenhum dos materiais empregados apresentou efeito bacteriostático em condições de irradiação e plaqueamento iniciais. No entanto, com uma ação prolongada em solução e com um segundo plaqueamento de 24 horas após a irradiação, a amostra HJ-C apresentou propriedade bactericida, neutralizando 100% do crescimento das colônias.

O ensaio de liberação de íons e o ensaio biológico do grupo não irradiado demonstraram que mecanismos induzidos por efeitos não irradiados não têm predominância nos

mecanismos de inativação das bactérias, sendo a luz azul fator determinante para se obter tal efeito. A amostra que apresentou melhores resultados como fotoinativadores foi a amostra que melhor e mais rapidamente produziu EROs, a amostra HJ-C. Do mesmo modo, a amostra que apresentou menor rapidez na produção das EROs, junto com um sinal menos intenso no ensaio de EROs, a amostra CBO, resultou também em um efeito fotobacteriostático menos potente.

Analisando a estrutura de bandas dos materiais, conseguimos identificar que provavelmente a espécie reativa produzida é a hidroxila radical ($\text{OH}\cdot$), produzida via peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A caracterização fotofísica dos materiais nos possibilitou observar que suas ativações fotodinâmicas podem ser feitas por luz visível em 450 nm (Luz azul), bem como nos possibilitou inferir a respeito dos mecanismos que essa radiação induziria ao interagir com os nanomateriais, produzindo ERO, conseqüentemente o estresse oxidativo necessário para a inibição do crescimento das colônias bacterianas.

No que tange ao formato e tamanho dos materiais empregados, a análise da literatura e dos resultados experimentais nos leva a concluir que não são ideais, e muito provavelmente, dado que já apresentaram algumas propriedades fotoantimicrobianas e antimicrobianas, uma composição semelhante com uma geometria que permite uma área superficial maior, talvez produzisse resultados mais consistentes.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os nanomateriais compostos de Óxido de Cobre e Bismutato de Cobre apresentaram propriedades antimicrobianas e fotoantimicrobianas sob algumas condições experimentais. A amostra HJ-C, por exemplo, foi capaz de inibir totalmente o crescimento de cepas de *E. coli* à concentração de 50 ppm, com uma irradiação de 1h30 com luz azul (450 nm) e uma Potência de 8,3 mW/cm², 24 horas após a ação da luz. Outros materiais apresentaram, também, algumas propriedades bacteriostáticas sob outras condições, como quando as bactérias são plaqueadas imediatamente após a irradiação. Todos os materiais, (inclusive a luz exclusivamente) foram capazes de inativar cepas de *S. aureus* sob as mesmas condições em que *E. coli* foi inativada por HJ-C. Podemos observar boa correlação entre a produção rápida e eficiente de EROs com os efeitos biológicos observados, e ainda também vimos relações entre a liberação de íons tóxicos e esse potencial inativador. Todo o conjunto de informações levantados pelo estudo mostram que os materiais aqui analisados, bem como o entendimento dos mecanismos que levaram aos efeitos observados são cruciais para explorar a aplicabilidade dos mesmos como fotossensibilizadores em técnicas de controle fotodinâmico de bactérias.

REFERÊNCIAS

- AGEL, M. R. et al. Curcumin loaded nanoparticles as efficient photoactive formulations against gram-positive and gram-negative bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 460 – 468, 2019. ISSN 0927-7765. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776519301742>.
- AHMAD, N.; MUKHTAR, H. [32] Mechanism of photodynamic therapy-induced cell death. In: **Methods in enzymology**. [S.l.]: Elsevier, 2000. p. 342 – 358.
- ARAI, T. et al. Efficient complete oxidation of acetaldehyde into CO₂ over CuBi₂O₄/WO₃ composite photocatalyst under visible and UV light irradiation. **The Journal of Physical Chemistry C**, ACS Publications, v. 111, n. 21, p. 7574 – 7577, 2007.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century – A Clinical Super-Challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 439 – 443, 2009. PMID: 19179312. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMp0804651>.
- BLISS, J. M. et al. Susceptibility of Candida Species to Photodynamic Effects of Photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, American Society for Microbiology Journals, v. 48, n. 6, p. 2000 – 2006, 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/48/6/2000>.
- BURNS, J. M. et al. Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments. **Aquatic Sciences**, Springer, v. 74, n. 4, p. 683 – 734, 2012.
- CAIRES, C. et al. Photoinactivation of mcr-1 positive Escherichia coli. **Laser Physics Letters**, v. 15, n. 1, 2018.
- CAIRES, C. S. et al. Effective killing of bacteria under blue-light irradiation promoted by green synthesized silver nanoparticles loaded on reduced graphene oxide sheets. **Materials Science and Engineering: C**, v. 113, 2020. ISSN 0928-4931. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849311934531X>.
- DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340 – 348, 1991. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x>.
- DEMEREC, M. Origin of bacterial resistance to antibiotics. **Journal of bacteriology**, American Society for Microbiology (ASM), v. 56, n. 1, 1948.
- EL-TRASS, A. et al. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 7, p. 2997 – 3001, 2012. ISSN 0169-4332. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433211017764>.
- ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: **Advanced protocols in oxidative stress II**. [S.l.]: Springer, 2010. p. 57 – 72.
- FAN, Y.; MOON, J. J. Nanoparticle drug delivery systems designed to improve cancer vaccines and immunotherapy. **Vaccines**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 3, n. 3, p. 662 – 685, 2015.

- FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections – Future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 125 – 139, 2011. ISSN 1368-7646. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764611000148>.
- FLORS, C. et al. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green®. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1725 – 1734, 04 2006. ISSN 0022-0957. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erj181>.
- FRACKOWIAK, D. The Jablonski diagram. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Elsevier, v. 2, n. 3, 1988.
- FU, P. P. et al. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64 – 75, 2014. ISSN 1021-9498. Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949814000064>.
- GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 4, p. 483 – 490, 2011.
- GÉLINAS, S. et al. Ultrafast long-range charge separation in organic semiconductor photovoltaic diodes. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 343, n. 6170, p. 512 – 516, 2014.
- GILSON, R. C. et al. Hybrid TiO₂–Ruthenium Nano-photosensitizer Synergistically Produces Reactive Oxygen Species in both Hypoxic and Normoxic Conditions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 36, p. 10717 – 10720, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201704458>.
- GOMER, C. J. PRECLINICAL EXAMINATION OF FIRST and SECOND GENERATION PHOTOSENSITIZERS USED IN PHOTODYNAMIC THERAPY. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 6, p. 1093 – 1107, 1991. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02133.x>.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2, p. 45 – 80, 2005. ISSN 0165-022X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X05001454>.
- HAHN, N. T. et al. Electrochemical Synthesis and Characterization of p-CuBi₂O₄ Thin Film Photocathodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 10, p. 6459 – 6466, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp210130v>.
- HE, X. et al. Metal oxide nanomaterials in nanomedicine: applications in photodynamic therapy and potential toxicity. **Current topics in medicinal chemistry**, Bentham Science Publishers, v. 15, n. 18, p. 1887 – 1900, 2015.
- HEINEMANN, M.; EIFERT, B.; HEILIGER, C. Band structure and phase stability of the copper oxides Cu₂O, CuO, and Cu₄O₃. **Physical Review B**, APS, v. 87, n. 11, 2013.
- HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145 – 157, 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>.

HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490 – 499, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lsm.22045>.

KOFFYBERG, F.; BENKO, F. A photoelectrochemical determination of the position of the conduction and valence band edges of p-type CuO. **Journal of Applied Physics**, American Institute of Physics, v. 53, n. 2, p. 1173 – 1177, 1982.

LAMBRECHTS, S. A. et al. Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 7, p. 503 – 509, 2005.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **small**, Wiley Online Library, v. 4, n. 1, p. 26 – 49, 2008.

LEWIS, N. S. Mechanistic studies of light-induced charge separation at semiconductor/liquid interfaces. **Accounts of Chemical Research**, ACS Publications, v. 23, n. 6, p. 176 – 183, 1990.

LI, Y. et al. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. **ACS nano**, ACS Publications, v. 6, n. 6, p. 5164 – 5173, 2012.

LIN, H. et al. Iodine-modified nanocrystalline titania for photo-catalytic antibacterial application under visible light illumination. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 176-177, p. 36 – 43, 2015. ISSN 0926-3373. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337315001605>.

LUO, Y. et al. In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Springer, v. 23, n. 10, p. 2563 – 2573, 2012.

MCDONAGH, A. Phototherapy: From Ancient Egypt to the New Millennium. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 21 Suppl 1, p. S7 – S12, 01 2002.

MINNOCK, A. et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 159 – 164, 1996. ISSN 1011-1344. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1011134495071482>.

MOAN, J.; PENG, Q. **An outline of the history of PDT, Photodynamic Therapy. Comprehensive series in Photochem. Photobiol. Sci. Ed. T. Patrice.** [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, London, 2003.

NOGUEIRA, A. C. et al. Improved visible light photoactivity of CuBi₂O₄/CuO heterojunctions for photodegradation of methylene blue and metronidazole. **The Journal of Physical Chemistry C**, ACS Publications, v. 123, n. 42, p. 25680 – 25690, 2019.

OHULCHANSKY, T. Y. et al. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. **Nano letters**, ACS Publications, v. 7, n. 9, p. 2835 – 2842, 2007.

PELCZAR, J. M. **CHAN, ECS, KRIEG, Noel R. Microbiologia: Conceitos e Aplicação.** Vol. 1, 2. Edição. [S.l.]: São Paulo. MACRON Books, 1996.

PERRIA, C. et al. Photodynamic Therapy of Malignant Brain Tumors: Clinical Results of, Difficulties with, Questions about, and Future Prospects for the Neurosurgical Applications. **Neurosurgery**, v. 23, n. 5, p. 557 – 563, 11 1988. ISSN 0148-396X. Disponível em: <https://doi.org/10.1227/00006123-198811000-00003>.

RAPPAPORT, F. et al. Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 41, n. 26, p. 8518 – 8527, 2002.

SAMIA, A. C.; CHEN, X.; BURDA, C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 125, n. 51, p. 15736 – 15737, 2003.

SENGE, M. O.; BRANDT, J. C. Temoporphin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)—A Second-generation Photosensitizer†,‡. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1240 – 1296, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x>.

SKWOR, T. A. et al. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A metalloporphyrin comparison. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 165, p. 51 – 57, 2016. ISSN 1011-1344. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416306315>.

THILL, A. et al. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. **Environmental science & technology**, ACS Publications, v. 40, n. 19, p. 6151 – 6156, 2006.

WANG, H. et al. Preparation of CuO nanoparticles by microwave irradiation. In: . [S.l.: s.n.], 2002.

WANG, R. et al. Insights into rapid photodynamic inactivation mechanism of *Staphylococcus aureus* via rational design of multifunctional nitrogen-rich carbon-coated bismuth/cobalt nanoparticles. **Applied Catalysis B: Environmental**, Elsevier, v. 241, p. 167 – 177, 2019.

WANG, S. et al. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 4, p. 487 – 493, 2004.

WANG, S. et al. Single Continuous Wave Laser Induced Photodynamic/Plasmonic Photothermal Therapy Using Photosensitizer-Functionalized Gold Nanostars. **Advanced Materials**, v. 25, n. 22, p. 3055 – 3061, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201204623>.

WANG, Z. et al. Photomagnetic nanoparticles in dual-modality imaging and photodynamic activity against bacteria. **Chemical Engineering Journal**, v. 356, p. 811 – 818, 2019. ISSN 1385-8947. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894718317960>.

ZOLFAGHARI, P. S. et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC microbiology**, BioMed Central, v. 9, n. 1, 2009.

ZUPANIC-SLAVEC, Z.; TOPLAK, C. Water, air and light–Arnold Rikli (1823-1906). **Gesnerus**, v. 55, n. 1-2, 1998. ISSN 0016-9161. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/9684537>.