

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICA
HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *stricto sensu* EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

JOYCE FARIAS LOUZA DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA RIFAMPICINA
ADSORVIDA À NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO.

ANÁPOLIS,

2016

JOYCE FARIAS LOUZA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA RIFAMPICINA
ADSORVIDA À NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a produtos para a Saúde.

ORIENTADORA: Dr^a. LUCIANA REBELO GUILHERME

CO-ORIENTADOR: Dr. PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES

ANÁPOLIS,

2016

Sousa, Joyce Farias Louza de.

Caracterização química e atividade biológica da rifampicina adsorvida à nanopartículas magnéticas de óxido de ferro – 2016

78 f. il figuras.

Orientador: Prof. Dra. Luciana Rebelo Guilherme

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.

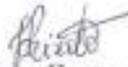
Bibliografia.

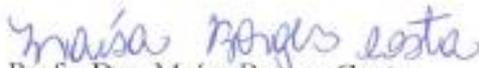
1. Nanotecnologia 2. *Artemia salina* 3. Toxicidade 4. *Staphylococcus aureus* 5. Antibiótico I. Título.

**“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA
RIFAMPICINA ADSORVIDA À NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
ÓXIDO DE FERRO”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em
Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 30 de junho de 2016, pela Banca
Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme
Presidente da Banca
UEG/CCET


Profa. Dra. Josana Castro Peixoto
Membro Externo
Unievangélica


Profa. Dra. Maísa Borges Costa
Membro Interno
UEG / CCET

Dedico este trabalho ao meu pai José Louza, a minha mãe Maria Adnair, ao meu irmão Júnior, a minha sobrinha Rebecca, às minhas avós Sebastiana e Luíza e aos meus avôs Domingos “in menorian” e José Domingos “in menorian”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que até aqui me trouxe.

Aos melhores pais do mundo, que me deram enorme apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de mestrado, à Universidade Estadual de Goiás (UEG) e à Universidade Federal de Goiás (UFG).

Aos meus amigos de pós-graduação do CAPS: Bruce Cardoso, Paulo Assunção, Emmanuelle Brito, Stephanie Naoum pelo privilégio de terem feito parte desta etapa da minha vida. Ressalto aqui minha gratidão pelos diversos gestos de altruísmo que vocês compartilharam comigo. E pelos muitos momentos de diversão que passamos juntas.

À professora Dr^a Luciana Rebelo Guilherme que me orientou minha gratidão, meu respeito e minha admiração. Obrigada por ser tão humana e compreender nas entrelinhas minhas emoções. Obrigada por me transmitir com enorme paciência teu vasto conhecimento técnico. Gratidão por sempre me motivar nos momentos árdus do trabalho.

Ao professor Dr Plínio Lázaro Faleiro Naves que me co-orientou com paciência e profissionalismo. Minha gratidão por inspirar-me com tua generosidade em transmitir de forma responsável teu jeito ético de fazer ciência.

Aos técnicos dos laboratórios da UEG: Seu Fernando, Cleiber, Oswaldo, Isabel, Amanda e Jéssica, por toda paciência e suporte técnico prestado.

Gratidão aos meus amigos do grupo de meditação: Cleonice, Marta, Roberto, Carlos, Gaúdio e Naira pelos conselhos de encorajamento e enorme carinho durante esta jornada.

Gratidão às amigas Odete Amaral, Aline Cunha e Juliana Tompai pelo apoio e carinho.

Ressalto minha gratidão aos mestrandos do Programa de Ciências Moleculares que foram generosamente prestativos. Especialmente ao meu amigo e Msc. Jhonata de Jesus Silva

Minha gratidão ao Msc. Joel Rocha que de forma tão generosa e altruísta veio a universidade e contribuiu com dicas importantíssimas do processo de síntese do fluido. E peço Deus a que o abençoe com muita saúde.

E meu terno agradecimento a todos que contribuíram direta e indiretamente neste desafio, que representou uma grande etapa de crescimento profissional e pessoal na minha vida.

“Há ouro a dois passos de onde você está agora. Portanto, fique distante da autocompaixão, pare de se sentir vítima e, não importa o que fizer, continue escavando. É a sua vez”.

Napoleon Hill

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Rifampicina.....	20
2.2	Nanopartículas Magnéticas e Fluidos Magnéticos	23
2.3	Sistemas Liberação e Vetorização de Fármacos	26
2.4	Outros Usos das Nanopartículas	28
2.5	Ensaio Biológicos.....	30
2.5.1	Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	30
2.5.2	Métodos de Difusão em Disco.....	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
3.2.1	Preparação do Nanosistema.....	34
3.2.2	Caracterização do Nanosistema.....	34
3.2.3	Ensaio Biológicos do Nanosistema.....	34
4	MATERIAL.....	35
4.1	Equipamentos Utilizados	35
4.2	Reagentes Utilizados.....	36
5	METODOLOGIA.....	37
5.1	Síntese	37
5.1.1	Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro	37
5.1.2	Funcionalização das Nanopartículas com Ácido Láurico a.....	38

5.1.3	Oxidação das Nanopartículas Funcionalizadas	39
5.1.4	Processo de Diálise e Esterilização do Fluido	39
5.2	Caracterização dos Compostos	41
5.2.1	Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)	41
5.2.2	Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta-Visível (UV-vis)	41
5.2.3	Espectroscopia Vibracional de absorção na Região do Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR).....	42
5.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	42
5.2.5	Difratometria de Raios X (DRX)	42
5.2.6	Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering - DLS)	43
5.3	Ensaio Biológicos	43
5.3.1	Toxicidade dos Compostos pelo Ensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i>	43
5.3.2	Análise Microscópica	45
5.3.3	Manutenção das cepas	46
5.3.4	Atividade Antimicrobiana dos Compostos pelo Método de Difusão em Disco.	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.1	Síntese	49
6.1.1	Síntese das Nanopartículas	49
6.1.2	Funcionalização das Nanopartículas com Ácido Láurico	49
6.1.3	Oxidação das Nanopartículas Funcionalizadas	50
6.1.4	Processo de Diálise e Esterilização do Fluido	51
6.1.5	Adsorção da Rifampicina ao Fluido.	51
6.2	Caracterização	51
6.2.1	Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)	51
6.2.2	Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta-Visível (UV-vis)	52
6.2.3	Curva padrão e Doseamento da Rifampicina não Adsorvida ao Fluido.....	52

6.2.4	Espectroscopia Vibracional de absorção na Região do Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR).....	54
6.2.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	57
6.2.6	Difratometria de Raios X (DRX)	59
6.2.7	Espalhamento Dinâmico da Luz (<i>Dinamic Light Scaterring</i> - DLS)	60
6.3	Ensaio Biológicos.....	61
6.3.1	Toxicidade dos Compostos em Ensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i>	61
6.3.2	Análises de <i>Artemias salinas</i> por Microscópica Óptica.	62
6.3.3	Atividade Antimicrobiana dos Compostos pelo Método de Difusão em Disco.	64
7	CONCLUSÕES	67
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da rifampicina	17
Figura 2 - Escala nanométrica.....	18
Figura 3 - Estrutura das rifamicinas.....	20
Figura 4 - Mecanismo de ação da rifampicina.....	22
Figura 5 - Sedimentação das nanopartículas de óxido de ferro.....	23
Figura 6 - Estrutura do tensoativo ácido láurico.....	24
Figura 7 - Esquema do superparamagnetismo.....	25
Figura 8 - Aplicações biológicas de nanopartículas magnéticas.....	25
Figura 9 - Cinética de liberação de fármacos.....	26
Figura 10 - Esquema do carregamento e liberação de fármacos.....	27
Figura 11 - Hipertermia magnética.....	30
Figura 12 - <i>Artemia Salina</i> (náuplio e adulto).....	31
Figura 13 – Ilustração de discos que apresentaram halos de inibição e discos que não halos de inibição contra a cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figura 14 - Esquema da síntese de nanopartículas pelo método de coprecipitação.....	37
Figura 15 - Esquema da funcionalização das nanopartículas.....	38
Figura 16 - Esquema da oxidação das nanopartícula funcionalizadas.....	39
Figura 17 - Esquema de diálise do fluido.....	40
Figura 18 - Esquema de adsorção da rifampicina ao fluido.....	41
Figura 19 - Esquema do ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	45
Figura 20 - Esquema de manutenção das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Figura 21 - Esquema de impregnação dos discos de papel com os compostos do estudo.....	47
Figura 22 - Esquema do ensaio de difusão em disco.....	48

Figura 23 - Esquema da sedimentação das nanopartículas de magnetita.....	49
Figura 24 - Esquema do revestimento e estabilização das nanopartículas a partir do tensoativo ácido láurico.....	50
Figura 25 - Nanopartículas de óxido de ferro (antes e após a oxidação)	50
Figura 26 – Fotografia demonstrando o início e o final da separação magnética do fluido com ímã de neodímio.	51
Figura 27 - Resultado obtido por espectroscopia eletrônica na região ultravioleta visível de solução de rifampicina na concentração de 0,1360 mg.mL ⁻¹	52
Figura 28 - Espectro de absorção de rifampicina nos comprimento de onda de 330 a 600 nm.....	53
Figura 29 - Curva padrão de rifampicina obtida por espectrofotometria eletrônica na região do infravermelho UV-vis.	54
Figura 30 - Espectros de infravermelho dos compostos	55
Figura 31 - Análise térmica dos compostos por calorimetria exploratória diferencial .	58
Figura 33 - Difratomia de raios X das amostras de óxidos de ferro	59
Figura 33 - Esquema proposto para ligações do nanossistema.....	60
Figura 34 - Imagem de microscopia de <i>Artemia salina</i> após exposição aos compostos do ensaio de toxicidade.	63
Figura 35 - Análise visual dos halos de inibição dos compostos contra a cepa ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i>	65

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 - Concentrações dos compostos testados para realização do ensaio de letalidade em larvas de <i>Artemia salina</i>	44
Tabela 2- Concentração dos compostos para teste de difusão em disco contra a cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Tabela 3 - Toxicidade dos compostos expressada como concentração letal para 50% (CL ₅₀) das larvas de <i>Artemia salina</i>	61
Tabela 4 - Diâmetro médio dos halos formados para diferentes amostras em relação à cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	unidade de medida de temperatura – graus celsius.
µg	microgramas
µL	microlitros
AL	ácido láurico
b	largura a meia altura do pico de difração mais intenso
B	valores de largura a meia altura
CL ₅₀	concentração letal média
CLSI	<i>clinical and laboratory standards institute</i>
cm ⁻¹	unidade de medida de comprimento – centímetros (1x10 ⁻² m)
d	diâmetro do cristalito
DH	diâmetro hidrodinâmico
DMSO	dimetilsulfóxido
DRX	difratometria de raios X
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DSL	espalhamento dinâmico da luz
FM	fluido magnético
FTIR	espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier
KBr	brometo de potássio
mg	unidade de medida de massa – miligramas (1x10 ⁻³ g)
mL	unidade volumétrica – mililitros (10 ⁻³ L)
mm	milímetros

NH ₄ OH	hidróxido de amônio
nm	unidade de medida de comprimento – nanômetros (1×10^{-9} m)
θ	ângulo de difração do pico mais intenso
λ	comprimento de onda dos raios X
IPD	índice de polidispersão
ζ	potencial zeta

RESUMO

A rifampicina, apesar de ser um consagrado antibiótico no tratamento da hanseníase, da tuberculose e das infecções por *Staphylococcus aureus*, pode ocasionar sérios eventos adversos, como a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, em terapias prolongadas ou na administração de altas dosagens. As nanopartículas surgem como promissoras plataformas de liberação de fármacos e veículos, transportadores e carreadores, contribuindo para a redução de efeitos colaterais e tóxicos. Este estudo teve o objetivo de preparar um nanossistema a partir da rifampicina a nanopartículas de óxido de ferro, realizar sua caracterização química e avaliar atividade toxicológica e antimicrobiana. Nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, revestidas com ácido láurico e depois adsorvidas a rifampicina. Este sistema foi caracterizado por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível, espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier, difratometria de raios X e espalhamento dinâmico da luz. A toxicidade do composto foi determinada pelo ensaio em letalidade de *Artemia salina* e posteriormente, sua atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão em disco. Os resultados de espectroscopia eletrônica demonstraram que 55% da rifampicina foi adsorvida ao fluido. A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho evidenciou a presença do ácido láurico associado às nanopartículas e confirmou também a presença da rifampicina ao sistema. A difração de raios X permitiu estimar os diâmetro médio das partículas de magnetita e maghemita, que revelaram dimensões de 8 nm, em ambos os casos. A atividade antimicrobiana da rifampicina foi reduzida quando adsorvida ao fluido, em relação à rifampicina livre, contra cepa de *Staphylococcus aureus*. E discos impregnados apenas com fluido não apresentaram halo de inibição. A rifampicina livre apresentou toxicidade moderada (CL₅₀ 312,94), enquanto a rifampicina adsorvida ao fluido apresentou baixa toxicidade (CL₅₀ 535,38) aos náuplios de *Artemia salina*. Verificou-se que nanopartículas de óxido de ferro foram atóxicas até na alta concentração de 3000 µg.mL⁻¹. Além disso, observaram-se comportamentos de aumento de velocidade de natação e acúmulo de nanopartículas no intestino das *Artemia salina*, contudo, essas alterações não induziram a mortalidade dos crustáceos. E a ausência de toxicidade reforça a perspectiva de aplicações do composto como possível carreador de fármaco

PALAVRAS CHAVE: Nanotecnologia, *Artemia salina*, toxicidade, *Staphylococcus aureus*, antibiótico,

ABSTRACT

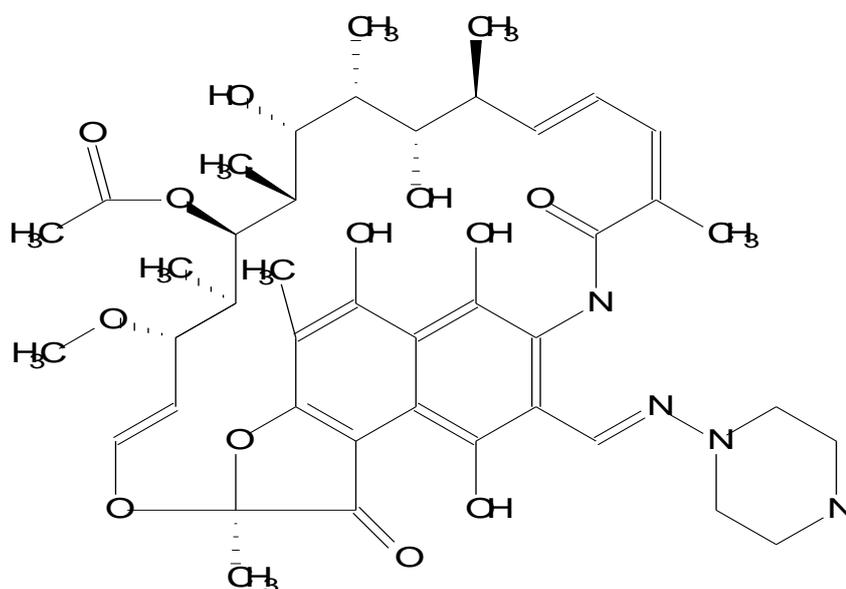
Rifampicin, despite being an established antibiotic in the treatment of leprosy, tuberculosis and *Staphylococcus aureus* infections, this drug can cause serious adverse events such as nephrotoxicity and hepatotoxicity in prolonged therapy or administration of high doses. The nanoparticles arise as release promising platforms of drugs, contributing to the decrease of side and toxic effects. This study aimed to associate rifampicin with nanoparticles of iron oxide, perform chemical characterization and evaluate toxicological and antimicrobial activity. Nanoparticles of iron oxide were synthesized by coprecipitation method, coated with lauric acid and then absorbed to rifampicin. Such system was characterized by Ultraviolet-visible spectroscopy, Fourier transform spectroscopy infrared, X-ray diffractometry and dynamic light scattering. The toxicity of the compound was determined by *Artemia salina* lethality assay and, posteriorly, its antimicrobial activity was evaluated by disk diffusion antimicrobial susceptibility testing. The results demonstrated that 55% of the rifampicin was adsorbed to the fluid according to the UV-vis technique. The infrared region of the spectra showed the presence of lauric acid combined with nanoparticles and also confirmed the presence of the rifampicin to the system. The average diameter of the magnetite and maghemite particles were estimated by X-ray diffraction, which revealed 8 nm dimensions in both cases. The antimicrobial activity of rifampicin was decreased when absorbed in the fluid, regarding free rifampicin, against *Staphylococcus aureus* strain. And disks impregnated with only nanoparticles showed no inhibition zone. The free rifampicin showed a moderate toxicity (LC₅₀ 312.94), while rifampicin absorbed in the fluid showed low toxicity (LC₅₀ 535.38) to the de *Artemia salina* nauplii. And it was found that iron oxide nanoparticles were non-toxic even at high concentration of 3000 µg.mL⁻¹. Furthermore, it was observed behaviors of swimming speed increase and accumulation of nanoparticles in the intestine of *Artemia salina*, however, these alterations did not induce mortality of crustaceans. The absence of toxicity increases the prospect of the compound applications as possible drug carrier.

Keywords: Nanotechnology, *Artemia saline*, toxicity, *Staphylococcus aureus*, antibiotic.

1 INTRODUÇÃO

A rifampicina (Figura 1) é um antibiótico que possui atividade bactericida contra os patógenos *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (HYDE, 1972; RODRÍGUEZ et al., 2014).

Figura 1 - Fórmula estrutural da rifampicina



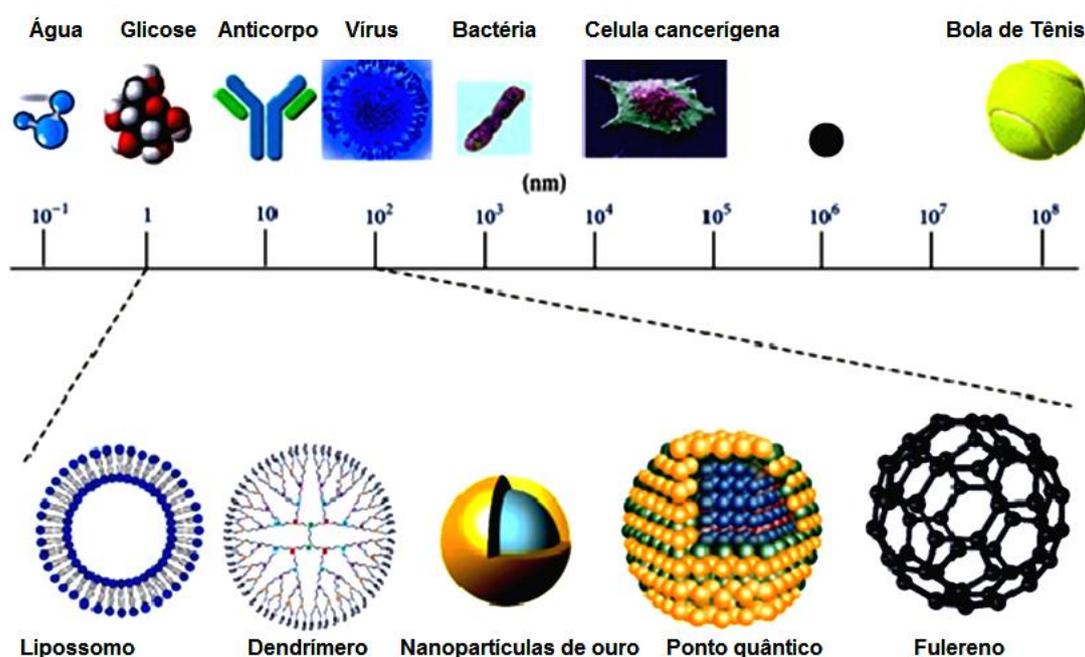
Fonte: Própria autora

Seu mecanismo de ação consiste na inibição da RNA-polimerase DNA-dependente impedindo a síntese de proteínas da célula bacteriana (WEHRLI; STAEHELIN, 1971; YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012).

A rifampicina apesar de seu amplo espectro de ação possui a capacidade de produzir eventos de toxicidade em fígado e néfrons, devido a tratamentos prolongados e às altas dosagens em terapias, como a tuberculose e hanseníase (ELLARD; FOURIE, 1999). Além disso, mutações em subunidades da RNA polimerase explicam a resistência antimicrobiana da rifampicina. Diante desses problemas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de desenvolver novas tecnologias e novos antibióticos (MOHSENI; GILANI; MORTAZAVI, 2015).

Como tecnologia promissora, a nanobiomedicina é uma ciência envolvida em aplicações biomédicas (BUSQUETS; SABATÉ; ESTELRICH, 2014) que está associada à manipulação da matéria em escala nanométrica, que compreende dimensões entre 1 – 100 nm (Figura 2) (PRADHAN et al., 2015). Neste cenário, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro vem se destacando como materiais importantes em aplicações biomédicas, como vetorização de fármaco, sistemas de liberação controlada (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014a), diagnósticos via imagiologia (ITTRICH et al., 2013) e tratamento de doenças (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; GEHRKE; GEISER; SOMBORN-SCHULZ, 2015).

Figura 2 - Escala nanométrica.



Fonte: (PRADHAN et al., 2015) adaptado.

Essas nanopartículas são formadas por óxidos de ferro de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e de magnetita (Fe_3O_4) (KHALAFALLA; REIMERS, 1980; SHRESTHA; HAMBLIN; KISHEN, 2014) na forma de suspensões coloidais estáveis (estabilizadas por tensoativos ou polímeros) denominadas fluidos magnéticos (FM) (GHOSHAL et al., 2013; INBARAJ; TSAI; CHEN, 2012; UNTERWEGER et al., 2014).

Uma abordagem promissora para sua aplicação é o desenvolvimento de nanossistemas baseado na adsorção de fármacos a estas nanopartículas, na sua forma de fluido magnético (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012).

Estudos vêm demonstrando que estes nanosistemas, devido às suas propriedades magnéticas (PRIJIC et al., 2012) podem ser utilizadas principalmente para provimento da liberação controlada e vetorização de fármacos (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014a).

Diante deste cenário, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, lançam-se como uma promissora área no desenvolvimento de nanoantibióticos, com a expectativa de produzir um aumento da atividade antimicrobiana explicada em alguns estudos, com um sinergismo a partir da formação do complexo fármaco-nanopartículas (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014b). E também auxiliando na redução da toxicidade do fármaco no organismo (GAMBARDELLA et al., 2014), devido a sua capacidade de vetorização e liberação controlada de fármacos.

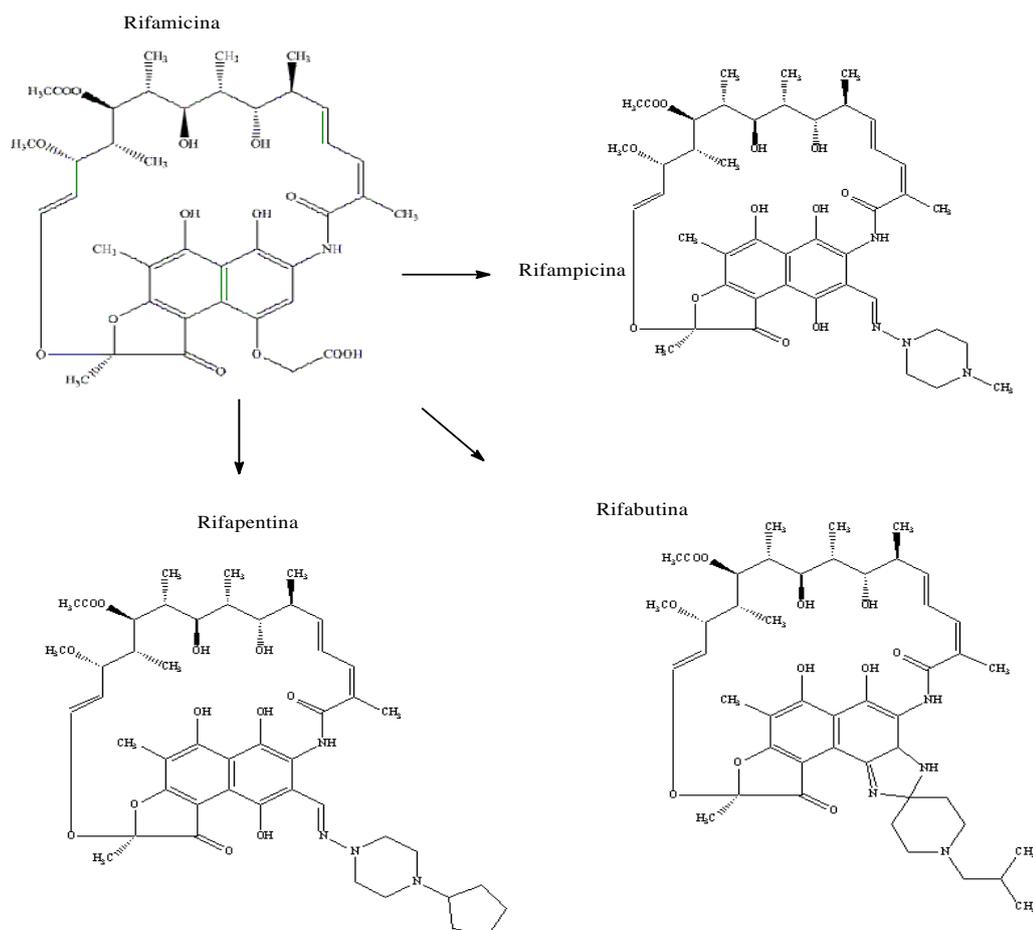
Deste modo, este estudo tem como objetivo produzir um nanosistema a partir da adsorção de rifampicina à nanopartículas de óxido de ferro, realizar sua caracterização química e avaliar sua atividade antimicrobiana por difusão em disco e sua toxicidade em *Artemia salina*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Rifampicina

As rifamicinas são antibióticos do grupo ansamicinas, obtidas a partir da fermentação da *Streptomyces mediterranei* que foram descobertas em 1957 (WEHRLI; STAEHELIN, 1971; MOHAJERI et al., 2014). Na época foram isolados alguns compostos e destes a rifampicina B demonstrou possuir maior atividade bactericida. A partir desse isolamento, diversos radicais foram adicionados a rifampicina B por método sintético, dando origem às rifamicinas (rifampicina, rifabutina, rifapentina) semissintéticas (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura das rifamicinas.



Fonte: Própria autora.

Destas, a rifampicina demonstrou possuir maior espectro de atividade bactericida, especialmente contra a inibição do bacteriano de *Staphylococcus aureus* (CAMILLO-

COURA et al., 1970; WEHRLI; STAEHELIN, 1971; MOHAJERI et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2014).

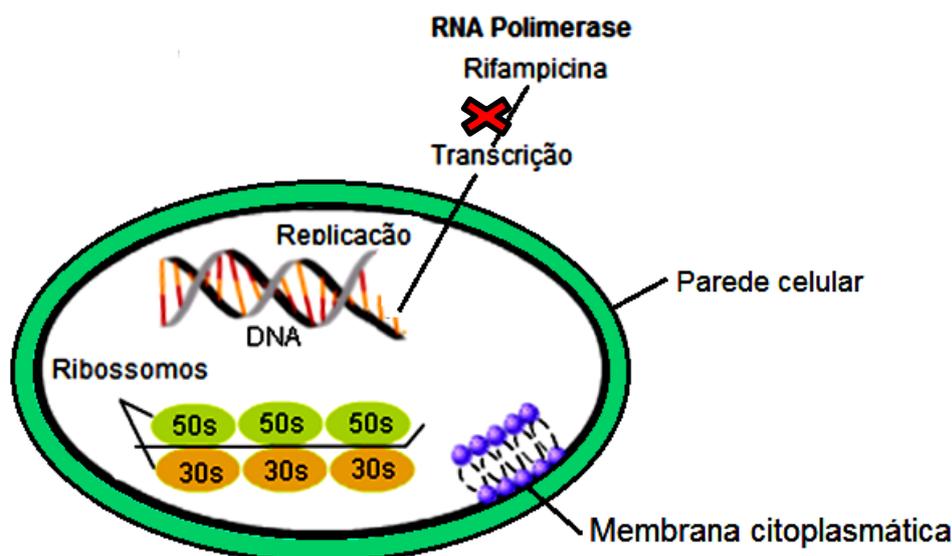
A rifampicina (3-[[[4-metil-1-piperazinil]imino]metil]rifamicina) apresenta fórmula molecular de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ e peso molecular de $822.94 \text{ g mol}^{-1}$. Contém no mínimo 97% e no máximo 102% de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$. É um pó cristalino, de cor castanho-avermelhada, pouco solúvel em água, acetona e álcool, e, solúvel em metanol. Deve ser armazenados em recipientes bem fechados e protegidos da luz a uma temperatura máxima de 25°C (PHARMACOPEIA, 2014; FÁRMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A rifampicina é um consagrado antibiótico muito utilizado em associação com outros antibióticos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno da tuberculose (CAMILLO-COURA et al., 1970; WEHRLI; STAEHELIN, 1971; MOHAJERI et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2014). A tuberculose é uma doença pulmonar, que pode afetar outros órgãos. E sobre tudo pacientes imunodeprimidos. É transmissível principalmente por vias aéreas, por gotículas de saliva que contenham o bacilo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (MOHSENI; GILANI; MORTAZAVI, 2015). Seu diagnóstico é obtido por meio da análise de cultura ou baciloscopia pela identificação do bacilo (HYDE, 1972; RODRÍGUEZ et al., 2014).

A rifampicina também é utilizada para o tratamento da hanseníase, infecções por *Staphylococcus aureus* e na profilaxia de infecções meningocócicas (ELLARD; FOURIE, 1999). Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da transcrição da micobactéria, inibindo a síntese de RNA, especificamente a RNA-polimerase-DNA-dependente (DDRP), o que impede a síntese de RNA mensageiro, cessando a síntese de proteínas da célula bacteriana e provocando a sua morte (Figura 4) (WEHRLI; STAEHELIN, 1971; YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012; LEGOUT et al., 2014).

A rifampicina é bem absorvida por via oral e é amplamente distribuída nos tecidos e fluidos corporais (ELLARD; FOURIE, 1999; INGEN et al., 2011). Ela se liga aproximadamente a 89% às proteínas plasmáticas. Possui meia vida de aproximadamente 3 horas e apresenta metabolismo principalmente hepático. Sua excreção pela urina pode ser de 30 a 60% de metabólitos sob a forma desacetilada e aproximadamente 50% na sua forma inalterada. Ela também pode ser excretada pelo leite materno e atravessar a barreira placentária (IBIAPINO et al., 2014).

Figura 4 - Mecanismo de ação da rifampicina.



Fonte: <http://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/antibiotics.html> (Adaptado).

A rifampicina é considerada um fármaco de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) de acordo com classificação biofarmacêutica (WHO, 2009). Ela possui duas formas cristalinas polimórficas I e II e duas formas amórficas (PELLIZA et al., 1977). Estudos tem demonstrado que a forma polimórfica I é a mais estável (ALVES et al., 2010).

Apesar de exercer atividade bactericida, em muitos casos, pode ser necessária a administração de altas doses e tratamentos prolongados. Esta combinação pode ocasionar com maior frequência o aumento dos níveis séricos de bilirrubina e de enzimas hepáticas, podendo provocar hepatotoxicidade e em menor ocorrência o desenvolvimento de nefrite intersticial aguda e glomerulonefrite (LEGOUT et al., 2014; MIN et al., 2013; (FERREIRA et al., 2015).

Outro problema reportado a rifampicina é a sua resistência ao *Mycobacterium tuberculosis* devido a mutações da subunidade β da RNA polimerase. Este problema representa uma seria ameaça à saúde pública, de modo que este antibiótico não deve ser utilizado isoladamente no tratamento da tuberculose, ou seja, recomenda-se a administração concomitante da rifampicina com outros antibióticos (MOHAJERI et al., 2014; SHERRARD; TUNNEY; ELBORN, 2014). Além disso, a rifampicina apresenta desvantagens, tais como a

solubilidade aquosa limitada e dependente do pH, biodisponibilidade reduzida e estabilidade comprometida quando exposta à luz (SCHIANI et al., 2013).

Inúmeros estudos em sistemas de liberação controlada de fármacos têm como objetivo melhorar propriedades físico-químicas (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012), potencializar a ação e diminuir os efeitos colaterais dos fármacos (HUH; KWON, 2011).

E aliando-se ao fato de que a adsorção de antibióticos a nanopartículas magnéticas de óxido de ferro possam aumentar a absorção celular do fármaco e reduzir efeitos tóxicos (ISTRATE et al., 2014), sugere-se que a adsorção da rifampicina a essas partículas também possam reduzir sua toxicidade.

2.2 Nanopartículas Magnéticas e Fluidos Magnéticos

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro são formadas por óxidos de ferro de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e de magnetita (Fe_3O_4), seguidas da adição de uma base pelo método de síntese de coprecipitação (ITTRICH et al., 2013; LEE et al., 2015; KHALAFALLA; REIMERS, 1980).

Após sua síntese forma-se uma suspensão coloidal, também conhecida como fluido magnético ou ferrofluido (EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1999). O fluido magnético é constituído de uma fase sólida magnética e uma fase líquida dispersante não magnética, ilustrada na Figura 3 (SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2014).

Figura 5 - Sedimentação das nanopartículas de óxido de ferro.



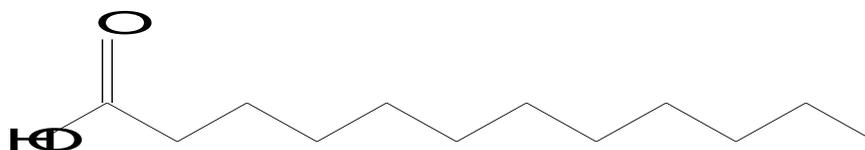
Fonte: (SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2014).

Estes materiais possuem uma natureza nanomagnética em função de serem compostas por minúsculas partículas que funcionam como ímãs (LOPEZ et al., 2010).

Contudo, partículas magnéticas de óxido de ferro, por estarem em escala nanométrica (KHALAFALLA; REIMERS, 1980) podem apresentar uma grande área superficial e sofrer agregação de suas partículas. Por esse motivo, faz-se necessário minimizar essa aglomeração com o processo de estabilização do ferrofluido, por meio de revestimento ou funcionalização das partículas (KUCHERYAVY et al., 2013).

No processo de funcionalização as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro são revestidas em sua superfície com polímeros biocompatíveis ou tensoativos (SHRESTHA; HAMBLIN; KISHEN, 2014). Os tensoativos, como o ácido láurico (Figura 6), por exemplo, favorecem a repulsão eletrostática e estérica no fluido e deste modo contribuem para a não aglomeração das partículas. Eles também são responsáveis por manter as propriedades coloidais em altas temperaturas, quando submetidos a campos magnéticos alternados (GONZALES; KRISHNAN, 2007).

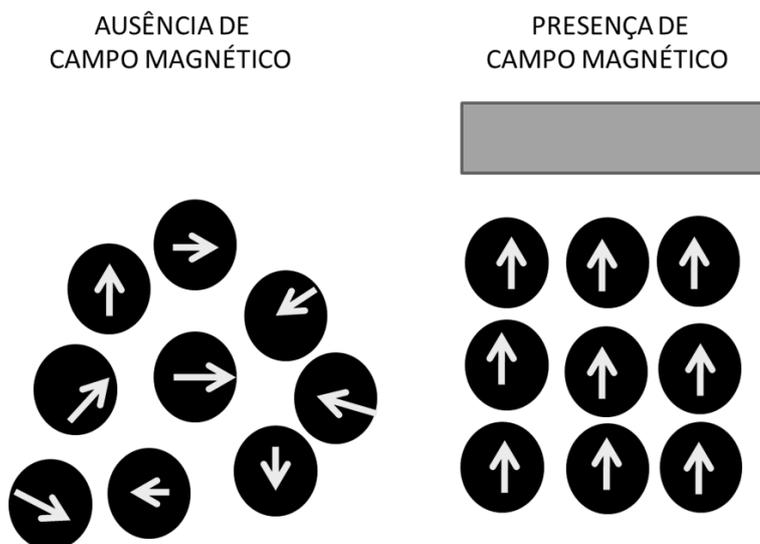
Figura 6 - Estrutura do tensoativo ácido láurico.



Fonte: Própria autora.

O grande interesse dos fluidos magnéticos em aplicações biomédicas é devido a sua propriedade superparamagnética que consiste em apresentar magnetização apenas na presença de campo magnético externo (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012). O superparamagnetismo provém de um momento magnético atômico, ou seja, a presença de átomo com elétron desemparelhado, que sob influência de campo magnético externo se magnetiza e se orienta em direção a este campo. Enquanto, a ausência do campo magnético externo não apresenta magnetização como mostrado na Figura 7 (COLOMBO et al., 2012; KUCHERYAVY et al., 2013; SHEVTSOV et al., 2014).

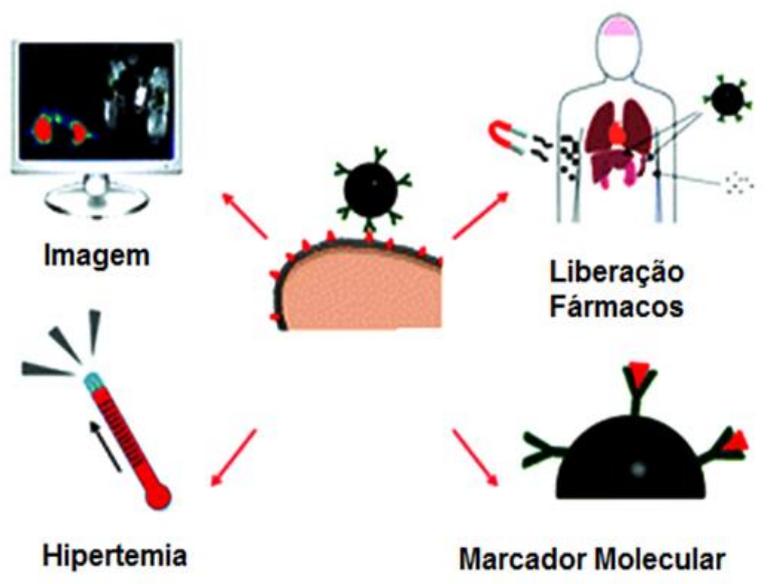
Figura 7 - Esquema do superparamagnetismo.



Fonte: Própria autora.

Diversos estudos demonstram que nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser aplicadas na área biomédica (Figura 8) (COLOMBO et al., 2012). Principalmente, a vetorização com marcadores moleculares (BUSQUETS; SABATÉ; ESTELRICH, 2014), a liberação de fármacos (GRUMEZESCU et al., 2014), diagnóstico por imagem por ressonância magnética nuclear (KASTEN et al., 2014) e hipertermia magnética (BALDI et al., 2014).

Figura 8 - Aplicações biológicas de nanopartículas magnéticas.



Fonte: (COLOMBO et al., 2012) adaptado.

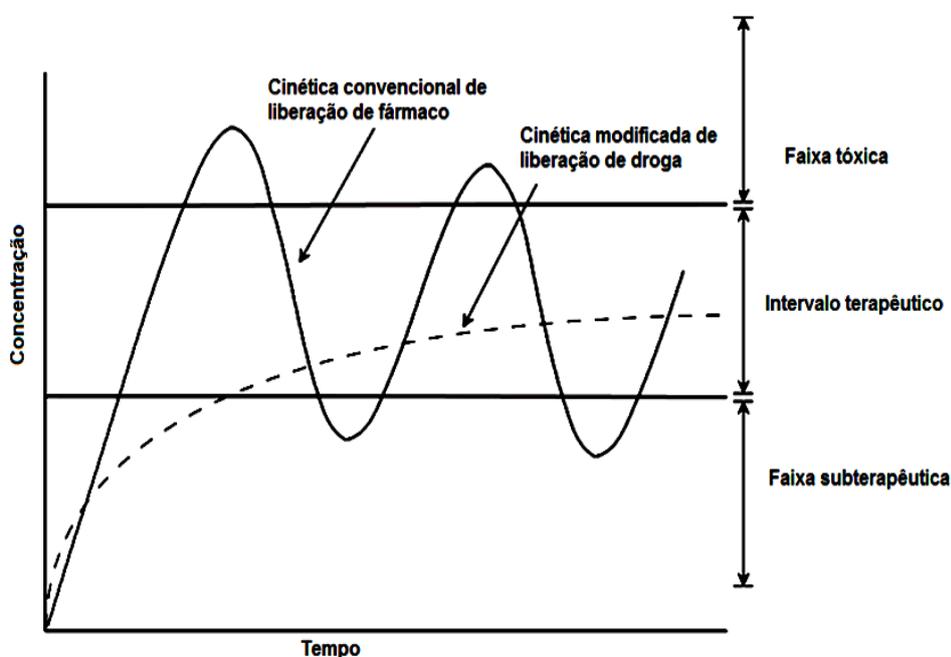
2.3 Sistemas Liberação e Vetorização de Fármacos

Os maiores problemas na administração de medicamentos referem-se, ao grande desconforto do paciente em administrar várias doses para manter o nível sérico do fármaco no organismo e a grande quantidade de efeitos colaterais e tóxicos devido a sua não seletividade (MOHSENI; GILANI; MORTAZAVI, 2015).

A possibilidade de carregamento de fármacos é muito interessante, uma vez que, o seu direcionando possa evitar a sua interação a outros órgãos ou tecidos que não sejam de interesse de atuação. Assim o sistema de liberação controlada pode minimizar os efeitos colaterais e tóxicos, e, também aumentar o intervalo entre as doses para proporcionar maior conforto ao paciente e consequentemente maior adesão ao tratamento (YEN; PADMANABHAN; SELVAN, 2013).

A Figura 9 ilustra que a concentração do fármaco na liberação modificada permaneceu constante e dentro do intervalo terapêutico. Ao passo que a concentração do fármaco na liberação convencional oscilou atingindo à faixa tóxica após sua liberação e à faixa subterapêutica ao termino de sua meia vida.

Figura 9 - Cinética de liberação de fármacos.



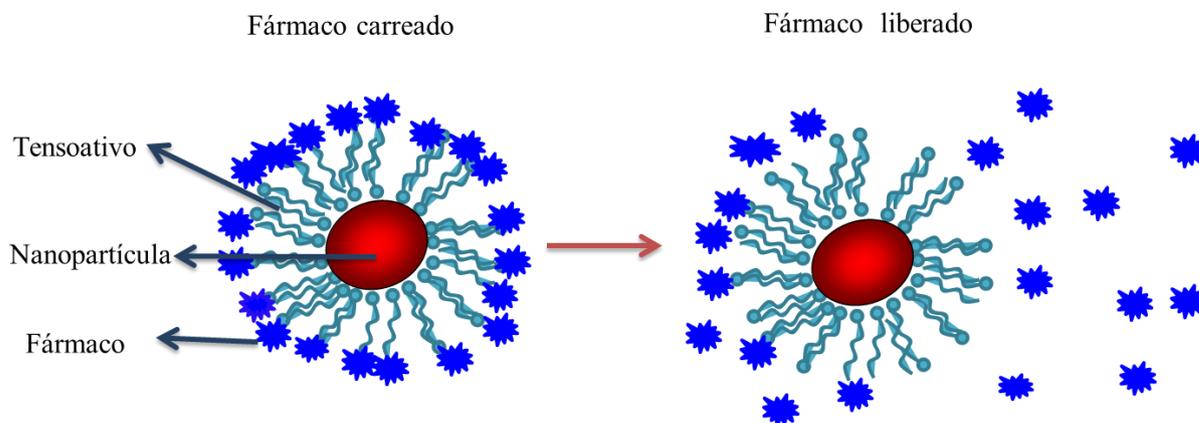
Fonte: (JANSSEN et al., 2014) adaptado.

Uma abordagem promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada é baseada na adsorção de nanopartículas magnéticas na sua forma de fluido magnético a um fármaco (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012).

Vários estudos demonstraram que o transporte e a liberação controlada de fármacos pelas nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro são possíveis, devido as suas propriedades superparamagnéticas de serem orientadas por campo magnético e pelas suas propriedades carreadoras adquiridas após revestimento por polímeros e tensoativos biocompatíveis. Estes agentes de funcionalização quando associados às nanopartículas possibilitam adsorção e o direcionamento de fármacos acoplados a sua superfície e podem promover a liberação controlada de fármacos (Figura 10) (TOD et al., 2014; LAURENT et al., 2008; HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014b; XIONG et al., 2015).

Istrate et al., (2014) observou maior fluidez de membrana, quando associou antibióticos a nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em relação a antibióticos livres. Além disso, verificou-se que nanopartículas de magnetita mostraram semelhante padrão de biodistribuição e transportados através no fluxo sanguíneo.

Figura 10 - Esquema do carregamento e liberação de fármacos.



Fonte: Própria autora

Partindo do princípio de que a internalização de nanopartículas ocorre por meio de endocitose de membrana, o aumento da fluidez da membrana favorece a taxa de penetração dos antibióticos transportados, permitindo assim uma absorção mais eficiente da droga. (ISTRATE et al., 2014)

Estudos abordam que as nanopartículas tendem a se localizar, principalmente dentro dos pulmões. Assim, sugere-se que a sua adsorção a antibióticos poderia ser uma alternativa

menos tóxica para tratamentos de pacientes afetados por infecções recorrentes do pulmão com a tuberculose, por exemplo, que necessitam de antibióticos por um longo período (HUH; KWON, 2011).

2.4 Outros Usos das Nanopartículas

Como diagnóstico, as nanopartículas podem ser empregadas como contraste no diagnóstico por imagem por ressonância magnética nuclear, para aumentar a qualidade de imagens e na localização de neoplasmas precoces (BERMAN; WALCZAK; BULTE, 2011).

O mecanismo da ressonância magnética nuclear consiste no alinhamento de prótons de hidrogênio a um campo magnético externo. Os prótons de hidrogênio da água presente no tecido a ser diagnosticado, quando submetido a uma frequência de radiação, sofre uma perturbação e quando esses prótons voltam ao seu estado normal, a imagem é obtida (SINGH et al., 2014). Tecidos diferentes apresentam velocidades diferentes de retornos dos prótons. E devido a esta peculiaridade, as imagens apresentam contrastes de contornos para diferenciar as estruturas biológicas de interesse (SHEVTSOV et al., 2014).

Como as atividades metabólicas de células doentes são diferentes de células saudáveis, a ressonância magnética promove a grande vantagem de identificar essas diferenças por meio das imagens e dessa forma é possível monitorar o avanço das doenças, sendo uma poderosa ferramenta para o diagnóstico e tratamento neoplásico (BIGINI et al., 2012).

Muitas formulações de nanopartículas magnéticas foram desenvolvidas e já estão no mercado para serem utilizadas como contrastes em ressonância magnética nuclear, como o Endorem (BIGINI et al., 2012), Feridex IV® (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012) e Combidex® (MUDSHINGE et al., 2011). Pesquisas atuais na área de ressonância magnética nuclear para a terapia oncológica buscam aperfeiçoar as interações das nanopartículas a fim de melhorar a nitidez das imagens, reduzir a quantidade administrada de contraste e aprimorar a funcionalização das nanopartículas para que o contraste atinja o sítio desejado (ITTRICH et al., 2013).

Além disso, estudos com marcadores de peptídeos de câncer de próstata associados às nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro observaram o acúmulo de material em região específica, identificando com precisão o local da lesão. Além disso, apresentaram melhor qualidade nas imagens por ressonância magnética nuclear (FUCHSJÄGER et al., 2008).

Os marcadores fluorescentes também estão sendo utilizados em testes combinados com nanopartículas para entrega de drogas guiada por imagem como uma nova plataforma de diagnósticos (JING et al., 2010; YEN; PADMANABHAN; SELVAN, 2013). Wankhede et al. (2012), verificou que a adsorção de nanopartículas magnéticas a anticorpos monoclonais permitiram a detecção precoce de micrometástase em tumores de cérebro.

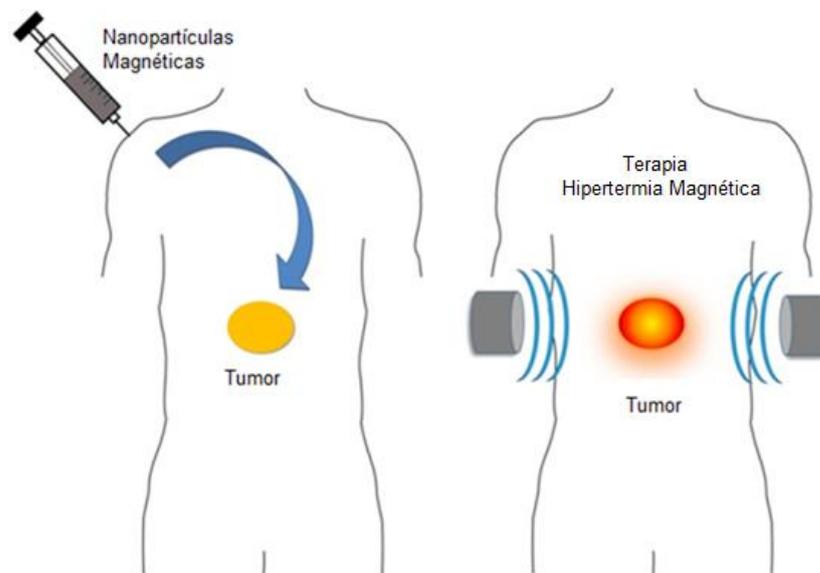
Além de agentes de contraste para diagnóstico, vários estudos destacam o uso desses sistemas magnéticos a terapia oncológica, aplicados as técnicas de hipertermia e de vetorização de quimioterápicos (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012; WANKHEDE et al., 2012; HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014b).

A hipertermia é o aumento acima do normal da temperatura corpórea. Elevações altas de temperatura podem alterar a homeostasia corporal e causar danos em tecidos (YEN; PADMANABHAN; SELVAN, 2013). A partir deste conceito, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de provocar o aumento da temperatura em lugares específicos com o intuito de provocar danos seletivamente em regiões neoplásicas.

Para promover o processo de hipertermia, os fluidos de nanopartículas superparamagnéticas de óxido ferro são funcionalizados para se associarem a anticorpos e serem usadas como vetores até a região do sítio-alvo. As nanopartículas são orientadas por meio de um campo magnético externo até o local do tumor (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014b).

Com a aplicação de correntes alternadas de força e frequência, as nanopartículas absorvidas pelas células cancerosas dissipam calor e provocam a elevação da temperatura, em torno de 46°C a 48°C no local do tumor. Esse aumento de temperatura propicia a morte das células tumorais neoplásicas, uma vez que estas são menos resistentes a elevações de temperaturas do que células normais e saudáveis (Figura 11) (ANDRADE et al., 2011; BALDI et al., 2014; SINGH et al., 2014).

Figura 11 - Hipertermia magnética.



Fonte: (ANDRADE et al., 2011) Adaptado.

2.5 Ensaios Biológicos

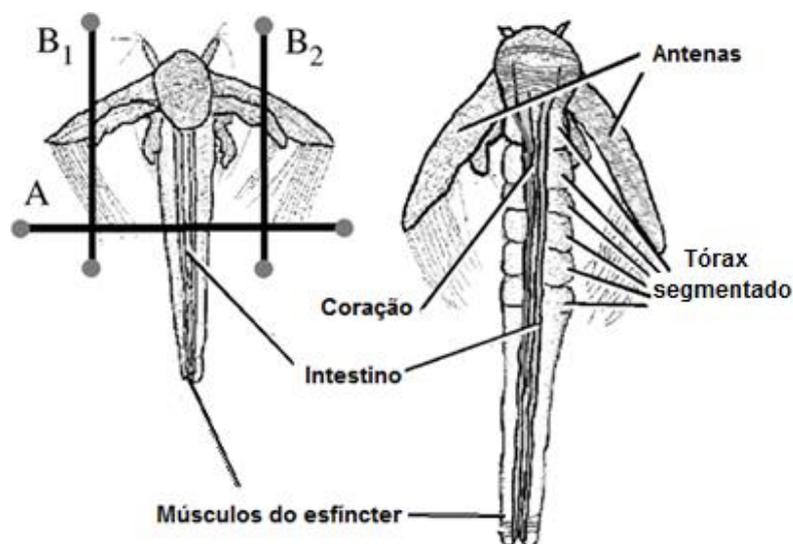
2.5.1 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo do Filo *Artropoda*, do subfilo *Crustacea*, da classe *Branchiopoda*, da subclasse *Sarsostraca*, da ordem *Anostraca*, da família *Artemiidae*, do gênero *Artemia* Leach. Para este gênero temos espécies como *Artemia monica*, *Artemia franciscana*, *Artemia tibetiana* e *Artemia salina* (SORGELLOOS et al., 1986; NASCIMENTO et al., 2008).

Seu corpo é dividido em três partes: cabeça, tórax e abdômen (DVORAK; BENOVA; VITEK, 2012) (Figura 13). A cabeça comporta dois olhos pedunculados, um olho naupliano, duas antênulas e duas antenas. A *Artemia salina* é caracterizada por possuir um ciclo de vida curto que compreende os estágios de cisto, náuplios, metanáuplios, pré-adultos e adultos (IGARASHI, 2008).

As artêmias são encontradas em sistemas marinhos e são caracterizadas por possuir uma alta capacidade reprodutiva e adaptativa em ambientes adversos. São amplamente utilizadas como fonte viva alimentar de uma grande variedade de organismos marinhos (GAMBARDELLA et al., 2014; NUNES et al., 2006; RAJASREE et al., 2010).

Figura 12 - *Artemia Salina* (náuplio e adulto).



Fonte: (DVORAK; BENOVA; VITEK, 2012) adaptado.

Este microcrustáceo se alimenta principalmente de bactérias e algas. As artêmias filtram uma grande quantidade de água que percorre seu sistema digestivo. Ambientes com altas concentrações de partículas podem provocar a redução do seu processo de filtração, uma vez que as partículas podem se acumular no seu intestino (GAMBARDELLA et al., 2014; NUNES et al., 2006).

As artêmias possuem uma grande interação com o ambiente aquático e enfrentam maior risco de exposição a poluentes, que outras espécies aquáticas. Esta característica faz com que ela seja um valioso organismo disponível para monitoramento marinho e para ensaios de ecotoxicidade (GAMBARDELLA et al., 2014).

Além disso, as artêmias são comumente utilizadas em várias pesquisas nas áreas de biologia celular, ecologia, toxicologia, fisiologia e genética (CORRÊA; PENAFORT, 2011), na avaliação de produtos como pesticidas, derivados petroquímicos, metais pesados, derivados carcinogênicos (BEVILACQUA et al., 2008; LIMA et al., 2011). O grande interesse de se utilizar artêmias é devido a sua vantagem de possuir boa homogeneidade entre os ovos e entre os indivíduos recém-eclodidos, chamados náuplios (larvas) (ATES et al., 2013a,b,c).

O bioensaio de letalidade de náuplios de *Artemia salina* é utilizado como método alternativo para a determinação da toxicidade. Este ensaio é utilizado para avaliar a toxicidade dos compostos pela determinação da concentração letal média (CL₅₀) de 50% da população do microcrustáceo *Artemia salina* (ARULVASU et al., 2014; MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

Apesar de ser um teste relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade, de forma rápida, econômica e reprodutiva (LIMA et al., 2011), além de gerar poucos resíduos ao meio ambiente (MEYER et al., 1982). Sendo, útil no processo de descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais (LAGARE; ABRENICA-ADAMAT, 2015) e em estudos com nanopartículas de diversos materiais (RAJABI et al., 2015; (GAMBARDELLA et al., 2014). O estudo da nanotoxicologia pode trazer uma importante contribuição para o desenvolvimento de uma nanotecnologia sustentável e segura (ARULVASU et al., 2014).

Além disso, o ensaio de toxicidade em *Artemia salina* vem de encontro às recomendações do PARLAMENTO EUROPEU e o CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, de reduzir a quantidade de animais vertebrados usados em testes de toxicologia. O documento recomenda também o uso métodos alternativos com animais invertebrados e cultura de células órgãos e tecidos (63-UE 2010).

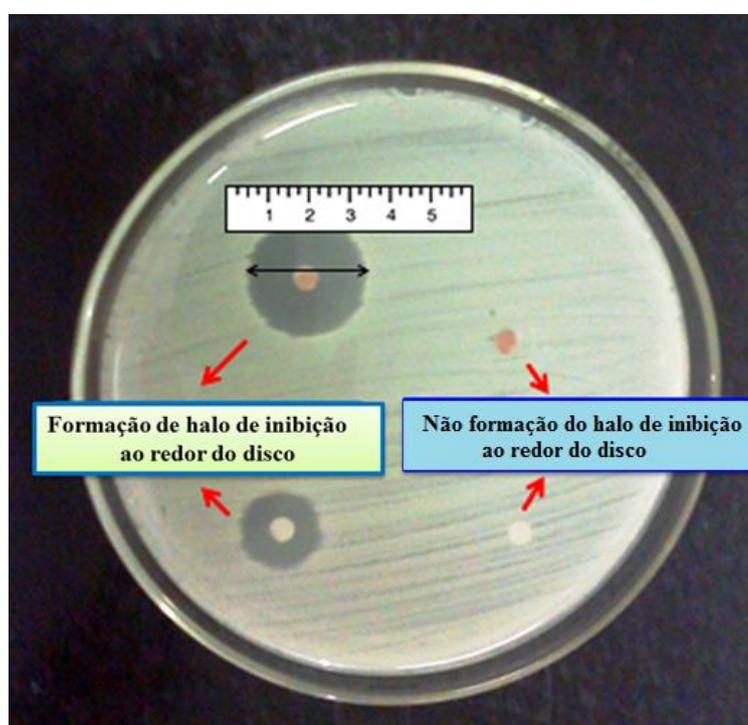
2.5.2 Métodos de Difusão em Disco

O teste de Kirby-Bauer de difusão em disco é o método mais comum para testes de susceptibilidade a antibióticos. Os resultados de tais testes auxiliam médicos em escolhas mais seguras de antibióticos em quadros infecciosos. Este teste é aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* (M2-A8, 2003).

O teste de difusão em disco é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância impregnada em discos de papel em meio de cultura sólida. Neste ensaio, faz-se a relação entre o tamanho do halo de inibição de crescimento do microrganismo desafiado e a concentração da substância testada (OSTROSKY et al., 2008; AZAM et al., 2012).

A aplicação do método de difusão se limita a micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. Se a substância impregnada ao disco for susceptível, o organismo testado não será capaz de crescer na área circundante do disco, mostrando uma zona de inibição (PINTO et al., 2014). A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo). O tamanho do diâmetro da zona ou halo de inibição de crescimento é mensurado em milímetros (OSTROSKY et al., 2008) conforme Figura 12.

Figura 13 – Ilustração de discos que apresentaram halos de inibição e discos que não halos de inibição contra a cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Própria autora.

Uma padronização rigorosa na execução do teste deve ser realizada, a fim de controlar o meio de cultura, o inóculo e as condições de incubação (OSTROSKY et al., 2008) conforme Figura 12.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter um nanosistema de rifampicina adsorvida a nanopartículas de óxido de ferro, realizar sua caracterização química e atividade biológica.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Preparação do Nanosistema

Sintetizar nanopartículas de óxido de ferro; realizar a funcionalizar as nanopartículas com ácido láurico; obter nanopartículas oxidadas e promover a adsorção da rifampicina ao fluido.

3.2.2 Caracterização do Nanosistema

O estudo de caracterização foi realizado por meio das técnicas de:

Espectroscopia de absorção atômica (AAS); Espectroscopia eletrônica na região ultravioleta-visível (UV-vis); Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FTIR); Calorimetria exploratória diferencial (DSC); Difractometria de raios X (DRX) e Espalhamento dinâmico da luz (DLS).

3.2.3 Ensaio Biológicos do Nanosistema

- Avaliar a toxicidade dos nanosistema em ensaio de letalidade em *Artemia salina*; analisar *Artemias salinas* por Microscópica Óptica e avaliar a atividade antimicrobiana do nanosistema pelo método de difusão em disco.

4 MATERIAL

4.1 Equipamentos Utilizados

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Química Orgânica, Enzimologia, Análises Instrumental e Microbiologia as dependências da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Anápolis, e no laboratório de Central Analítica da Universidade Federal de Goiás, campus Sambambaia. Foram utilizados os seguintes equipamentos:

Agitador mecânico Fisatom Modelo 713;

Autoclave vertical FANEN modelo 415;

Banho de ultrassom Quimis;

Calorímetro diferencial de varredura (DSC) Shimadzu;

Chapa aquecedora Fisaton;

Difratômetro de raios X (DRX) Shimadzu, modelo XRD 6000;

Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer Analyst 400;

Espectrofotômetro Perin Elmer UV-vis Spectrometer modelo Lambda 25;

Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR) Perkin Elmer Spectrum 400;

Estufa bacteriológica FANEN 502;

Lupa microscópica Bel;

Microscópio ótico Leical;

Vortex Modelo AP-56 PHOENIX e

Zetasier Nano ZS90 da marca Malvern Instrument

4.2 Reagentes Utilizados

Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram padrão comercial.

Reagentes	Fabricantes
Ácido clorídrico	Synth
Ácido láurico	Vetec Química Fina
Cloreto de ferro (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	J. T. Baker
Cloreto de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	J. T. Baker
Cloreto de sódio	Vetec Química Fina
Dicromato de potássio	Vertec Química Fina
DMSO	Synth
Hidróxido de sódio	Dinâmica
Meio caldo BHI	Himedia
Meio de cultura Agar Muller Hinton	Himedia
Membrana de celulose semipermeável	Inlab
Rifampicina	Sigma-Aldrich
Solução concentrada de amônia (NH_3) a 25%,	Synth

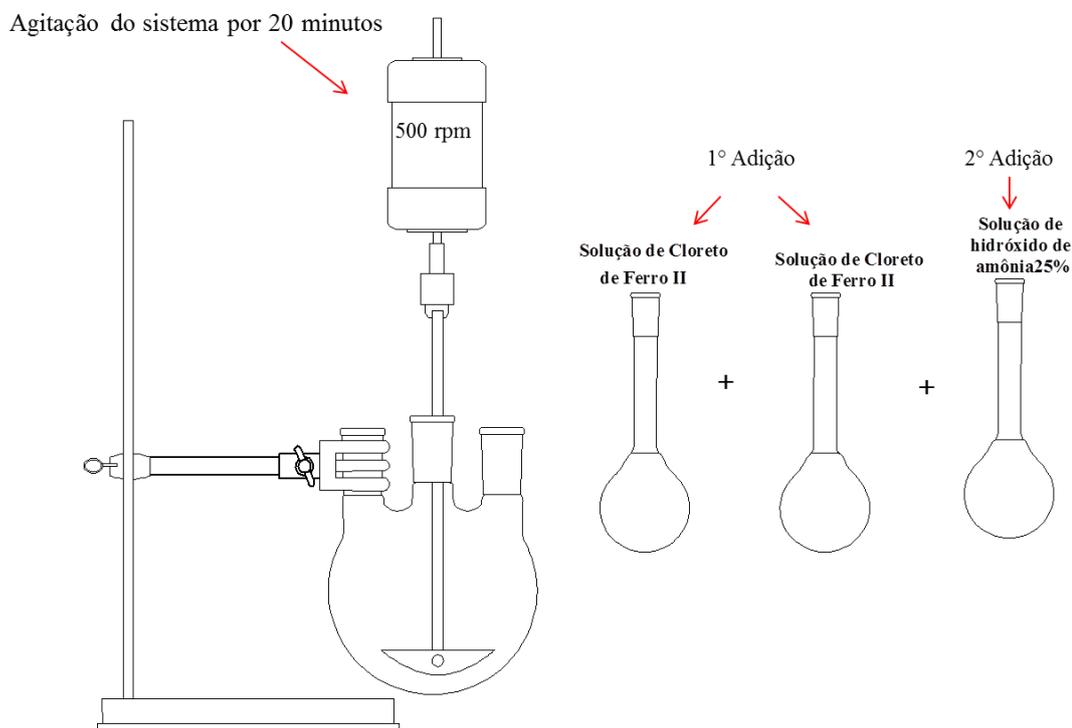
5 METODOLOGIA

5.1 Síntese

5.1.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro

A síntese das nanopartículas de óxido de ferro foi realizada a partir da coprecipitação dos íons Fe (II) e Fe (III) em meio alcalino (EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1999). Brevemente, a partir dos seguintes reagentes: 12 gramas de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 24 gramas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em volume de 50mL cada uma, soluções $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. As soluções foram misturadas em velocidade de 500 rotações por minuto (RPM), em seguida foram adicionados 100 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio (25%) (KHALAFALLA; REIMERS, 1980; LOPEZ et al., 2010) seguida de agitação por 20 minutos em temperatura ambiente (Figura 14).

Figura 14 - Esquema da síntese de nanopartículas pelo método de coprecipitação.



Fonte: Própria autora

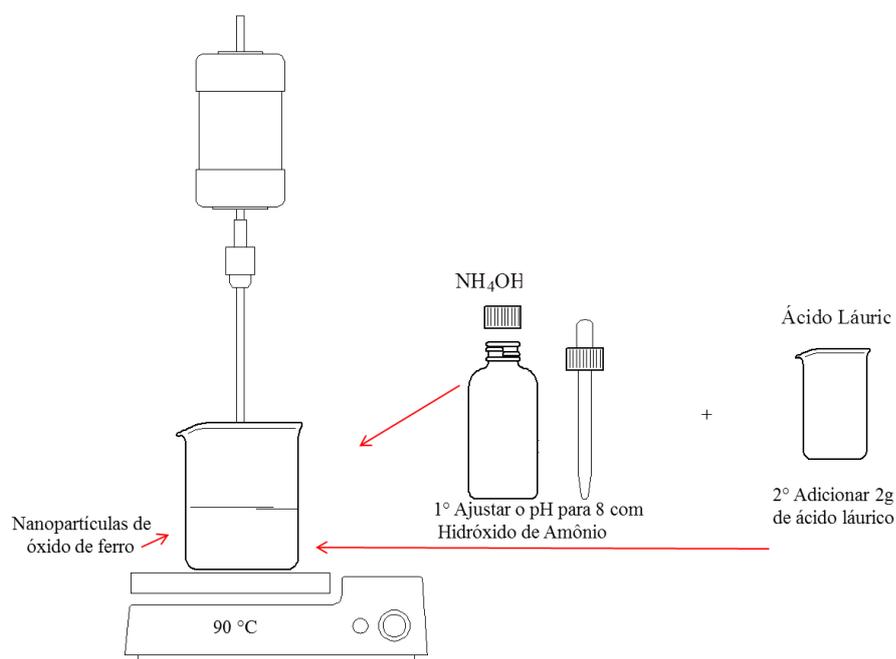
Após o referido período as partículas foram sedimentadas com o auxílio de um imã de neodímio 400 gauss e o sobrenadante removido. Em seguida foram adicionados 100 mL de água destilada às partículas, e novamente foi efetuada a sedimentação magnética, procedimento repetido por mais duas vezes.

Uma alíquota deste material foi isolada e liofilizada no Laboratório de Análises Instrumental da Universidade Estadual de Goiás (UEG) para posteriores análises de caracterizações do sólido.

5.1.2 Funcionalização das Nanopartículas com Ácido Láurico a

Sob aquecimento (90°C) e agitação constante, nanopartículas de óxido de ferro produzidas como descrita anteriormente, foram funcionalizadas a partir da adição de 2,0g de ácido láurico (FERREIRA et al., 2015) e correção do pH do sistema para 8, com adição de algumas gotas de solução de hidróxido de amônio. Manteve-se o aquecimento e agitação por 20 minutos.

Figura 15 - Esquema da funcionalização das nanopartículas.



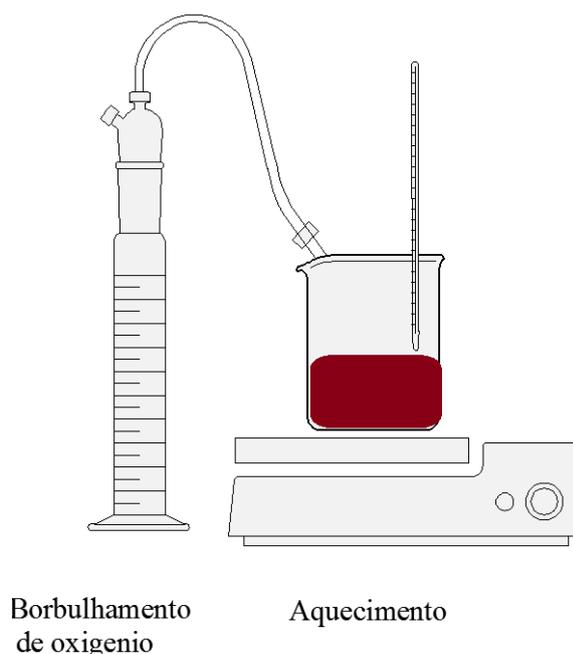
Manter o sistema sob aquecimento e agitação constante por 20 minutos

Fonte: Própria autora

5.1.3 Oxidação das Nanopartículas Funcionalizadas

As partículas funcionalizadas anteriormente (seção 5.1.2) foram oxidadas via oxigênio borbulhado sob aquecimento (90 °C) por 8 h. Durante o aquecimento, por diversas vezes, foi adicionada água destilada para evitar a secura do sistema.

Figura 16 - Esquema da oxidação das nanopartícula funcionalizadas.



Fonte: Própria autora

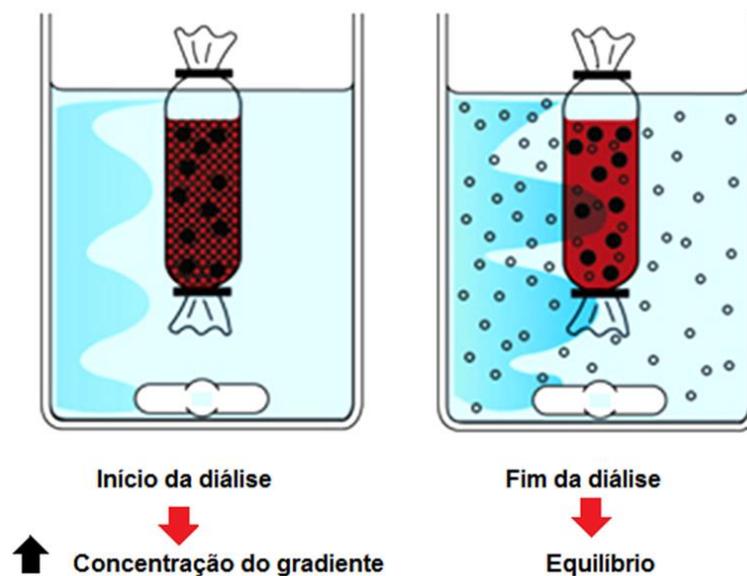
5.1.4 Processo de Diálise e Esterilização do Fluido

Para o processo da diálise, o fluido foi colocado dentro de uma membrana semipermeável em água deionizada e submetido à agitação, conforme ilustrado no exemplo da Figura 14. A água do recipiente foi trocada até a verificação da redução da condutividade da água, com um auxílio de um condutímetro digital Instrutherm: Conductivity Meter CD – 860 com compensação automática de temperatura e escala de medição entre $0,00 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $19,99 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Após a etapa de diálise foi realizado o processo de esterilização dos fluidos magnéticos em um autoclave por 45 minutos a temperatura de 121°C.

Uma alíquota significativa deste fluido foi isolada e liofilizada no Laboratório de Análises Instrumental da Universidade Estadual de Goiás (UEG) para posteriores análises de caracterizações do sólido.

Figura 17 - Esquema de diálise do fluido.



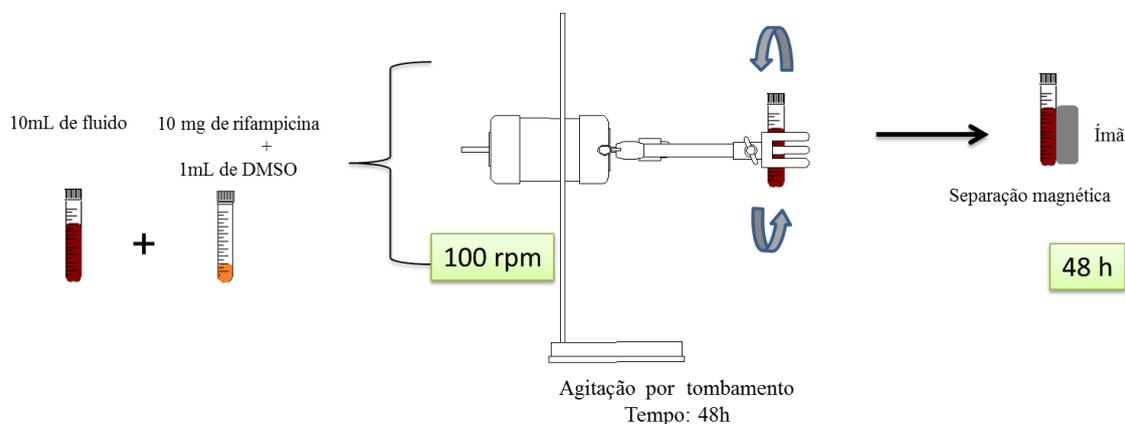
Fonte: <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html> Adaptado

5.1.5 Adsorção da Rifampicina ao Fluido.

Para o sistema de adsorção do fármaco, em frasco esterilizado foram adicionados 22 mg de rifampicina previamente solubilizadas em 1mL de dimetilsufóxido (DMSO) e 10 mL do fluido magnético (FERREIRA et al., 2015). Depois esse sistema foi submetido à agitação constante por 48 horas. Em seguida o sistema foi submetido à separação magnética com o auxílio de um ímã de neodímio (400 Gauss) que foi colocado na parte externa do frasco (Figura 16).

Após 48 horas de separação magnética as partículas de óxido de ferro se deslocaram em direção ao ímã, separando-se da fase líquida e ocasionando a formação de um sobrenadante, que foi retirado e armazenado para quantificação de rifampicina não adsorvida. Em seguida o sistema este sistema completado com água deionizada e estéril para realização de nova separação magnética. Esse processo foi repetido por 13 vezes até a retirada do fármaco não incorporado ao sistema. Ao final do ensaio, todos os sobrenadantes retirados foram enviados para análise de teor do fármaco não incorporado. Parte do material foi liofilizado no Laboratório de Análises Instrumental da (UEG) e reservado para posteriores caracterizações. O composto resultante desta etapa foi denominado de rifampicina adsorvida ao fluido.

Figura 18 - Esquema de adsorção da rifampicina ao fluido.



Fonte: Própria autora

5.2 Caracterização dos Compostos

5.2.1 Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)

A concentração de ferro total da amostra do fluido foi determinada por espectroscopia de absorção atômica. As medidas foram realizadas no laboratório de Análises Instrumental da (UEG) em um equipamento Perkin Elmer Analyst 400. Na determinação da concentração de ferro foi utilizada uma curva padrão nas concentrações de 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm e 100 ppm.

Para a abertura da amostra, 100 μ L do fluido foram dissolvidos com 1 mL de ácido clorídrico concentrado a quente, em seguida transferiu a solução para um balão de 50 mL e completou-se o volume com água deionizada. As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

5.2.2 Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta-Visível (UV-vis)

A análise de espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-vis) foi utilizada para determinar o teor de rifampicina não incorporado ao fluido após a separação magnética. Essa análise foi realizada no equipamento Perkin Elmer UV-vis Spectrometer modelo Lambda 25 do Laboratório de Análises Instrumental da (UEG).

5.2.3 Espectroscopia Vibracional de absorção na Região do Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada com o intuito de obter informações a respeito dos grupos funcionais e ligações presentes nos compostos (CASILLAS; GONZALEZ; PÉREZ, 2012). As amostras foram caracterizadas por espectroscopia a fim de investigar a presença do ácido láurico na superfície das nanopartículas e a presença da rifampicina ao sistema. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 400, com região espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} , em pastilhas de KBr no Laboratório de Análises Instrumental da (UEG).

5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com o objetivo de verificar a estabilidade térmica dos compostos, foi realizada a análise de calorimetria exploratória diferencial no equipamento Shimadzu do Laboratório de Análises Instrumental da (UEG) em atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e vazão de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, no intervalo de temperatura entre 25 e 500°C , em cadinhos de Al parcialmente fechados e massas de amostras em torno de 2 mg. A célula DSC foi calibrada empregando as substâncias padrão índio e zinco metálicos com pureza de 99,99%.

5.2.5 Difratometria de Raios X (DRX)

As amostras de nanopartículas de magnetita e maghemita foram analisadas por difração de raios X (DRX) utilizando amostras em pó, previamente liofilizadas. Os difratogramas foram obtidos pelo equipamento Shimadzu, modelo XRD 6000, presente no laboratório de Central Analítica da Universidade Federal de Goiás (UFG). As análises foram realizadas no intervalo de $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$, com fonte de radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), sob corrente de 30 mA e tensão de 40 KV a uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{m}$. O padrão silício cristalino foi utilizado para calibração do DRX.

Para dimensionar o tamanho médio dos cristalitos utilizou-se a equação de Debye-Scherrer (CULLITY, 1978; CULLITY; STOCK, 2001).

Equação 1

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Em que:

D é o diâmetro do cristalito;

0,9 é o fator de correção;

λ é o comprimento de onda dos raios-X;

θ é o ângulo de difração do pico mais intenso;

b é a largura a meia altura do pico de difração mais intenso;

B é o valor corrigido de largura de linha à meia altura em relação à amostra padrão
 $B = \sqrt{B_{amostra}^2 - B_{padrão}^2}$.

5.2.6 Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering - DLS)

A determinação do diâmetro hidrodinâmico (tamanho médio das nanopartículas), do potencial zeta (carga de superfície das nanopartículas) e do índice de polidispersão (IPD) foram realizadas no equipamento Zetasier Nano ZS90 da marca Malvern Instrument. Este equipamento utiliza a técnica de espalhamento dinâmico da luz até temperatura de 24°C. As amostras foram diluídas na proporção 1:100 (amostra : água) em água deionizada, acondicionadas em um porta amostra e levadas ao equipamento. Foram preparadas amostras e as leituras foram realizadas em triplicata.

5.3 Ensaios Biológicos

5.3.1 Toxicidade dos Compostos pelo Ensaio de Letalidade em *Artemia salina*.

Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços com as concentrações de 800, 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina, de 3000, 1500, 750, 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para íons ferro da amostra do fluido. Já para a amostra de rifampicina adsorvida ao fluido, por se tratar de uma mistura, as concentrações foram de 550, 275, 137,5 e 68,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para rifampicina e 3000, 1500, 750 e 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os íons ferro, conforme tabela 2.

Tabela 1 - Concentrações dos compostos testados para realização do ensaio de letalidade em larvas de *Artemia salina*.

Compostos	[Rifampicina] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[Ferro total] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[Dicromato de potássio] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Rifampicina	800; 400; 200; 100; 50	-	-
Rifampicina adsorvida ao fluido	550; 275; 135,5; 68,76	3000; 1500; 750; 375	-
Fluido	-	3000; 1500; 750; 375	-

Além desses, foram realizados os testes de controle de solvente residual (RAHMATULLAH et al., 2010) com DMSO a 5%, de controle de viabilidade somente com água marinha sintética e do controle positivo com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para este ensaio foi preparado um meio contendo 1000 mL de água marinha sintética na concentração de 40 g.L^{-1} de sal marinho e acrescido de 6 mg.L^{-1} de extrato de leveduras. Este meio foi esterilizado em autoclave.

Para a produção do artemilheiro, ovos de *Artemia salina* foram incubados por 36 h sob iluminação natural, temperatura ambiente e aeração constante para eclosão das larvas (náuplios) em água marinha sintética (ATES et al., 2013c). Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, coletados e transferidos para uma placa de Petri. Em seguida o meio foi refrescado com a adição de água salina (ATES et al., 2013a,b,c; MEYER et al., 1982; MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006; NGUTA et al., 2011).

O bioensaio foi realizado em microplaca de poliestireno estéril de 96 poços. Náuplios foram distribuídos na placa, padronizando um total de 10 ± 1 de indivíduos em 100 μL de água marinha em poços previamente determinados (MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006). Em seguida, foram acrescentadas nestes poços 100 μL de cada diluição previamente preparada dos compostos do estudo.

Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem de artêmias vivas e mortas ou imóveis por mais de 10 segundos (FERRAZ FILHA et al., 2012; MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006). Os ensaios foram realizados em triplicata e de maneira independente, totalizando 90 indivíduos expostos para cada concentração. A figura 19 apresenta um esquema geral da do ensaio de letalidade em *Artemia salina*.

Figura 19 - Esquema do ensaio de letalidade em *Artemia salina*Cistos de *Artemia salina*

Incubação do artemilheiro

Contagem do número de náuplios mortos/vivos por poço para cálculo de CL_{50} 

Transferência dos náuplios para a placa de poliestireno e adição dos compostos

Fonte: Própria autora

Os resultados da contagem permitiram o cálculo da CL_{50} com intervalo de confiança de 95% pelo programa probit (FERRAZ FILHA et al., 2012) *Statplus Pro V5 2015 professional* (AnalystSoft).

O critério proposto por Nguta et al. (2011) foi utilizado para a classificação do nível de toxicidade. Foi considerado como toxicidade alta valores de CL_{50} até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade baixa CL_{50} entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.3.2 Análise Microscópica

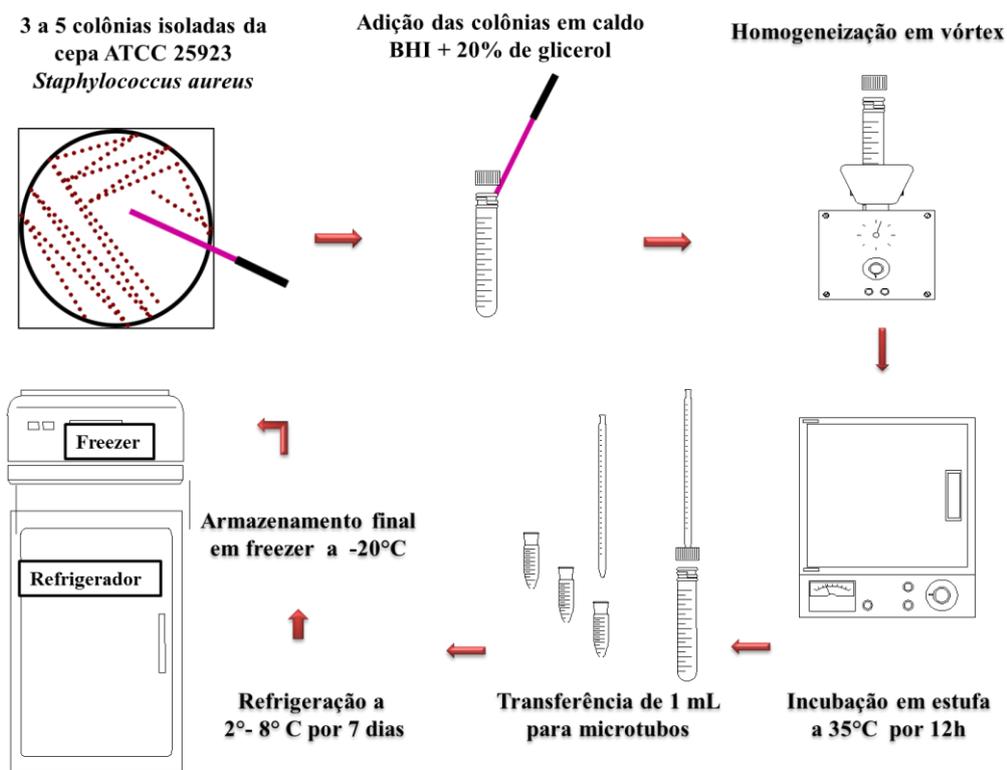
As larvas foram observadas sob um microscópio Leica DMRB (Leica, Suíça). As imagens foram obtidas utilizando câmara CCD DFC420C Leica e o *software* Leica (*Leica Application Suite LAS EZ*). As imagens resultantes foram armazenadas e visualizadas no programa de software Leica, utilizando o formato de imagem TIFF com resolução de 1600 x 1200.

5.3.3 Manutenção das cepas

Para a manutenção da cultura bacteriana, cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram repicadas pelo método de esgotamento em estrias com alça de platina. Após o replique em meio sólido ágar Mueller Hinton, as placa foram incubadas a 35°C por 24 horas.

Após a incubação, pelo menos três a cinco colônias isoladas do mesmo tipo morfológico foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) + 20% de glicerol. O tubo foi homogeneizado em agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos e em seguida incubado por 12 horas a 35°C em estufa bacteriológica. Após este período, a suspensão do tubo foi fracionada em alíquotas de 1 mL em microtubos tipo Eppendorfs, previamente esterilizados e identificados. Por fim, os microtubos foram armazenadas em geladeira a temperatura de 2°C a 8°C por 7 dias e em seguida armazenados em freezer a temperatura de -20°C (SILVA; COSTA; CHINARELLI, 2008; M7-A6, 2003; M2-A8, 2003), conforme a Figura 20.

Figura 20 - Esquema de manutenção das cepas de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Própria autora

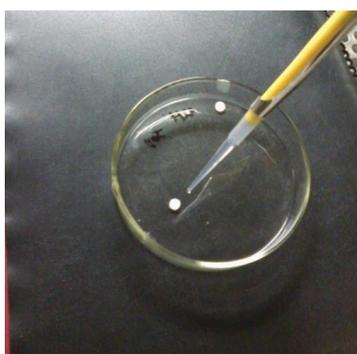
5.3.4 Atividade Antimicrobiana dos Compostos pelo Método de Difusão em Disco

A atividade antimicrobiana dos compostos foi definida pelo teste de difusão em disco contra a cepa padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) mantidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Anápolis. O ensaio seguiu as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testes de sensibilidade antimicrobiana de bactérias que crescem em aerobiose (M2-A8, 2003).

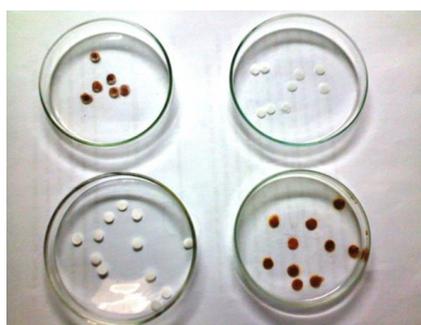
Previamente, conforme metodologia (EL-SAYED, 2016) foi realizada a impregnação dos discos com os compostos do estudo. Foram depositadas assepticamente 10 μL de amostra sobre discos de papel de 6 mm com auxílio de micropipeta, como ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Esquema de impregnação dos discos de papel com os compostos do estudo.

Adição dos compostos aos discos



Discos impregnados com os compostos



Fonte: Própria autora

Para a realização do ensaio, cepas foram reativadas em ágar Mueller Hinton, pela técnica do esgotamento para obtenção de colônias isoladas. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 16 a 18 horas.

Em seguida, sucintamente, foram ajustadas suspensões bacterianas com 3 a 5 colônias de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em solução salina estéril (NaCl 0,9%) até a obtenção da escala 0,5 de McFarland, com densidade de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Com auxílio de *swabs* estéreis as suspensões foram semeadas em placas de Petri com ágar Mueller Hinton.

Posteriormente, foram colocados sobre a placa de Petri discos de papel impregnados com rifampicina (na concentração de $5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), fluido (na concentração de $6000\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de íons ferro) e rifampicina adsorvida ao fluido (nas concentrações de $5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$

¹ de rifampicina com 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de íons ferro e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina com 6000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de íons ferro) de acordo com a Tabela 1.

Além desses compostos, foram utilizados discos com controle da técnica (padrão comercial de rifampicina a 30 μg) e controle negativo (DMSO a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para validar a técnica em meio ágar Mueller Hinton (CLSI).

Tabela 2- Concentração dos compostos para teste de difusão em disco contra a cepa *Staphylococcus aureus*.

Compostos	[Rifampicina] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[Ferro Total] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Rifampicina	500	-
Rifampicina	5	-
Rifampicina adsorvida ao fluido	500	6000
Rifampicina adsorvida ao fluido	5	60
Fluido	-	6000

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18h a 24 h. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi mensurado em milímetros (mm) (RODRÍGUEZ et al., 2014). A Figura 22 apresenta o esquema geral do ensaio de difusão em disco.

Figura 22 - Esquema do ensaio de difusão em disco.



Fonte: Própria autora

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese

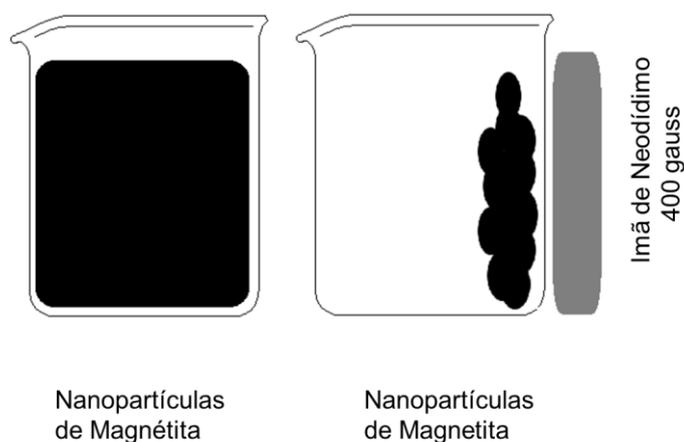
6.1.1 Síntese das Nanopartículas

No processo de produção de nanopartículas de óxido de ferro foi possível verificar que após a adição da base no sistema, houve a formação instantânea de um coloide denso e preto (coloração característica de magnetita) (KHALAFALLA; REIMERS, 1980; LOPEZ et al., 2010). As nanopartículas resultantes desta etapa foram denominadas de magnetita. A sedimentação das partículas foi realizada com ímã para retirar íons em excesso (Figura 23).

O método de coprecipitação química é um método simples para obtenção de nanopartículas de magnéticas de óxido de ferro, a partir de uma mistura estequiométrica cloreto de ferro II e cloreto de ferro III em um meio aquoso, conforme equação.



Figura 23 - Esquema da sedimentação das nanopartículas de magnetita.



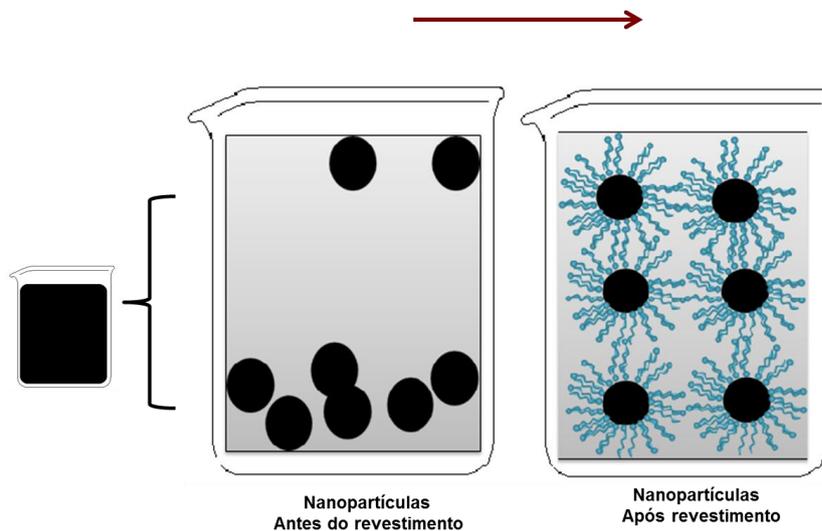
Fonte: Própria autora

6.1.2 Funcionalização das Nanopartículas com Ácido Láurico

Na etapa de revestimento das nanopartículas, foi possível verificar que após a adição do ácido láurico sob aquecimento, constatou-se dispersão das partículas de magnetita em meio aquoso e evidenciou-se a formação do fluido ou ferrofluido de coloração negra (KHALAFALLA; REIMERS, 1980). O revestimento do ácido láurico as nanopartículas

confere a estabilidade ao fluido, contribuindo para a não sedimentação e agregação das nanopartículas (Figura 24). Nesta etapa ao aproximar um ímã de neodímio foi possível observar o arraste de todo o líquido e não mais a separação de sólido, como na seção anterior.

Figura 24 - Esquema do revestimento e estabilização das nanopartículas a partir do tensoativo ácido láurico.

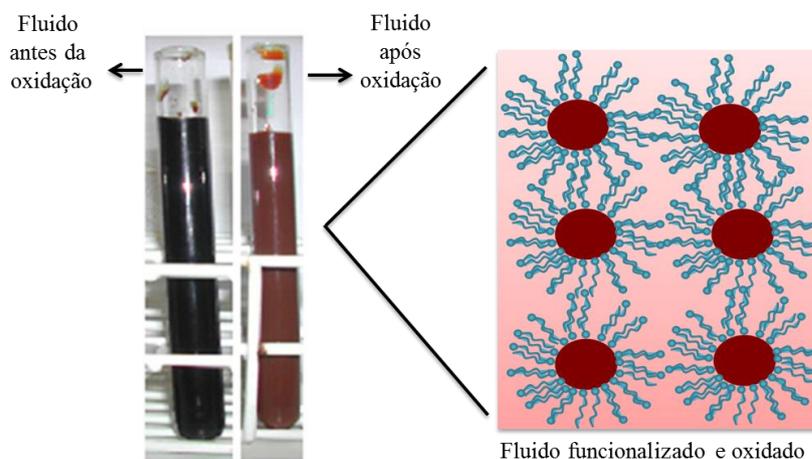


Fonte: Própria autora

6.1.3 Oxidação das Nanopartículas Funcionalizadas

É possível observar na Figura 25, que houve a alteração da coloração negra das partículas para coloração marrom acastanhado (característico da maghemita), evidenciando a oxidação da amostra pela técnica de borbulhamento de oxigênio e aquecimento.

Figura 25 - Nanopartículas de óxido de ferro (antes e após a oxidação)



Fonte: Própria autora

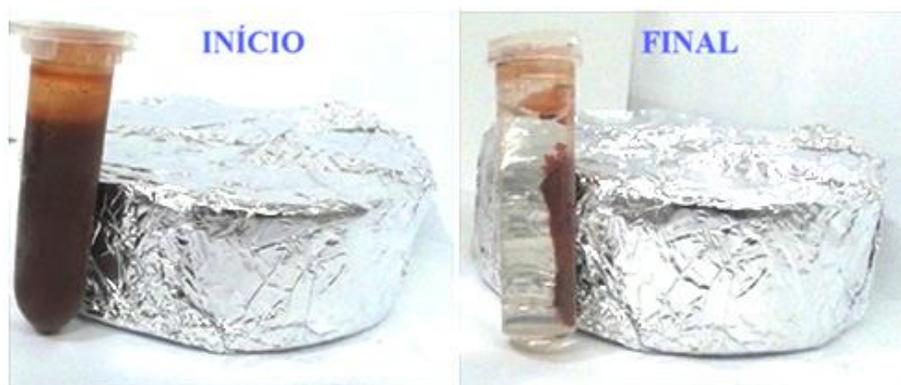
6.1.4 Processo de Diálise e Esterilização do Fluido

Foi possível observar que a condutividade da água registrada foi $0,6 \text{ dS.m}^{-1}$. Este permitiu evidenciar que o processo de diálise, após várias trocas de água deionizada, foi eficaz para remoção do excesso de íons e de ácido láurico. A amostra resultante após o processo de diálise e esterilização foi denominada de nanopartículas funcionalizadas de maghemita ou fluido.

6.1.5 Adsorção da Rifampicina ao Fluido.

Verificou-se que após sucessivas separações magnéticas (13 vezes), que o sobrenadante se tornou mais claro e não mais vermelho acastanhado (cor característica da rifampicina), como no início da separação. Sugerindo assim a retirada do excesso de rifampicina não adsorvida ao sistema (Figura 26). Os sobrenadantes retirados foram enviados para análise do teor de fármaco não adsorvido. E a amostra resultante desta etapa foi denominada de rifampicina adsorvida ao fluido ou sistema.

Figura 26 – Fotografia demonstrando o início e o final da separação magnética do fluido com ímã de neodímio.



Fonte: Própria autora

6.2 Caracterização

6.2.1 Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)

Pela técnica de espectroscopia de absorção atômica foi possível verificar que a concentração total de ferro presente no fluido após o processo de esterilização foi de 6 mg.mL^{-1} .

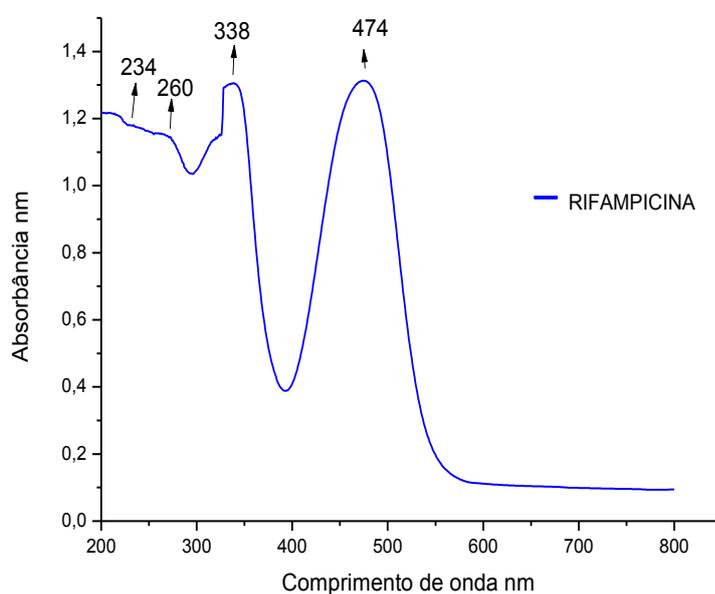
6.2.2 Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta-Visível (UV-vis)

6.2.3 Curva padrão e Doseamento da Rifampicina não Adsorvida ao Fluido

O teor de rifampicina presente nas amostras obtidas pela separação magnética foi quantificado por espectroscopia eletrônica na região UV-VIS. Inicialmente foi realizada uma varredura entre 200 – 800 nm da rifampicina, na concentração de $0,1360 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 27).

Após a identificação dos sinais característicos da rifampicina, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) foi escolhido o comprimento de onda de 474 nm para análise das amostras de rifampicina resultantes das 13 separações magnéticas.

Figura 27 - Resultado obtido por espectroscopia eletrônica na região ultravioleta visível de solução de rifampicina na concentração de $0,1360 \text{ mg.mL}^{-1}$



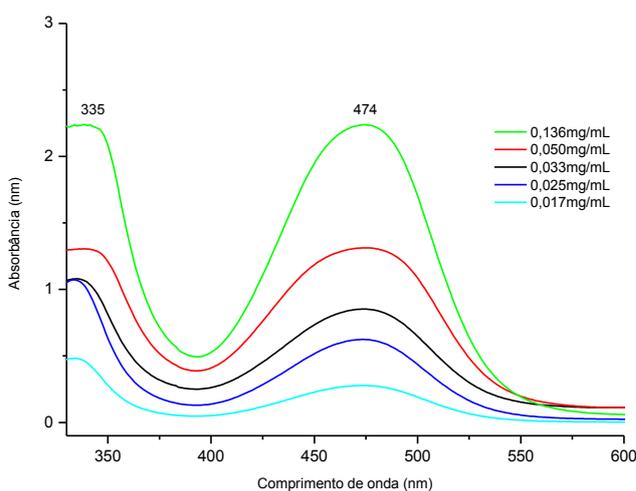
Fonte: Própria autora

A confecção da curva padrão analítica se iniciou com o preparo de uma solução padrão estoque de 1 mg.mL^{-1} de rifampicina (10mg de rifampicina foram dissolvidos em 1mL de DMSO e depois foram diluídos em água deionizada em um balão volumétrico de 10mL).

A partir da solução estoque, várias concentrações de padrões de rifampicina foram preparadas.

Foram obtidos espectros eletrônicos dos padrões de rifampicina nas concentrações de $0,1360 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0500 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0330 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0250 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,0170 \text{ mg.mL}^{-1}$ no intervalo de 330 a 600 nm, que estão apresentados na Figura 28. Os espectros apresentaram 2 bandas com comprimentos de onda iguais a 330 a 600 nm, sendo a banda de maior intensidade em 474 nm, o resultado está de acordo com os descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) para a rifampicina.

Figura 28 - Espectro de absorção de rifampicina nos comprimento de onda de 330 a 600 nm.

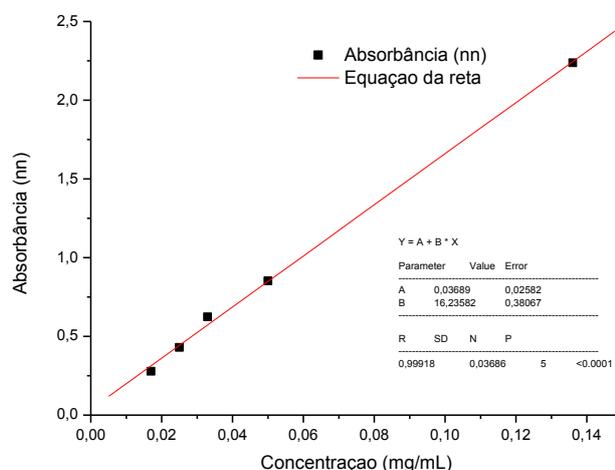


Legenda: Espectro de absorção de rifampicina nas concentrações de $0,1360 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0500 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0330 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,0250 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,0170 \text{ mg.mL}^{-1}$

Fonte: Própria autora

Após as leituras das absorbâncias dos padrões de rifampicina com comprimento de onda igual a 474 nm, foram obtidos: a equação da reta ($y = 16,23x + 0,036$), a regressão linear ($R^2 = 0,998$) e curva padrão analítica (Figura 29) onde y é a absorbância e x é a concentração em mg.mL^{-1} .

Figura 29 - Curva padrão de rifampicina obtida por espectrofotometria eletrônica na região do infravermelho UV-vis.



Fonte: Própria autora

A massa total de rifampicina não adsorvida ao fluido foi realizada por método indireto, ou seja, a quantidade total da rifampicina presentes nos sobrenadantes (9,898 mg), subtraída da quantidade inicial de rifampicina adicionada ao sistema (22 mg). Desta forma, a técnica permitiu determinar que $1,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi a massa resultante de rifampicina presente no fluido após o processo de separação magnética, ou seja, 55% de adsorção na rifampicina ao sistema.

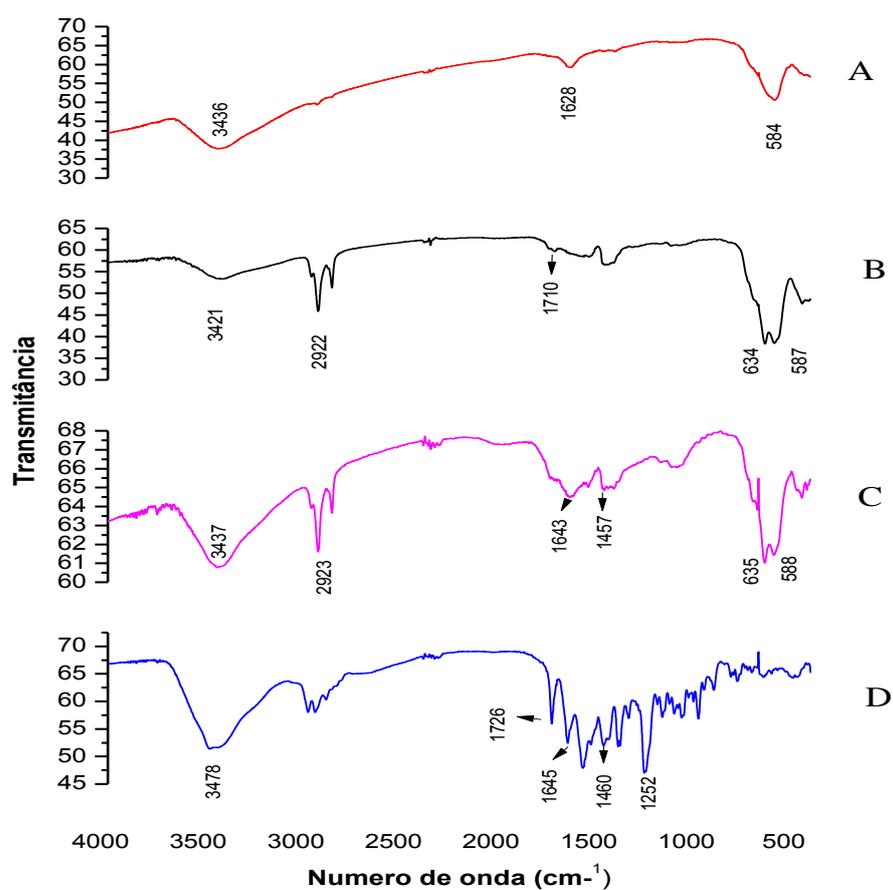
6.2.4 Espectroscopia Vibracional de absorção na Região do Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada com o intuito de obter informações a respeito dos grupos funcionais e ligações presentes nos compostos conforme a Figura 30 (CASILLAS; GONZALEZ; PÉREZ, 2012).

No espectro de absorção na região FTIR apresentado na Figura 31 (a) é possível observar uma banda característica de óxido de ferro em 584 cm^{-1} . Esta região do espectro corresponde à vibração do estiramento simétrico das ligações Fe-O-Fe com sítios octaédricos e tetraédricos característicos da fase de magnetita (GONZALES; KRISHNAN, 2007). Verificou-se que bandas de absorção em aproximadamente 1628 cm^{-1} e 3436 cm^{-1} sugerem ser atribuídas ao modo de vibração da deformação do grupamento hidroxila (-OH) e a vibração de estiramento da ligação do grupamento hidroxila (-OH) respectivamente. E que as

bandas do grupamento hidroxila observadas são provenientes de moléculas de água adsorvidas na superfície hidrofílica dos óxidos metálicos. Essa ligação é resultado da síntese de nanopartículas de maghemita pelo método de coprecipitação química, em que as suas superfícies são revestidas por grupos hidroxila, em ambiente aquoso (AZAM et al., 2012).

Figura 30 - Espectros de infravermelho dos compostos



Legenda: A –Nanopartículas de Magnetita, B–Fluido, C –Rifampicina Adsorvida ao fluido e D –Rifampicina.

Fonte: Própria autora

O espectro de FTIR representado na Figura 31 (b) é caracterizado por sinais intensos no intervalo de 587 cm^{-1} e 634 cm^{-1} . A banda 587 é atribuída também à vibração de estiramento de Fe-O em sítios tetraédricos e octaédricos de Fe-O-Fe em $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014a). E a banda 634 é atribuída à deformação da ligação de Fe-O nos sítios octaédricos da fase de maghemita. No entanto, estes picos característicos de Fe-O-Fe deslocam-se para frequências mais elevada, em comparação com o óxido de ferro não

funcionalizado com ácido láurico. Sugere-se que este fenômeno de deslocamento seja devido ao estiramento assimétrico entre os grupos Fe-O-H levando a um aumento do número de onda das bandas de absorção (CASILLAS; GONZALEZ; PÉREZ, 2012).

As bandas 2852 cm^{-1} e 2922 cm^{-1} nas amostras de nanopartículas de maghemita correspondem à vibração dos estiramentos simétricos e assimétricos respectivamente do grupamento CH grupos ($-\text{CH}_3-$) e (CH_2-) (KHAN, 2008). Observa-se a existência de bandas nas regiões de 1710 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} correspondente aos estiramentos simétrico e assimétrico do C=O da ligação COO- do ácido láurico protonado utilizado para realizar a funcionalização da amostra (FERREIRA et al., 2015) e a contribuição das ligações de CH_2 em 1455 cm^{-1} (GONZALES; KRISHNAN, 2007).

O espectro de FTIR de rifampicina observado na Figura 31 (d) mostrou vários picos característicos. A banda de absorção de OH e NH em 3478 cm^{-1} corresponde ao alongamento assimétrico N-H da amina ligações de H, o que indica uma possível interação NH_2 em direção à superfície do óxido de ferro (SCHIANI et al., 2013).

É possível observar que na Figura 31 (c) mantém alguns dos picos de rifampicina com deslocamento, tais como as bandas 1643 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} de rifampicina atribuídas às vibrações de alongamento assimétricas e simétricas de grupamentos carboxilatos COO-, confirmando a presença de rifampicina no sistema proposto (FERREIRA et al., 2015; TERRY et al., 2014). Foram verificados também a presença dos sinais em 1726 cm^{-1} e em 1645 cm^{-1} . Ibiapino et al., (2014) em seu estudo também verificou a presença desses sinais em uma amostra de rifampicina em seu estudo e verificou que esta forma estrutural cristalina tratava-se da forma polimórfica I (IBIAPINO et al., 2011).

Na Figura 31 (c), o espectro de FTIR da rifampicina adsorvida sobre o nanossistema apresenta bandas largas, esta observação é consideravelmente semelhante ao espectro da amostra de nanopartículas de maghemita (b). Apesar do aumento nas intensidades das bandas em 1643 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} e deslocamento destas bandas sugerirem que a rifampicina está presente no sistema proposto. O teor da rifampicina adsorvido a superfície das nanopartículas de maghemita é baixo frente aos demais componentes do sistema.

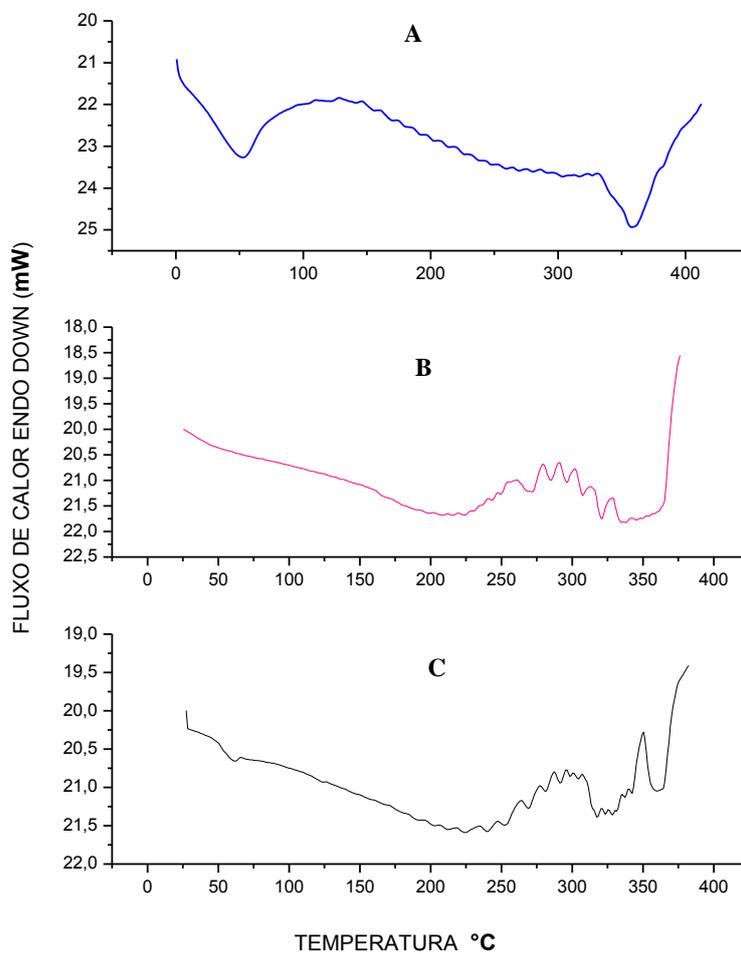
6.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode-se observar a estabilidade térmica do sistema e a diferenciação de formas cristalinas do fármaco rifampicina (ALVES et al., 2010). O estudo de análise térmica deste trabalho está evidenciado na Figura 31.

Na Figura 31, o espectro da amostra do nanosistema rifampicina adsorvida a nanopartículas de maghemita, é possível observar um discreto sinal endotérmico em torno de 60°C e um sinal exotérmico bastante intenso em torno de 350°C, que pode ser inferido à cobertura da amostra, ou seja, tanto à rifampicina quanto ao laurato presentes na superfície da amostra, o que nos indica a necessidade de realizar o DSC para os componentes isolados.

Observa-se tanto para a amostra do fluido, quanto para o nanosistema um conjunto de sinais que alternam entre eventos endotérmicos e exotérmicos entre 225 e 325°C. Estes sinais são característicos de processos de fusão seguidos por recristalização, neste caso da própria maghemita, sugerindo que a estrutura cristalina do óxido de ferro encontra-se com cristalitos de tamanhos variados, ou seja, apresenta polidispersão, o que contribui para o surgimento do comportamento térmico fusão/recristalização.

Figura 31 - Análise térmica dos compostos por calorimetria exploratória diferencial



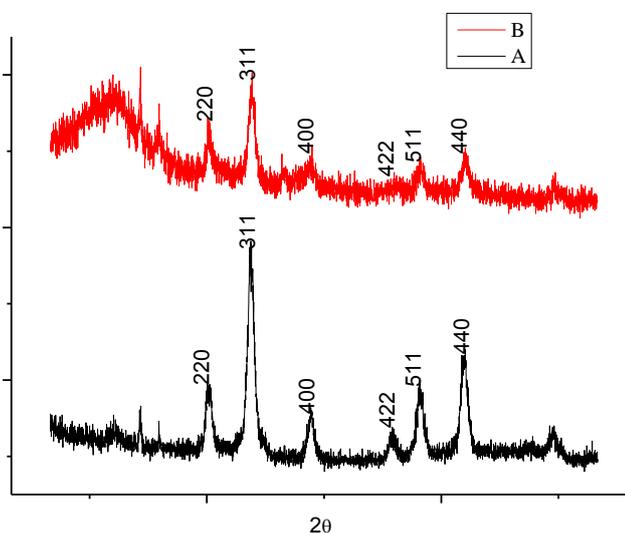
Legenda: A– nanopartículas de magnetita, B – fluido e C – rifampicina adsorvida ao fluido.

Fonte: Própria autora

6.2.6 Difractometria de Raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X (DRX) foi utilizada para caracterizar a fase cristalina e o tamanho médio das nanopartículas de magnetita e maghemita. É possível observar na Figura 32 os picos referentes às reflexões indexadas para os planos da rede cristalina (220), (311), (400), (422), (511) e (440). Eles correspondem a intensidade das ondas difratadas em função do ângulo 2θ para uma estrutura do tipo espinélio inverso, característico da fase dos óxidos ferro, magnetita e/ou maghemita.

Figura 32 - Difractometria de raios X das amostras de óxidos de ferro



Legenda: A – nanopartículas de magnetita, B – nanopartículas de maghemita.

Fonte: Própria autora

Os picos identificados foram comparados às cartas cristalográficas do arquivo do JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) n° 19-0629 referente à magnetita (Fe_3O_4) e as n° 391346 e n° 880315 para maghemita (Fe_2O_3).

A difratometria de raios X também foi utilizada para estimar o diâmetro médio das partículas de magnetita e maghemita.

Neste estudo, foi utilizada a abertura a meia altura do pico mais intenso que corresponde a 311 para determinar o tamanho médio das nanopartículas. As dimensões dos nanocristais aferida por difração DRX foram 8,5 nm para magnetita e 8,4 nm para maghemita.

6.2.7 Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS)

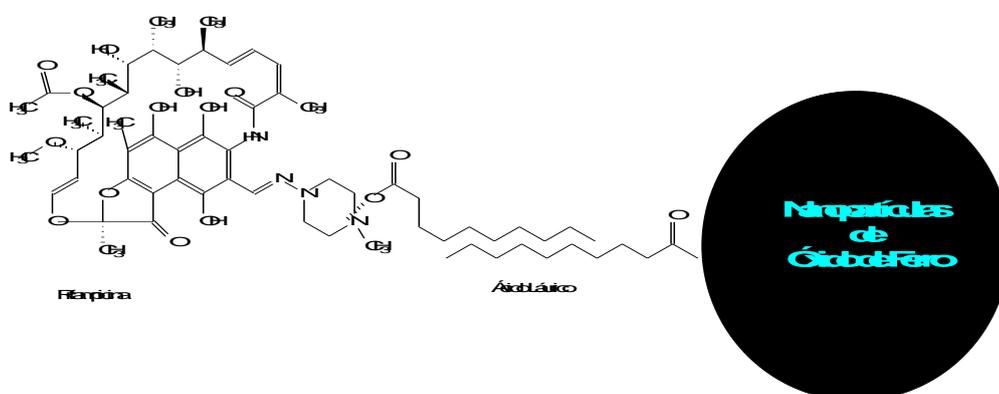
Por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), foi possível caracterizar as amostras do fluido e da rifampicina adsorvida ao fluido quanto ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta (ζ) e IPD. O resultado encontrado para o diâmetro hidrodinâmico do fluido foi de 56,89 nm e índice de polidispersão (IPD) de 0,212. Enquanto para rifampicina adsorvida ao fluido o diâmetro hidrodinâmico foi 406 nm e o foi (IPD) 0,615. Observa-se que a rifampicina adsorvida ao fluido apresentou diâmetro hidrodinâmico maior em relação a amostra de fluido.

Sugere-se, que valor maior de diâmetro hidrodinâmico da amostra de rifampicina adsorvida ao fluido sejam devido à agregação da rifampicina as nanopartículas de maghemita funcionalizadas durante os processos de esterilização (SANTOS et al., 2011). E que o maior valor de IPD também para rifampicina adsorvida ao fluido seja consequência da separação magnética, contudo apesar de apresentar agregados, o fluido possui estabilidade coloidal.

A estabilidade coloidal das amostras foi avaliada com base na determinação do potencial zeta (ζ) (UNTERWEGER et al., 2014). Observou-se que o valor de ζ para rifampicina adsorvida ao fluido foi de -22,0 mV enquanto para o fluido foi de -15,2 mV.

A medida do potencial zeta fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas disponível para ligações com outros materiais. Estas cargas mudam com a variação dos parâmetros experimentais e através deste potencial pode-se medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução (ZHOU; ZHANG; GAO, 2014). Estes valores de ζ sugerem a ocorrência da força repulsiva entre as partículas, favorecendo a sua estabilidade (FERREIRA et al., 2015) como mostrado na Figura 33.

Figura 33 - Esquema proposto para ligações do nanosistema



Fonte: Própria autora

6.3 Ensaios Biológicos

6.3.1 Toxicidade dos Compostos em Ensaio de Letalidade em *Artemia salina*.

Os resultados do ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3 - Toxicidade dos compostos expressada como concentração letal para 50% (CL₅₀) das larvas de *Artemia salina*

Compostos	CL ₅₀		Classificação Toxicidade (Nguta et al., 2011)
	Rifampicina	Fluido	
Rifampicina	312,94	-	Toxicidade moderada
Rifampicina adsorvida ao fluido	535,38	2920,25	Toxicidade baixa
Fluido	-	≥3000	Não tóxico

CL₅₀: concentração letal média.

Fonte: Própria autora

Durante a etapa de contagem dos náuplios mortos observou-se que o aumento da mortalidade estava relacionado com o aumento da concentração, o que proporcionou linearidade na relação controle-letalidade das amostras que apresentaram CL₅₀.

O controle negativo com DMSO a 5% e o controle de viabilidade com água marinha sintética não apresentaram mortalidade de náuplios. O dicromato de potássio tem sido usado em estudos de citotoxicidade como controle positivo (MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006) e apresentou CL₅₀ de 45 µg.mL⁻¹.

O fluido não foi tóxico e apresentou CL₅₀ superior a 3000 µg.mL⁻¹ corroborando como os estudos de Gambardella et al. (2014) e Rajabi et al. (2015). Foi possível observar também que a rifampicina na sua forma livre (CL₅₀ 312,94 µg.mL⁻¹) apresentou ser mais tóxica do que quando adsorvida ao fluido (CL₅₀ 535,38 µg/mL⁻¹).

Devido a sua capacidade filtradora e a sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas, náuplios de *Artemia salina*, estão sendo cada vez mais utilizados, em estudos de nanotoxicologia (ISTRATE et al., 2014). Além disso, Rajabi et al. (2015) evidenciou ainda que o ensaio de toxicidade em *Artemia salina* demonstrou não possuir diferença estatística (P > 0,05) em relação ao ensaio MTT. Estas constatações sugerem que o teste *Artemia salina*

poderia acelerar estudos de toxicidade e diminuir custos, e, portanto, ser considerada uma alternativa ao ensaio de cultura de células *in vitro* (ARULVASU et al., 2014).

A administração da rifampicina apresenta principalmente efeitos colaterais nefrotóxicos (MIN et al., 2013) e hepatológicos (LEGOUT et al., 2014). No presente estudo, sugere-se que a toxicidade da rifampicina pode ter sido reduzida devido a sua adsorção as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Em seu estudo com nanopartículas de óxido de ferro, Xiong et al. (2015) constatou que nanopartículas são capazes de prevenir o coração de danos isquêmicos *in vivo* e *in vitro*. Ele evidenciou que partículas de menores que 10 nm produziram melhores efeitos cardioprotetores que as partículas maiores 30 nm, ou seja, a capacidade protetora está relacionada ao tamanho da partícula. Ele observou ainda que as nanopartículas poderiam inativar radicais livres e diminuir lesões em membranas lipídicas de cobaias.

São necessários mais estudos para averiguar o motivo da diferença de CL_{50} entre o fármaco livre e quando adsorvidos às nanopartículas. Mas, sugere-se que as nanopartículas de óxido de ferro estejam atuando como um sistema de liberação controlada para o fármaco rifampicina. E que desta forma, ao liberar lentamente o fármaco contribua para a não toxicidade aguda como demonstrado no fármaco livre. Como discutido anteriormente, sugere-se também que as nanopartículas de óxido de ferro estejam inativando possíveis sítios da rifampicina e desta forma esteja contribuindo para a redução de sua toxicidade e atividade antimicrobiana como discutido no ensaio de difusão em disco (FERREIRA et al., 2015).

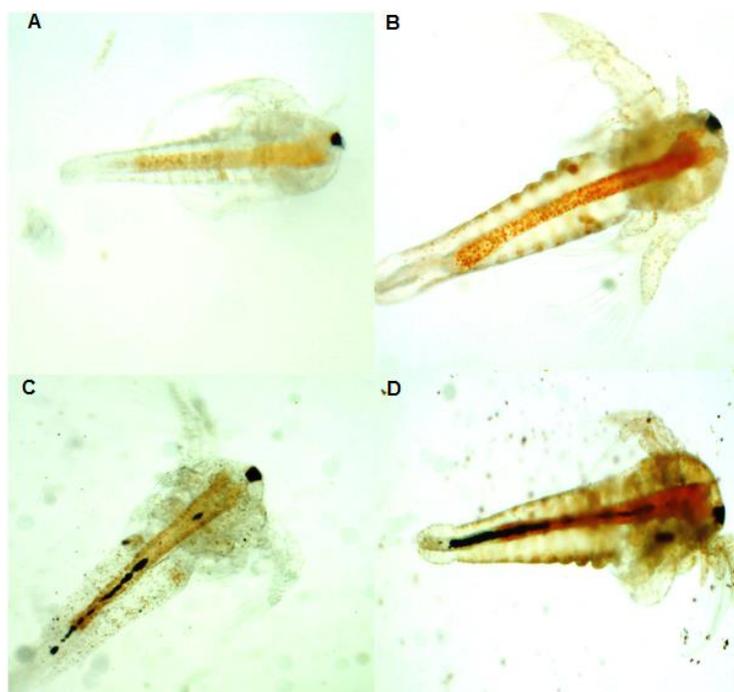
6.3.2 Análises de *Artemias salinas* por Microscópica Óptica.

A imagem de microscopia da Figura 34 ilustra os efeitos da exposição dos compostos em náuplios após ensaio de toxicidade.

É possível observar na Figura 4 B uma alteração da cor em relação ao controle na Figura 4 A, possivelmente devido à cor característica da rifampicina amarelo acastanhado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Na Figura 4 C é possível observar a formação de aglomerados de nanopartículas de comprimidas no intestino dos náuplios e na Figura 4 D observa-se além da presença de agregados de nanopartículas, a alteração da cor devido à cor característica da rifampicina.

Figura 34 - Imagem de microscopia de *Artemia salina* após exposição aos compostos do ensaio de toxicidade.



Legenda: A – controle em água salina, B – fluido, C – rifampicina e D – rifampicina adsorvida ao fluido.
Fonte: Própria autora

Artêmias são considerados filtradores não seletivos e podem facilmente ingerir partículas de até 50 μm de diâmetro (ATES et al., 2013a,b; HUND-RINKE; SIMON, 2006; RODD et al., 2014). Foi observado que as nanopartículas quando suspensas em água marinha formaram aglomerados (FALUGI et al., 2012; GAMBARDELLA et al., 2014), e ainda assim em nosso estudo os náuplios de *Artemia salina* foram capazes de ingeri-los. Assim como em nosso trabalho, vários estudos confirmam a acumulação de nanopartículas dentro do intestino das larvas de *Artemia salina* e sua incapacidade de eliminar rapidamente essas partículas ingeridas (ATES et al., 2013a,b,c; RODD et al., 2014).

Estes resultados sugerem que a excreção de nanopartículas ingeridas parece ser muito lenta provavelmente devido à formação de agregados maiores no interior do intestino (GAMBARDELLA et al., 2014). No entanto, foi observada que esta acumulação não induziu a mortalidade após 24 h de exposição, corroborando com os estudos de Cornejo-Garrido et al., (2011). Observou-se também que artêmias tratadas apenas com fluido continuaram vivas após o período de 72h, enquanto náuplios tratadas com apenas rifampicina, rifampicina adsorvida ao fluido e controle com DMSO já estavam mortas.

Foi verificada também uma alteração comportamental relacionada a um aumento na velocidade de natação de artêmias tratadas com fluido e tratadas com rifampicina adsorvida ao fluido. Este comportamento de estresse, com alterações nas velocidades de natação foi observado em todas as concentrações do fluido utilizadas no ensaio de letalidade, entretanto este comportamento não induziu a morte dos náuplios. Estes achados corroboram a com os estudos de Gambardella et al. (2014) e Garaventa et al, (2010) que avaliaram alterações de comportamento e velocidade em artêmias tratados com nanopartículas de óxido metálicos.

Gambardella et al. (2014), verificou que o estresse dos náuplios pode ser associado a uma resposta a exposição a nanopartículas de óxido de ferro. Ele verificou também um aumento da colinesterase e catalase. Sabe-se que colinesterase pode funcionar como um regulador de tecido inflamado (FALUGI et al., 2012). Esta inflamação pode estimular a regeneração do tecido saudável (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007), sugerindo assim que as nanopartículas de óxido de ferro possuam mecanismo antioxidante na prevenção de danos oxidativos (HUANG et al., 2013).

6.3.3 Atividade Antimicrobiana dos Compostos pelo Método de Difusão em Disco

A Tabela 3 apresenta os resultados dos diâmetros (mm) médios dos halos de inibição de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* em meio ágar Muller Hinton para amostras do presente estudo.

Tabela 4 - Diâmetro médio dos halos formados para diferentes amostras em relação à cepa *Staphylococcus aureus*.

Compostos	[Rifampicina] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[Ferro Total] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo (mm)
Rifampicina	500	-	34
Rifampicina	5	-	17
Rifampicina adsorvida ao fluido	500	6000	31
Rifampicina adsorvida ao fluido	5	60	15
Fluido	-	6000	0

Fonte: Própria autora

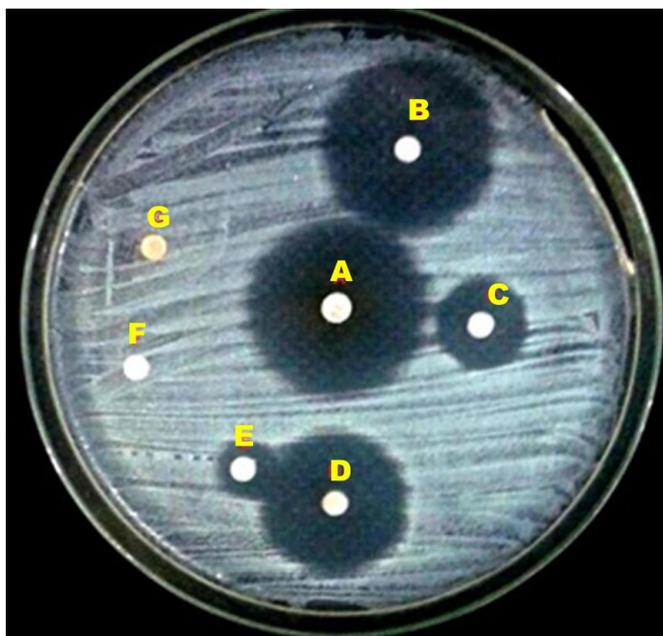
Como mostrado na Tabela 1, é possível observar que a amostra de rifampicina adsorvida ao fluido na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou halo de inibição 11,4% menor que a amostra rifampicina livre na mesma concentração. Esse comportamento também foi

observado para as amostras de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina adsorvida ao fluido e rifampicina livre.

Verificou-se também, que não ocorreu a formação de halo de inibição para discos com amostras do fluido. A Figura 35 ilustra a formação de halos de inibição contra *Staphylococcus aureus* dos compostos testados.

É possível observar na Figura 35 que disco A com controle positivo (disco padrão comercial de rifampicina) que foi utilizado para viabilizar a técnica, apresentou halo de 34 mm e está de acordo com o preconizado pelo CLSI e o disco F com controle negativo impregnado com DMSO a 5% não apresentou halo de inibição.

Figura 35 - Análise visual dos halos de inibição dos compostos contra a cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.



Legenda: A – rifampicina padrão comercial $30\mu\text{g.mL}^{-1}$, B – rifampicina $500\mu\text{g.mL}^{-1}$, C – rifampicina $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, D – rifampicina adsorvida ao fluido $500\mu\text{g.mL}^{-1}$; E – rifampicina adsorvida ao fluido $5\mu\text{g.mL}^{-1}$; F – fluido $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, G – DMSO $5\mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: Próprio Auto

Neste ensaio, foi possível observar que o fluido não apresentou atividade antimicrobiana. Sugere-se que o fluido tenha sido responsável pela redução da atividade antimicrobiana da rifampicina frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. Pois, a rifampicina livre na mesma concentração apresentou maior halo de inibição contra a cepa que quando

adsorvida ao fluido. Outra hipótese seria uma possível inativação de sítios ativos da rifampicina por estar adsorvida às nanopartículas de óxido de ferro, conforme ilustrado na Figura 34 no estudo de Ferreira et al. (2015). Além disso, sugere-se que as nanopartículas estejam atuando como um sistema de liberação retardada (HUSSEIN-AL-ALI et al., 2014a) e liberando ao poucos a rifampicina na placa.

7 CONCLUSÕES

O estudo mostrou a viabilidade de se produzir um fluido estável de nanopartículas de óxido de ferro em adsorção com o fármaco rifampicina.

Foi possível quantificar que 55% (1,1 mg) de rifampicina foram adsorvida as nanopartículas pela espectrofotometria eletrônica na região do infravermelho UV-vis. Confirmou-se a funcionalização do ácido láurico a superfície das nanopartículas e a adsorção do fármaco ao sistema, pela técnica de espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). E estimaram-se os tamanhos nanométricos em torno de 8 nm de magnetita e maghemita por difração de raios X.

O estudo mostrou a viabilidade de se produzir um fluido estável de nanopartículas de óxido de ferro em adsorção com o antimicrobiano rifampicina. Sugere-se que o tensoativo ácido láurico empregado na funcionalização foi o responsável pela adsorção da rifampicina ao sistema.

A atividade antimicrobiana da rifampicina quando adsorvida ao fluido não foi inibida, contudo, foi reduzida quando comparada a rifampicina livre em ensaio por difusão em disco contra a cepa *Staphylococcus aureus*.

O estudo permitiu verificar que rifampicina adsorvida ao fluido apresentou menor toxicidade que a rifampicina livre, em ensaio de letalidade (CL₅₀) com *Artemia salina*. Estes resultados sugerem que nanopartículas de óxido de ferro não apresentam toxicidade e que possam atuar como um sistema na redução da toxicidade de fármacos. No entanto, mais estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar seu perfil de segurança.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Â.; FERREIRA, R.; FABRIS, J.; DOMINGUES, R. Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. **Biomedical Engineering**, p. 157–176, 2011.

ALVES, R.; REIS, T. V. S.; SILVA, L. C. C.; STORPÍRTIS, S.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. V. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, abr/jun. 2010.

ARULVASU, C.; JENNIFER, S. M.; PRABHU, D.; CHANDHIRASEKAR, D. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O.; RIVERA, H. F. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. **Environmental science: Processes & impacts**, v. 15, p. 225-233, 2013a.

ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity. **Environmental monit assess**, v. 185, p. 3339-3348, 2013b.

ATES, M.; DEMIR, V.; ARSLAN, Z.; DANIELS, J.; FARAH, I. O.; BOGATU, C. Evaluation of Alpha and Gamma Aluminum Oxide Nanoparticle Accumulation, Toxicity and Depuration in *Artemia salina* Larvae. **Environmental toxicology**, p. 1–10, 2013c.

AZAM, A.; AHMED, A. S.; OVES, M.; KHAN, M. S.; HABIB, S. S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 6003–6009, 2012.

BALDI, G.; RAVAGLI, C.; MAZZANTINI, F.; LOUDOS, G.; ADAN, J.; MASA, M.; PSIMADAS, D.; FRAGOGEORGI, E. A.; LOCATELLI, E.; INNOCENTI, C.; SANGREGORIO, C.; FRANCHINI, M. C. In vivo anticancer evaluation of the hyperthermic efficacy of anti-human epidermal growth factor receptor-targeted PEG-based nanocarrier containing magnetic nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3037-3056, 24 jun. 2014.

BEVILACQUA, A. H. V.; REDINI, I. B. S.; BERNARDI, M. M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* SP: comparação da preparação comercial e do óleo puro. **Revista Instituto Ciências Saúde**, v. 26, p. 157-160, 2008.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. 17-71, dez. 2007.

BIGINI, P.; DIANA, V.; BARBERA, S.; FUMAGALLI, E.; MICOTTI, E.; SITIA, L.; PALADINI, A.; BISIGHINI, C.; DE GRADA, L.; COLOCA, L.; COLOMBO, L.; MANCA, P.; BOSSOLASCO, P.; MALVESTITI, F.; FIORDALISO, F.; FORLONI, G.; MORBIDELLI, M.; SALMONA, M.; GIARDINO, D.; MENNINI, T.; MOSCATELLI, D.; SILANI, V.; COVA, L. Longitudinal Tracking of Human Fetal Cells Labeled with Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles in the Brain of Mice with Motor Neuron Disease. **Plos One**, v. 7, n. 2, 27 fev. 2012.

BILCU, M.; GRUMEZESCU, A. M.; OPREA, A. E.; POPESCU, R. C.; MOGOȘANU, G. D.; HRISTU, R.; STANCIU, G. A.; MIHAILESCU, D. F.; LAZAR, V.; BEZIRTZOGLU, E.; CHIFIRIUC, M. C. Efficiency of Vanilla, Patchouli and Ylang Ylang Essential Oils Stabilized by Iron Oxide@C14 Nanostructures against Bacterial Adherence and Biofilms Formed by and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17943–17956, 4 nov. 2014.

BERMAN, S. M. C.; WALCZAK, P.; BULTE, J. W. M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 4, p. 343–355, 2011.

BERMÚDEZ, M.; MARTINEZ, E.; MORA, M.; SAGRISTÁ, M. L.; MADARIAGA, M. A. Molecular and physicochemical aspects of the interactions of the tuberculostatics ofloxacin and rifampicin with liposomal bilayers: a P-NMR and DSC study. **Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 158, p. 59–66, 1999.

BLECHER, K.; NASIR, A.; FRIEDMAN, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 395–401, 1 set. 2011.

BUSQUETS, M. A.; SABATÉ, R.; ESTELRICH, J. Potential applications of magnetic particles to detect and treat Alzheimer's disease. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 538, p. 1–10, out. 2014.

CORRÊA, J. M.; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). **Revista eletrônica de Veterinária**, v. 12, n.12, 2011.

CASILLAS, P. E. G.; GONZALEZ, C. A. R.; PÉREZ, C. A. M. Infrared Spectroscopy of Functionalized Magnetic Nanoparticles. In: THEOPHANIDES, T. **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**. [s.l.]: Intech, 2012. cap. 21, p. 405–420.

CORNEJO-GARRIDO, H.; KIBANOVA, D.; NIETO-CAMACHO, A.; GUZMÁN, J.; RAMIREZ-APAN, T.; FERNANDEZ-LOMELIN, P.; GARDUÑO, M. L.; CERVINI-SILVA, J. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1329–1335. set. 2011.

CULLITY, B. D. **Elements of Proteins X-ray Crystallography**. 2. ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company Inc, 1978.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. **Elements of X-ray diffraction**. 3. ed. Canadá: Addison-Wesley, 2001.

CAMILLO-COURA, L.; SOLI, A. S. V.; RAMOS, J. B.; COURA, J. R. Experiências terapêuticas com um derivado da rifamicina — a rifampicina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 4, p. 281–287, jul/ago. 1970.

COLOMBO, M.; CARREGAL-ROMERO, S.; CASULA, M. F.; GUTIÉRREZ, L.; MORALES, M. P.; BÖHM, I. B.; HEVERHAGEN, J. T.; PROSPERI, D.; PARAK, W. J. Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 11, p. 4306-4334, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M2-A8**: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. Pennsylvania, 2003. 58p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M7-A6**: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Pennsylvania, 2003. 53p.

DIRECTIVA n° 63, 22 de Setembro de 2010. Relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia**.

DVORAK, P.; BENOVA, K.; VITEK, J. Alternative biotest on *Artemia franciscana*. **Ecotoxicology**, p. 51–74, 2012.

ELLARD, G. A.; FOURIE, P. B. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 3, n. 11, p. 301–308, 1999.

EWIJK, G. A. V.; VROEGE, G. J.; PHILIPSE, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. 1-3, p. 31–33, 1999.

EL-SAYED, A. A.; KHALIL, A. M.; EL-SHAHAT, M.; KHAIRELDIN, N. Y.; RABIE, S. T. Antimicrobial activity of PVC-pyrazolone-silver nanocomposites. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 53, n. 6, p. 346–353, 2016.

FALUGI, C.; ALUIGI, M. G.; CHIANTORE, M. C.; PRIVITERA, D.; RAMOINO, P.; GATTI, M. A.; FABRIZI, A.; PINSINO, A.; MATRANGA, V. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. **Marine Environmental Research** **76**, p. 114-121, 2012.

FERRAZ FILHA, Z. S.; LOMBARDI, J. A.; GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis*

candelabrum and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 358–361, 2012.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. Brasília: Fiocruz, 2010. v.2, p. 557-1448.

FERREIRA, Q. S.; DA SILVA, S. W.; SANTOS, C. M. B.; RIBEIRO, G. C.; GUILHERME, L. R.; MORAIS, P. C. Rifampicin adsorbed onto magnetite nanoparticle: SERS study and insight on the molecular arrangement and light effect. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 9, p. 765–771, set. 2015.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3.ed. London: Cambridge University Press, 1971.

FUCHSJÄGER, M.; SHUKLA-DAVE, A.; AKIN, O.; BARENTSZ, J.; HRICAK, H. Prostate cancer imaging. **Acta radiologica**, v. 49, n. 1, p. 107–20, fev. 2008.

GAMBARDELLA, C.; MESARIČ, T.; MILIVOJEVIĆ, T.; SEPČIĆ, K.; GALLUS, L.; CARBONE, S.; FERRANDO, S.; FAIMALI, M. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, p. 4249–4259, 2014.

GARAVENTA, F.; GAMBARDELLA, C.; DI FINO, A.; PITTORE, M.; FAIMALI, M. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 512-519, 2010.

GEHRKE, I.; GEISER, A.; SOMBORN-SCHULZ, A. Innovations in nanotechnology for water treatment. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 1-17, jan. 2015.

GHOSHAL, T.; MAITY, T.; SENTHAMARAIKANNAN, R.; SHAW, M. T.; CAROLAN, P.; HOLMES, J. D.; ROY, S.; MORRIS, M. A. Size and space controlled hexagonal arrays of superparamagnetic iron oxide nanodots: magnetic studies and application. **Scientific reports**, v. 3, p. 1-8, 27 set. 2013.

GONZALES, M.; KRISHNAN, K. M. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 59–62, abr. 2007.

GRUMEZESCU, A. M.; GESTAL, M. C.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, VALENTINA.; VASILE, B. S.; MOGOANTĂ, L.; IORDACHE, F.; BLEOTU, C.; MOGOȘANU, G. D. Biocompatible Fe₃O₄ increases the efficacy of amoxicillin delivery against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5013–5027, 22 abr. 2014.

HYDE, L. Rifampin in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **California Medicine**, v. 117, n. 6, p. 18–21, dez. 1972.

HUANG, G.; CHEN, H.; DONG, Y.; LUO, X.; YU, H.; MOORE, Z.; BEY, E. A.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. **Theranostics**, v. 3, n. 2, p. 116–126, fev. 2013.

HUND-RINKE, K.; SIMON, M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (tio₂) on algae and daphnids. **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**, v. 13, n. 4, p. 225-232, jul. 2006.

HUSSEIN-AL-ALI, S. H.; EL ZOWALATY, M. E.; KURA, A. U.; GEILICH, B.; FAKURAZI, S.; WEBSTER, T. J.; HUSSEIN, M. Z. Antimicrobial and controlled release studies of a novel nystatin conjugated iron oxide nanocomposite. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, maio. 2014a.

HUSSEIN-AL-ALI, S. M.; EL, M. E.; ZOWALATY.; HUSSEIN, M. Z.; GEILICH, B. M.; WEBSTER, T. J. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of an ampicillin-conjugated magnetic nanoantibiotic for medical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3801-3814, 8 ago. 2014b.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of controlled release**, v. 156, n. 2, p. 128–145, 10 dez. 2011.

ISTRATE, C. M.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M.; MOGOANTĂ, L.; MOGOȘANU, G. D.; SAVOPOL, T.; MOISESCU, M.; IORDACHE, M.; VASILE, B. S.; KOVACS, E. Iron oxide nanoparticles modulate the interaction of different antibiotics with cellular membranes. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 55, n. 3, p. 849–856, 2014.

IBIAPINO, A. L.; SEICEIRA, R. C.; PITALUGA, J. A.; TRINDADE, A. C.; FERREIRA, F. F. Structural characterization of form I of anhydrous rifampicin. **Crystal engineering communications**, v. 16, n. 36, p. 8555-8562, 28 set. 2014.

INBARAJ, B. S.; TSAI, T.-Y.; CHEN, B.-H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of superparamagnetic nanoparticles modified with glycol chitosan. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2 fev. 2012.

INGEN, J. V.; AARNOUTSE, R. E.; DONALD, P. R.; DIACON, A. H.; DAWSON, R.; BALEN, G. P. V.; GILLESPIE, S. H.; BOEREE, M. J. Why Do We Use 600 mg of Rifampicin in Tuberculosis Treatment?. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. e194–e199, 1 maio 2011.

IGARASHI, M. A. **Pubvet**, v. 2, n. 31, Ed. 42, Art. 386, 2008.

ITTRICH, H.; PELDSCHUS, K.; RAABE, N.; KAUL, M.; ADAM, G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: Applications and developments in diagnostics and therapy. **Fortschr Röntgenstr**, v. 185, n. 12, p. 1149–1166, 2013.

JANSSEN, M.; MIHOV, G.; WELTING, T.; THIES, J.; EMANS, P. Drugs and Polymers for Delivery Systems in OA Joints: Clinical Needs and Opportunities. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 799–819, 13 mar. 2014.

JING, H.; WANG, J.; YANG, P.; KE, X.; XIA, G.; CHEN, B. Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapy agents interact synergistically to induce apoptosis in lymphoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 999-1004, nov. 2010.

KASTEN, A.; GRÜTTNER, C.; KÜHN, J. P.; BADER, R.; PASOLD, J.; FRERICH, B. Comparative in vitro study on magnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking of adipose tissue-derived progenitor cells. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 1-13, 22 set. 2014.

KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of Dilution- Stable Aqueous Magnetic Fluids. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. MAG-16, n. 2, p. 178–183, 1980.

KHAN, A. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles embedded in microgels. **Materials Letters**, v. 62, n. 6-7, p. 898–902, 2008.

KUCHERYAVY, P.; HE, J.; JOHN, V. T.; MAHARJAN, P.; SPINU, L.; GOLOVERDA, G. Z.; KOLESNICHENKO, V. L. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with variable size and an iron oxidation state as prospective imaging agents. **Langmuir**, v. 29, n. 2, p. 710–716, 15 jan. 2013.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 2008.

LEGOUT, L.; DELIA, P.; SARRAZ-BOURNET, B.; ROUYER, C.; MASSONGO, M.; VALETTE, M.; LEROY, O.; HAULON, S.; SENNEVILLE, E. Factors predictive of treatment failure in staphylococcal prosthetic vascular graft infections: a prospective observational cohort study: impact of rifampin. **BioMed Central infectious diseases**, v. 14, p. 1-9, 28 abr. 2014.

LEE, M. K.; PARK, S. B.; KANG, S. J.; JUNG, W. M. Method of producing iron oxide nanoparticles. **European patent application**, v. 1, 2015.

LAGARE, N. J. S.; ABRENICA-ADAMAT, L. R. Effects of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extract on early life stages of *Artemia salina*. **Advances in Environmental Sciences**, v. 7, n. 3, p. 468–474, 2015.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extatos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 331–336, 2011.

LINEMANN, T.; THOMSEN, L. B.; JARDIN, K. G. D.; LAURSEN, J. C.; JENSEN, J. B.; LICHOTA, J.; MOOS, T. Development of a novel lipophilic, magnetic nanoparticle for in vivo drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 246–260, 23 abr. 2013.

LOPEZ, J. A.; GONZÁLEZ, F.; BONILLA, F. A.; ZAMBRANO, G.; GÓMEZ, M. E. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ magnetic nanofluid. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, v. 30, n. 1, p. 60–66, 2010.

LOUGUET, S.; ROUSSEAU, B.; EPHERRE, R.; GUIDOLIN, N.; GOGGIO, G.; MORNET, S.; DUGUET, E.; LECOMMANDOUX, S.; SCHATZ, C. Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganite nanoparticles for remotely triggered drug release. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 1408-1417, 2012.

MOHAJERI, P.; NOROZI, B.; ATASHI, S.; FARAHANI, A. Anti tuberculosis drug resistance in west of iran. **Journal of global infectious diseases**, v. 6, n. 3, p. 114–117, 2014.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 3, p. 129–141, jul. 2011.

MA, N.; CHENG, H.; LU, M.; LIU, Q.; CHEN, X.; YIN, G.; ZHU, H.; ZHANG, L.; MENG, X.; TANG, Y.; ZHAO, S. Magnetic Resonance Imaging with Superparamagnetic Iron Oxide Fails to Track the Long-term Fate of Mesenchymal Stem Cells Transplanted into Heart. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–9, 12 mar. 2015.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A Modified Microplate Cytotoxicity Assay With Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633–638, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31–34, 1982.

MIN, H. K.; KIM, E. O.; LEE, S. J.; CHANG, Y. K.; SUH, K. S.; YANG, C. W.; KIM, S. Y.; HWANG, H. S. Rifampin-associated tubulointerstitial nephritis and Fanconi syndrome presenting as hypokalemic paralysis. **BioMed Central Nephrology**, v. 14, p. 1-5, 16 jan. 2013.

MOHSENI, M.; GILANI, K.; MORTAZAVI, S. A. Preparation and characterization of rifampin loaded mesoporous silica nanoparticles as a potential system for pulmonary drug delivery. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 14, n. 1, p. 27–34, 2015.

MUKHOPADHYAY, S. S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. **Nanotechnology, science and applications**, v. 7, p. 63–71, 2014.

NARRA, K.; DHANALEKSHMI, U.; RANGARAJ, G.; RAJA, D.; KUMAR, C. S.; REDDY, P. N.; MANDAL, A. B. Effect of formulation variables on rifampicin loaded alginate beads. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 3, p. 715–721, 2012.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.2, p. 143- 148, 2008.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological Screening of Kenyan Medicinal Plants Using *Artemia Salina* L. (*Artemiidae*). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458–478, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PELIZZA, G.; NEBULONI, M.; FERRARI, P.; GALLO, GG. Polymorphism of rifampicin. **Il Farmaco; edizione scientifica**, v. 32, n. 7, p. 471–481, 1977. Pelizza, G

PHARMACOPEIA, U. S. USP MONOGRAPHS: RIFAMPICIN. **USP 29-NF24**, p. 1917-1920, 2014.

PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

PRADHAN, N.; SINGH, S.; OJHA, N.; SHRIVASTAVA, A.; BARLA, A.; RAI, V.; BOSE, S. Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

PRIJIC, S.; PROSEN, L.; CEMAZAR, M.; SCANCAR, J.; ROMIH, R.; LAVRENCAK, J.; BREGAR, V. B.; COER, A.; KRZAN, M.; ZNIDARSIC, A.; SERSA, G. Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma. **Biomaterials**, v. 33, n. 17, p. 4379–4391, jun. 2012.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 1-6, 2015.

RAJASREE, S. R. R.; VUMAR, V. G.; ABRAHAM, L. S.; INDABAKANDAN, D. Studies on the toxicological effects of engineered nanoparticles in environment—areview. **International Journal of Applied Bioengineering**, v. 4, n. 2, 2010.

RODRÍGUEZ, A.; VILLEGAS, E.; MONTOYA-ROSALES, A.; RIVAS-SANTIAGO, B.; CORZO, G. Characterization of antibacterial and hemolytic activity of synthetic pandinin 2 variants and their inhibition against Mycobacterium tuberculosis. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.

RAHMATULLAH, M.; SADEAK, S. M. I.; BACHAR, S. C.; HOSSAIN, M. T.; ABDULLAH-AL-MAMUN.; MONTAHA.; JAHAN, N.; CHOWDHURY, M. H.; JAHAN, R.; NASRIN, D.; RAHMAN, M.; RAHMAN, S. Brine Shrimp Toxicity Study of Different Bangladeshi Medicinal Plants. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 163–173, 2010.

RODD, A. L.; CREIGHTON, M. A.; VASLET, C. A.; RANGEL-MENDEZ, J. R.; HURT, R. H.; KANE, A. B. Effects of surface-engineered nanoparticle-based dispersants for marine oil spills on the model organism Artemia franciscana. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 6419–6427, 2014.

SANTOS, C. M. B.; SILVA, S. W.; GUILHERME, L. R.; MORAIS, P. C. SERRS Study of molecular arrangement of amphotericin b adsorbed onto iron oxide nanoparticles precoated with a bilayer of lauric acid. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 42, p. 20442–20448, 2011.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, J.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. L.; SEGURA-CENICEROS, E. P.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MEDINA-MORALES, M. A.; AGUILAR, C. N.; ILINÁ, A. Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 504–512, 2014.

SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.; VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia em acuicultura. **Project reports**, n.10, 312p., 1986.

SHEVTSOV, M. A.; NIKOLAEV, B. P.; YAKOVLEVA, L. Y.; MARCHENKO, Y. Y.; DOBRODUMOV, A. V.; MIKHARINA, A. L.; MARTYNOVA, M. G.; BYSTROVA, O. A.; YAKOVENKO, I. V.; ISCHENKO, A. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 273–287, 3 jan. 2014.

SCHIANTI, J. N.; CERIZE, N. N. P.; OLIVEIRA, A. M.; DERENZO, S.; SEABRA, A. C.; GÓNGORA-RUBIO, M. R. Rifampicin Nanoprecipitation using Flow Focusing Microfluidic

Device. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 04, p. 1–6, 25 abr. 2013.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; CHINARELLI, S. H. RECHE Manutenção de leveduras por congelamento a – 200C. **RBAC**, v. 40, n. 01, p. 73-74, 2008.

SHRESTHA, A.; HAMBLIN, M. R.; KISHEN, A. Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 10, n. 3, p. 491–501, abr. 2014.

SINGH, D.; MCMILLAN, J. M.; KABANOV, A. V.; SOKOLSKY-PAPKOV, M.; GENDELMAN, H. E. Bench-to-bedside translation of magnetic nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 9, n. 4, p. 501–516, abr. 2014.

TAYLOR, E.; WEBSTER, T. J. Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1463–1473, 12 jul. 2011.

TODD, T.; ZHEN, Z.; TANG, W.; CHEN, H.; WANG, G.; CHUANG, Y. J.; DEATON, K.; PAN, Z.; XIE, J. Iron Oxide Nanoparticle Encapsulated Diatoms for Magnetic Delivery of Small Molecules to Tumors. **Nanoscale**, v. 6, n. 4, p. 2073-2076, 2014.

TERRY, A. B.; SALAAM, A. D.; NYAIRO, E.; THOMAS, V.; DEAN, D. R. PLGA Nanoparticles for the Sustained Release of Rifampicin. **Journal Nanogenomics and Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2014.

UNTERWEGER, H.; TIETZE, R.; JANKO, C.; ZALOGA, J.; LYER, S.; DÜRR, S.; TACCARDI, N.; GOUDOURI, O. M.; HOPPE, A.; EBERBECK, D.; SCHUBERT, D. W.; BOCCACCINI, A. R.; ALEXIOU, C. Development and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles with a cisplatin-bearing polymer coating for targeted drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3659–3676, 5 ago. 2014.

WANKHEDE, M.; BOURAS, A.; KALUZOVA, M.; HADJIPANAYIS, C. G. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 173–186, mar. 2012.

WAHAJUDDIN.; ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3445-3471, jul. 2012.

WEHRLI, W; STAEHELIN, M. Actions of the rifamycins. **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 3, p. 290–309, set. 1971.

XIONG, F.; WANG, H.; FENG, Y.; LI, Y.; HUA, X.; PANG, X.; ZHANG, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; GU, N. Cardioprotective activity of iron oxide nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-8, 26 fev. 2015.

XIAO, Y.; LIN, Z.T.; CHEN, Y.; WANG, H.; DENG, Y.L.; LE, D.E.; BIN, J.; LI, M.; LIAO, Y.; LIU, Y.; JIANG, G.B.; BIN, J. High molecular weight chitosan derivative polymeric micelles encapsulating superparamagnetic iron oxide for tumor-targeted magnetic resonance imaging. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1155-1172, 5 fev. 2015.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug discovery today**, v. 17, n. 1-2, p. 71-80, jan. 2012.

YEN, S. K.; PADMANABHAN, P.; SELVAN, S. T. Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery. **Theranostics**, v. 3, n. 12, p. 986-1003, dez. 2013.

ZHOU, J.; ZHANG, J.; GAO, W. Enhanced and selective delivery of enzyme therapy to 9L-glioma tumor via magnetic targeting of PEG-modified, β -glucosidase-conjugated iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2905-2917, jun. 2014.