



Thalita Hellen Nunes Lima

**Síntese, caracterização e avaliação do potencial fotossensibilizador
de nanopartículas do polímero conjugado PCPDTBT visando a fotoinativação de
bactérias**

Campo Grande – MS

2023



Thalita Hellen Nunes Lima

**Síntese, caracterização e avaliação do potencial fotossensibilizador
de nanopartículas do polímero conjugado PCPDTBT visando a fotoinativação de
bactérias**

Dissertação apresentada a banca examinadora, como critério parcial de aprovação para a obtenção do Título de Mestre em Ciências dos Materiais do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof^o Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Campo Grande – MS

2023



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais
Mestrado

Aos vinte e sete dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, às sete horas e trinta minutos, na Videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Anderson Rodrigues Lima Caires (UFMS), Alessandra Ramos Lima (USP) e Heberton Wender Luiz dos Santos (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **THALITA HELLEN NUNES LIMA**, CPF 05157095147, do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Síntese, caracterização e avaliação do potencial fotossensibilizador de nanopartículas do polímero conjugado PCPDTBT visando a fotoativação de bactérias**" e orientação de Anderson Rodrigues Lima Caires. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiaÇÃO
Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Interno)		Aprovada
Dra. Alessandra Ramos Lima (Extemo)		Aprovada
Dra. Cynthia Suzyelen Albuquerque Caires (Extemo) (Suplente)		
Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos (Interno)	Documento assinado digitalmente HEBERTON WENDER LUIZ DOS SANTOS Data: 27/01/2023 11:53:07-0300 Verifique em https://verificador.itl.br	Aprovada
Dr. Samuel Leite de Oliveira (Interno) (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada a declarar.

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas: Presidente da Banca Examinadora Aluna

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família por todo o suporte durante o desenvolvimento do mestrado. Em especial, sou grata a minha mãe Luciene Nunes Bezerra, que apesar de não ter tido a oportunidade de estudar, sempre acreditou na educação como um meio para a nosso desenvolvimento. As minhas irmãs, Daila R. N. Lima e Thais D. N. Lima, agradeço por todo amparo que me ofereceram durante toda a minha formação. Sem essas três mulheres não seria possível trilhar o caminho que trilhei e, nem mesmo, me tornar a cientista que me considero hoje.

Meus agradecimentos a todos os professores, em especial o meu orientador desde a iniciação científica, professor Dr. Anderson R. L. Caires, por todo o suporte, apoio e compreensão perante todas as típicas situações adversas da vida acadêmica no Brasil. Também, ao Grupo de Óptica e Fotônica por todo o auxílio, em especial a Dra. Thais F. Abelha pela contribuição no processo de síntese das nanopartículas e por todos os ensinamentos. Ao Dr. William M. Facchinatto e aos doutorandos Leandro de Oliveira e Fernando da Conceição, agradeço pelas enriquecedoras discussões e da IC Jhoene H. V. Polcherio. Ademais, sou imensamente grata pelas contribuições das Dra. Alessandra R. Lima; Dra. Cynthia S. A. Caires e Dra. Cicera M. Silva na minha formação enquanto cientista. Também agradeço a Ana Carolina Maranni por todo o suporte durante a graduação e o mestrado, obrigada por ser a segunda mulher na sala.

Por fim, e não menos importante, agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado recebida durante toda a execução da minha pesquisa. Assim como, as outras instituições de fomento à pesquisa, tais como CNPq e FUNDECT.



*Aos meus amados sobrinhos - Eduardo, Felipe
e Isadora - vocês merecem um futuro maravilhoso, como cientista estou
tentando construí-lo para vocês.*



*Como uma cientista mulher, eu ainda sou
incomum, mas em meu coração eu nunca fui outra
coisa - Hope Jahren*

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um dos principais desafios atuais da saúde global. Estima-se que se nenhuma ação for tomada no presente, em 2050, o número de mortes por bactérias resistentes será de 10 milhões por ano e as perdas econômicas podem chegar a 100-210 trilhões de dólares. Nesse cenário, os polímeros conjugados (PCs) têm mostrado excelentes propriedades fototônicas, como por exemplo o poli[2,6-(4,4-bis-(2-Etilhexil)-4H-ciclopenta[2,1-b;3,4-b']ditiófenó)-alt-4,7(2,1,3benzotiadiazol)]-PCPDTBT que tem sido usado como um agente fotoativável na terapia fototérmica de células cancerosa. Entretanto, o fato do PCPDTBT não ser solúvel em água, torna o uso deste polímero um desafio para a maioria das aplicações biomédicas. Assim, este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e aplicar nanopartículas de PCPDTBT (PCPDTBT-NPs) no processo de fotoinativação de bactérias. Neste caso, as nanopartículas foram sintetizadas utilizando o método de nanoprecipitação. Para a avaliação da atividade microbiológica, foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). As cepas foram incubadas com o PCPDTBT-NPs por 1 h e então submetidas a dois tratamentos: (i) irradiados e (ii) não irradiados. Os grupos irradiados foram expostos a luz branca, vermelha, verde e azul. Para desvendar os mecanismos fotoinativação foram realizados experimentos de avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA e também foram estudados os efeitos fototérmicos induzidos pelas nanopartículas. As PCPDTBT-NPs produzidas possuem diâmetro hidrodinâmico médio de 140,2 nm e um valor de potencial zeta em torno de 2,03 mV. Além disso, apresentaram duas bandas de absorção com máximos em aproximadamente 408 e 655 nm, enquanto o sinal de fluorescência apresentou duas bandas nas regiões entre 400-500 nm e 600-800 nm. As PCPDTBT-NPs não apresentaram efeitos bactericidas para o grupo não submetidos a irradiação, já as amostras que foram expostas à luz branca apresentaram um efeito fotobactericida contra *E. coli*. Observou-se a geração de EROs para todas as condições de irradiação. Por outro lado, apenas a luz branca produziu uma elevação da temperatura significativa para o contexto de inativação fototérmica de microrganismo. Portanto, os resultados sugerem que as PCPDTBT-NPs são materiais promissores para serem usados para fotoinativar bactérias através de uma ação combinada do efeito fotodinâmico (geração de EROs) e fototérmico (geração de calor).

Palavras chaves: Fotoinativação; bactérias; polímeros conjugados; PCPDTBT; nanopartículas;

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the main actual global health challenges. It is estimated that if no action is taken in present, the number of deaths from resistant bacteria will be of 10 million dollars per year in 2050. Furthermore, antimicrobial resistance would economic losses, which can reach 100-210 trillion dollars by 2050. In this scenario, conjugated polymers have shown excellent optical properties. The conjugated polymer poly[2,6-(4,4-bis-(2-Ethylhexyl)-4*H*-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophene)-alt-4,7(2,1,3benzothiadiazole)]-PCPDTBT has been used as a photoactivatable agent in photothermal therapy of cancer cells. However, the fact that PCPDTBT is not soluble in water makes the use of this polymer a challenge for most biomedical applications.. The main challenge related to the use of PCPDTBT in biomedicine is the fact that it is not a water-soluble polymer. Hence, this work aimed to synthesize, characterize and apply PCPDTBT nanoparticles (PCPDTBT-NPs) in the photoinactivation of bacteria. We prepared nanoparticles from PCPDTBT through nanoprecipitation methods using amphiphilic stabilizing agents (Tween 20). For the assessment of the biological activity, the gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were used. The strain was incubated with the PCPDTBT-NPS for 1 h and then exposed to two treatments that were (i) irradiated and (ii) kept in the dark. The irradiated groups were exposed to white, red, green and blue light. To unravel the photoinactivation mechanisms, experiments were carried out to evaluate the production of reactive oxygen species using the fluorescent probe DCFHDA and the thermal effects of irradiation were also studied. In the irradiated group, the bacteria were subjected to white, red, green and blue light, for 90 min. PCPDTBT-NPs presented an average hydrodynamic diameter of 140.2 nm and a mild electropositive zeta potential ($2,03 \pm 3,98$ mV). The PCPDTBT-NPs showed absorption peaks at 408 and 655 nm, while the fluorescence emission showed bands in the region of 400-500 nm and 600-800 nm. The PCBTBT-NPs did not show bactericidal effects for the dark group, however, the samples that were exposed to white light presented a photobactericidal effect against *E. coli*. The generation of ROS was observed for all irradiation conditions. On the other hand, only white light produced significant heat for the context of photothermal therapy. Therefore, the results suggest that PCPDTBT-NPs are promising materials to be used to photoinactivate bacteria through the combined action of ROS and heat generation.

Keywords: photoinactivation; bacterial; conjugated polymers; PCPDTBT; nanoparticles.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1 Bactérias e as doenças infecciosas – passado e futuro.	12
1.2 Mecanismos de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua disseminação.....	13
1.3.1 Inativação fotodinâmica de bactérias.....	17
1.3.2 Moléculas de Interesse em IFD	20
1.3.3 Mecanismos de Ação de Nanopartículas metálicas.....	22
1.4 Polímeros conjugados	25
1.4.1 Nanopartículas de PCs (PC-NPs)	26
2. Objetivos gerais	29
2.1 Objetivos Específicos	29
3. Metodologia.....	30
3.1 Preparo das nanopartículas	30
3.2 Caracterizações de Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ)....	30
3.4 Caracterizações ópticas.	31
3.5 Experimentos biológicos.....	32
3.6 Avaliação da Geração de EROs.....	32
3.8 Avaliação dos efeitos fototérmicos.....	34
4. Resultados e discussões	35
4.1 Resultados EDL e Potencial Zeta.	35
4.2 Caracterizações ópticas	37
4.3 Resultados dos Bioensaios	39
4.4 Resultados Geração de EROs	44
4.5 Resultados dos efeitos fototérmicos.....	45
4.6 Possíveis mecanismos de inativação com base nos resultados.	47
5. Conclusões.....	51
7. Referências	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contribuição dos condutores modificáveis para resistência antimicrobiana.	15
Figura 2: Estimativa dos órbitos (MRA) em 2050.	16
Figura 3: Diferença entre os mecanismos de ação dos antibióticos e da IFD.	18
Figura 4: Citologia das membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	19
Figura 5: Exemplos de FS moleculares usados em IFD.	20
Figura 6: Diagrama de Jablonski Simplificado.	21
Figura 7: Soluções aquosa de AuNPs de diferentes dimensões.	22
Figura 8: Mecanismo de ação da RLP no processo de IFD de bactéria.	23
Figura 9: Mecanismo de ação de NPs semicondutora no processo de IFD de bactérias.	25
Figura 10: Exemplos de PCs.	26
Figura 11: Método de Sínteses de PC-NPs, sendo que em azul as soluções aquosas e em vermelho as soluções orgânicas.	27
Figura 12: Polímero conjugado PCPDTBT.	28
Figura 13: Processo de preparação das NPs de PCPDTBT.	30
Figura 14: Espectros de absorção UV-vís da PCPDTBT-NPs e formulação controle na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Tween 20 na concentração 1.2 mg.mL^{-1} , todos em água destilada.	38
Figura 15: Espectros de fluorescência da PCPDTBT-NPs e formulação controle na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Tween 20 na concentração 1.2 mg.mL^{-1} , todos em água destilada.	39
Figura 16: Experimento biológicos realizados com a <i>S. aureus</i> . Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia $48,6 \text{ J. cm}^2$ e a irradiação com a luz branca com dose de energia de $144,8 \text{ J. cm}^2$	40
Figura 17: Experimento biológicos realizados com a <i>S. aureus</i> . Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia $48,6 \text{ J. cm}^2$ e a irradiação com a luz branca com dose de energia de $144,8 \text{ J. cm}^2$	42
Figura 18: Resultados de geração de EROs para todas as condições de irradiação estudadas. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 108 J. cm^2 e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 324 J. cm^2	44
Figura 19: Aproximações equacionais para as curvas de geração de EROs. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 108 J. cm^2 e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 324 J. cm^2	45
Figura 20: Variação de temperatura induzida pelas PCPDTBT-NPs ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para diferentes condições de irradiação. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia $48,6 \text{ J. cm}^2$ e a irradiação com a luz branca com dose de energia de $144,8 \text{ J. cm}^2$	47
Figura 21: Efeito fototérmico das PCPDTNB-NPs ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induzido pela irradiação de luz branca ($145,8 \text{ J. cm}^2$).	48
Figura 22: Placas de petri dos ensaios biológicos.	49
Figura 23: Possível mecanismo de ação da fotoinativação das bactérias.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições experimentais das análises de fluorescência.....	32
Tabela 2: Parâmetros de Fluorescência para as medidas de avaliação de geração de EROs	34
Tabela 3: Resultados DHM, Potencial Zeta (ζ) e Polidispersividade.	35
Tabela 4: Taxas de produção de EROs das PCPDTBT- NPs para diferentes condições de irradiação	45

1. Introdução

1.1 Bactérias e as doenças infecciosas – passado e futuro.

No passado, mortes em massa causadas por infecções bacterianas eram algo recorrente, como a pandemia causada pela *Yersinia pestis*, popularmente conhecida como peste negra, no século XIV¹. Além disso, pode-se citar as frequentes epidemias de diversas doenças ocasionadas por bactérias, por exemplo, as de tuberculose ao longo dos séculos ficaram conhecida como praga branca². Atualmente, compreendemos que os microrganismos como bactérias, fungos e vírus são responsáveis de diversas classes de infecções capazes de afetar todos os órgãos do corpo humano³.

Bactérias são organismos unicelulares procariontes divididos em classes: Gram-positivas e Gram-negativas; aeróbicos ou anaeróbicos; nocivos e/ou benéficos para a saúde humana. Outrora, doenças relacionadas a infecções bacterianas eram difíceis de serem tratadas, entretanto, Paul Ehrlich (1854–1915) desenvolveu uma droga a base de arsênico que possibilitou o tratamento da sífilis, uma infecção causada pela bactéria *Treponema pallidum* (*T. pallidum*)⁴.

Anos depois, em 1928, com a descoberta da penicilina, as infecções bacteriana passaram a ter um método mais efetivo de tratamento, o que resultou em uma redução da mortalidade^{5,6}. Conseqüentemente, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos contribuiu para o avanço da medicina clínica e cirúrgica⁷.

Durante um período extremamente breve da história humana, achou-se que a guerra contra os microrganismos estava acabada, como disse o Cirurgião Geral William H. Stewart (1852-1922), “é a hora de fechar o livro sobre doenças infecciosas e declarar a guerra contra a pestilência vencida”⁸. Infelizmente, logo ficou claro que a fala de Stewart estava equivocada, pois foi observado que, pouco tempo após o desenvolvimento e uso de um antimicrobiano, ocorre o surgimento de cepas resistentes a esse medicamento.

Nesse contexto, podemos citar o caso da metilina, introduzida comercialmente em 1959 e, já em 1960, foram observadas cepas de *Staphylococcus* resistentes a ela^{8,9}. Para alguns antimicrobianos, um tempo maior foi necessário para que fossem notados os surgimentos de cepas resistentes aos mesmos. A vancomicina, que foi disponibilizada em 1958 e cepas resistentes a ela só foram observadas em 1979. Por outro lado, há o caso do Levofloxacino, que começou a ser receitado em 1996 e, no mesmo ano, notou-se o surgimento de *Pneumococcus* resistentes a esse antibiótico⁹.

Desse modo, é perceptível que à medida que foram criados métodos de tratamentos a base de antibióticos, as bactérias também desenvolveram diversos mecanismos para a sua sobrevivência, tornando-se resistentes a esses medicamentos. Por conta disso, as infecções que antes eram facilmente tratadas passaram a apresentar altos índices de mortalidade⁷.

Em 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁰ declarou que os microrganismos resistentes a antibióticos (MRA) estão entre as dez principais ameaças globais à saúde pública¹¹. De acordo com o relatório desenvolvido por O'neil (2016)¹², caso nenhuma medida seja tomada, estimava-se que em 2050 será alcançada a marca de 10 milhões de mortes por ano em decorrência das infecções causadas por MRA.

Além de ser um problema de saúde pública, é também uma questão econômica, tendo em vista que um estudo recentemente realizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (2018)¹³, determinou que as mortes induzidas por bactérias resistentes geram um prejuízo médio de 3 bilhões de dólares ao ano. Em consonância com esse trabalho, as perdas econômicas relacionadas com as infecções causadas por MRA foram em torno de 28 bilhões de dólares em 2015. Ademais, estima-se que os prejuízos chegarão a 100-210 trilhões até 2050, consumindo 1% do produto interno bruto (PIB) mundial¹⁴.

Desse modo, fica evidente que as infecções causadas por bactérias não são uma questão limitada ao passado, nem mesmo uma guerra vencida, mas sim são uma das principais questões a serem resolvidas em nosso presente e futuro.

1.2 Mecanismos de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua disseminação.

A resistência antimicrobiana pode ser classificada como intrínseca, adaptativa ou adquirida. O modo intrínseco é referente a morfologia já existente dos patógenos como, por exemplo, a extensa parede de peptídeoglicano na parede celular das bactérias Gram-positivas, ou a segunda membrada das bactérias Gram-negativa. Em contrapartida, a resistência adaptativa é quando o microrganismo, que antes era sensível, sofre uma mutação ou adquire um novo material genético, o tornando resistente a um determinado método de tratamento^{9,15}.

Quando uma bactéria tem alterações morfológicas induzidas por um ou mais antibióticos, ou por sinal ambiental específico tais como: estresse, estado de crescimento, pH, concentrações de íons, condições de nutrientes, níveis sub-inibitórios de antibióticos⁴ ocorre o processo de resistência antimicrobiana adaptativa. Diferentemente da resistência intrínseca e a

adquirida, a adaptativa é transitória, *i.e.*, temporária. Esse tipo de mecanismo de resistência é responsável pela resposta rápida das bactérias a qualquer alteração no ambiente inclusive, a inserção de uma agente antimicrobiano^{9,4}.

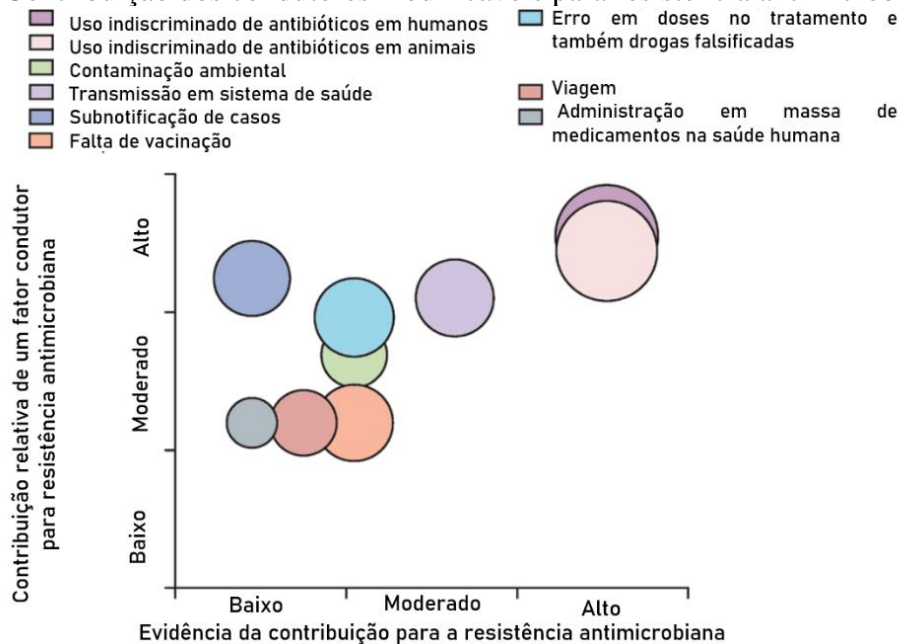
A resistência adquirida acontece quando há um processo de transmissão da resistência antimicrobiana. Esse processo pode ocorrer através da transferência vertical e/ou horizontal de genes. A transferência vertical ocorre quando uma bactéria resistente transmite os genes responsáveis pela sua resistência a suas descendentes¹⁶. Vale ressaltar que a transferência horizontal de genes pode ocorrer através de três mecanismos principais sendo eles: (i) transformação; (ii) transdução e (iii) combinação⁴. A transformação ocorre quando uma bactéria sensível entra em contato com o fragmento genético de uma bactéria resistente, o material genético adquirido é incorporado pela primeira bactéria em seu cromossomo⁹. Nesse primeiro cenário, o uso irregular de antibióticos pode facilitar uma oferta maior de material genético com genes resistentes para as bactérias sensíveis^{9,15}.

Já a transdução ocorre quando um bacteriófago, um vírus capaz de infectar uma bactéria e até mesmo destruí-la, transporta o material genético de uma bactéria resistente para uma bactéria susceptível e esse material genético acaba sendo incorporado a ela. A partir dele, a bactéria susceptível desenvolve mecanismos de sobrevivência a ação de um antibiótico⁹.

A conjugação ocorre quando duas bactérias vivas transferem material genético uma para outra, isso ocorre por meio do contato físico direto entre as duas células. Nesse mecanismo um invólucro se forma entre as duas células bacterianas, por meio desse um plasmídeo é transferido da célula doadora para a célula receptora. Muitos genes que conferem resistência antimicrobiana podem estar presentes em um único plasmídeo, essa característica possibilita o salto evolutivo de uma bactéria sensível, para uma bactéria resistente a diversas classes de antibióticos em um evento único^{9,17}.

Com base nos mecanismos de surgimento da resistência antimicrobiana supramencionados, é perceptível que o desenvolvimento da resistência é um mecanismo natural e evolutivo, entretanto esse mecanismo pode ser acelerado pelo uso indiscriminado de antibióticos¹⁵ conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Contribuição dos condutores modificáveis para resistência antimicrobiana.



Fonte: Adaptado. Holmes *et al.*, 2016¹⁵.

Enquanto nos países desenvolvidos as infecções causadas por MRA estão, em sua maioria, restritas as infecções referentes ao ambiente hospitalar, nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos as doenças causadas por MRA estão presentes, também, em infecções tidas como doenças comunitárias^{7,11}.

As doenças de ambiente hospitalar são as infecções de correntes sanguíneas, majoritariamente causadas pela *Escherichia coli* (*E. coli*)¹¹, que podem ser desenvolvidas após procedimentos cirúrgicos ou ambulatoriais como, a inserção ou a retirada de cateter⁷. Outro ponto são as infecções gastrointestinais, como a colite causada por *Clostridioides difficile* (*C. difficile*). Além disso, também há as infecções associadas à unidade de terapia intensiva como, a pneumonia associada à ventilação mecânica, a qual pode ser causada por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)⁷.

Por outro lado, as infecções comunitárias são referentes ao adoecimento adquirido no ambiente fora dos hospitais, por exemplo: infecções respiratórias como pneumonia, infecções do trato urinário (ITUs) e gastrointestinais, e até mesmo infecções de pele⁷. Geralmente, as bactérias que causam essas infecções estão presentes nos ambientes comunitários, como nos sistemas de saneamento básico, nos alimentos e, também, na microbiota da população¹⁸.

O principal problema relacionado as infecções comunitárias são os altos índices de mortalidade nos países subdesenvolvidos. No continente africano e no sul da Ásia, 45% das

mortes são resultado de infecções causadas por MRA⁷. Ademais, como as infecções adquiridas na comunidade são mais frequentes do que aquelas relacionadas ao ambiente hospitalar, entende-se que por conta do fato dessas infecções serem tratadas com o uso de antibióticos, elas possuem alto impacto na disseminação dos MRA.

Apesar dos países desenvolvidos e os subdesenvolvidos apresentarem realidade um tanto quanto diferente, o fato de vivermos em um mundo globalizado possibilita a disseminação de um MRA que, inicialmente, pode surgir em um país e acabar sendo levado para outro¹⁹. Nesse sentido, o MRA, além de ser um dos nossos principais problemas do presente e do futuro, também é um problema global como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2: Estimativa dos óbitos (MRA) em 2050.



Fonte: Adaptado O'neil, 2016²⁰.

O Brasil e os países da América Latina apresentam níveis altos de resistência bacteriana para seus principais patógenos, quando comparados com os índices da Europa e dos Estados Unidos. Os patógenos mais abundantes são os bacilos Gram-negativos não fermentadores, as *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido, como a *E. coli*, e alguns organismos Gram-positivos como a *S. aureus*²¹. Desse modo, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para o combate da resistência antimicrobiana.

1.3 Alternativas para a Resistência Antimicrobiana

Do ponto de vista histórico, a principal forma de lidar com a resistência antimicrobiana foi desenvolvendo novos antibióticos, porém, esse método de tratamento tem se tornado gradualmente ineficaz para a solução desse problema^{9,22,17}. Outro aspecto de suma importância no combate a resistência antimicrobiana é o desenvolvimento de métodos

diagnóstico, a fim de definir quais são as cepas causadoras de determinado processo infeccioso antes da escolha do melhor tratamento^{22,19}.

Nesse sentido, podemos separar as medidas de combate a resistência microbiana em duas frentes principais – prevenção e tratamento⁸. A prevenção envolve desenvolvimento de políticas públicas de saneamento básico¹⁸, de métodos de diagnóstico e de vacinas⁷. Essas medidas de prevenção buscam reduzir a proliferação das cepas bacterianas e também a redução da ocorrência de infecções^{7,8}.

Por outro lado, tendo ocorrido uma infecção é necessário novos métodos de tratamento, não só para as infecções de cepas multirresistentes, mas também para infecções mais simples, com o propósito de reduzir o consumo de antibióticos. Logo, a exploração de alternativas para os tratamentos faz-se indispensável, dentre elas podemos citar o uso de bacteriógrafos, controle de microbiota e novos antibióticos. Entretanto, como já mencionado os bacteriógrafos podem participar do processo de evolução de bactérias sensíveis para resistentes. Além desses métodos de tratamento, a inativação fotodinâmica tem se mostrado uma proposta promissora para o neutralizar uma vasta gama de microrganismos^{6,23}.

1.3.1 Inativação fotodinâmica de bactérias

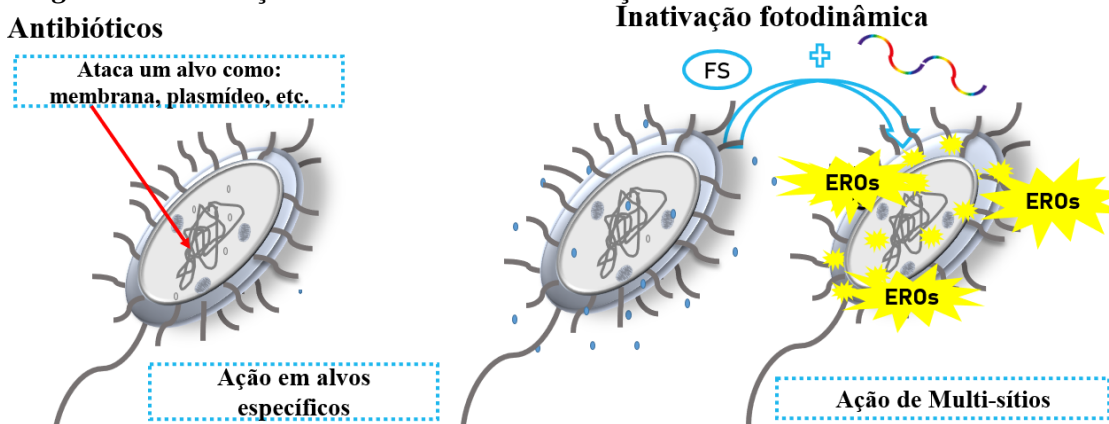
A inativação fotodinâmica (IFD) como conhecemos foi descoberta acidentalmente há mais de 100 anos. Nesse caso, Oscar Raab observou a morte de um microrganismo chamado *infusório* na presença de um corante fluorescente, o laranja de acridina, que foi exposto a luz solar²⁴.

O processo de IFD de microrganismos inicia-se no momento que as bactérias são expostas a um agente fotossensível, em seguida há a irradiação de luz, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), que induzirá a morte desses organismos. O agente fotossensível, denominado fotossensibilizador (FS), possui a característica de interagir com o oxigênio molecular (O_2) produzindo EROs^{6,25,26}. Além disso, a maneira como ocorrerá essa reação depende das características do FS^{25,26}.

Somada a eficácia da IFD, há uma vantagem adicional dessa técnica em relação aos antibióticos, o fato de os microrganismos não serem capazes de desenvolver resistência microbiana a IFD devido ação de multi-sítios da técnica²⁷.

Diferentemente dos antibióticos que tem uma ação pontual em um determinado alvo de ação, o mecanismo da IFD garante uma ação de multi-sítios, *i.e.*, o que gera EROs em vários sítios simultaneamente, destruindo a bactéria⁶ conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 3: Diferença entre os mecanismos de ação dos antibióticos e da IFD.



Fonte: Criada pela autora com base no trabalho de Maisch, 2015⁶.

Essa técnica já foi avaliada em diferentes cepas bacterianas que vão desde Gram-positivas a Gram-negativas, multirresistentes e não multirresistentes, nas quais, em inúmeros casos, alcançou-se a inativação completa^{25,27}. Um estudo realizado por Sebrão *et al.* (2017)²⁸ demonstrou a redução do crescimento da *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) utilizando o corante Rosa Bengala (RB) e o Azul de Metileno (AM) sob a irradiação de luz *laser* com comprimento de onda em 532 e 630 nm, respectivamente.

O trabalho desenvolvido por Caires *et al.* (2017)²⁹ avaliou os efeitos bactericidas nas cepas *E. coli* e *S. aureus* de dois compostos – Eosina Azul de Metileno (EAM) e a Clorofilina cúprica de sódio (CuChlNa) sob irradiação em 625 nm. Os dois compostos induziram a inativação total das cepas de *S. aureus*, para o grupo irradiado na concentração de 5 μM e dose de energia de 30 J. cm^{-2} . Diferentemente do que observado na *S. aureus*, no ensaio realizado com a *E. coli* apenas a EAM teve resultado fotobactericida na concentração de 20 μM .

Dentre os trabalhos utilizando outras cepas, destacam-se os que apresentaram a IFD de bactérias resistentes como é o caso de Pérez-Laguna *et al.* (2020)³⁰ que obteve a inativação completa da *P. aeruginosa*, utilizando AM aliado à luz emitida em 625 nm por um sistema de LED's (*Light Emitter Diode*). A susceptibilidade da *P. aeruginosa* em relação a IFD não foi somente demonstrada por Pérez-Laguna *et al.* (2020)³⁰, esse resultado também foi obtido por

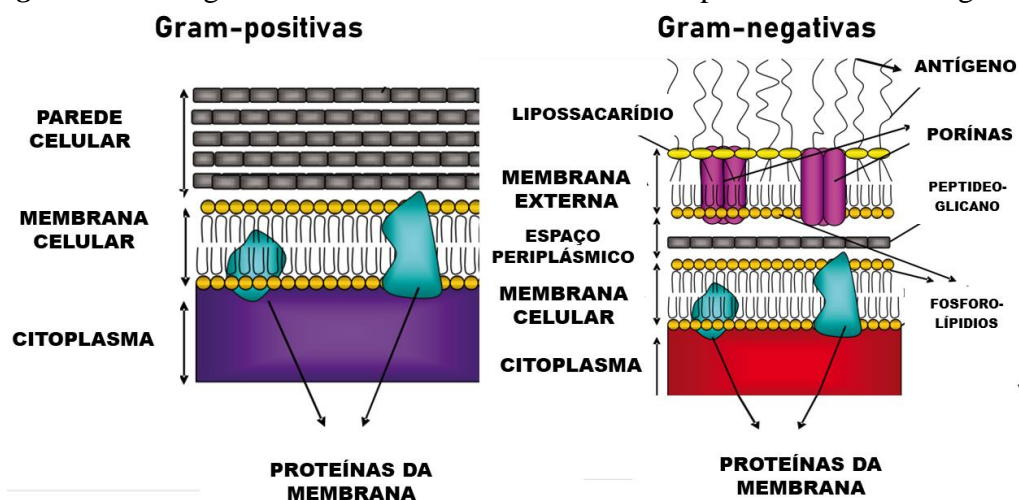
Beneditti *et al.* (2017)³¹ utilizando a Curcumina como FS e irradiação em 470 nm através de um sistema LED's.

Além disso, Khan *et al.* (2017)³² também demonstraram que os microrganismos *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), os quais são resistentes a vários antibióticos, foram susceptíveis a IFD utilizando nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas com AM como FS e irradiados por *laser* com emissão em 625 nm. Ademais, a *E. coli* (*mcr-1* positivo), *P. aeruginosa*, *S. aureus* resistente a meticilina, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), demonstraram-se susceptíveis a IFD para diferentes condições experimentais^{25,33,34}.

Desse modo, é evidente a eficácia da IFD contra diversas cepas bacterianas, tanto resistentes quanto cepas susceptíveis a várias classes de antibiótico. No entanto, foram observados alguns desafios como, por exemplo, a interação do FS com as membranas celulares das bactérias. As interações em escala biológica envolvem diversas variáveis, o que eleva o nível de sua complexidade^{24,35,36}.

Embora existam diferentes bactérias com variadas características, como já mencionado, podemos separar as bactérias em dois grandes grupos – as Gram-positivas e as Gram-negativas. As duas principais diferenças entre esses dois é a carga global e estrutura da membrana plasmática. Enquanto as cepas Gram-positivas possuem uma membrana mais espessa e rígida tendo apenas uma bicamada fosfolipídica e uma camada espessa de peptidoglicano, as Gram-negativas tem uma membrana mais fina e maleável com uma dupla camada fosfolipídica como representado na Figura 4^{37,38}.

Figura 4: Citologia das membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Adaptado. Moreira *et al.*, 2015³⁸.

Essas diferenças estruturais conferem as bactérias mecanismos que dificultam a entrada do FS no meio intracelular. Para contornar este fato, Caires *et al.* (2017)³³ utilizam, além do FS, compostos como dimetilsulfóxido (DMSO) em porcentagens menores que 5% para garantir a entrega do FS no meio intracelular.

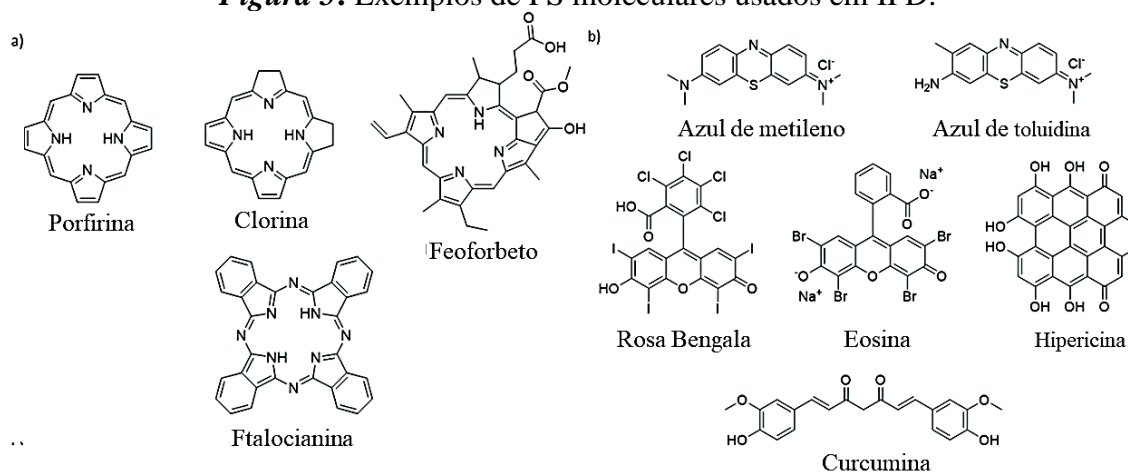
Outra forma de solucionar esse desafio da permeabilização do FS nas membranas celulares é a utilização de uma nova classe de FS – as nanopartículas (NPs) e/ou nanomateriais (NMs). Nesse contexto, diversas classes de NPs têm sido estudadas como FS pelo fato de que, graças as suas dimensões reduzidas, possuem elevada capacidade de penetração no meio intracelular³⁹.

1.3.2 Moléculas de Interesse em IFD

Como já mencionado a terapia fotodinâmica teve seu início há mais de 100 anos, entretanto foi apenas em 1960 que ela foi usada no processo de inativação de bactérias por meio do uso de azul de toluidina como FS. Desse modo, várias moléculas naturais e sintéticas foram utilizadas para a IFD de diversas cepas bacterianas⁴⁰.

De modo geral as moléculas que são utilizadas em IFD são separadas entre porfirinóides e não porfirinóides⁴¹. Alguns exemplos de porfirinóides usados em IFD são: porfirina, clorina, feoforbida e ftalocianina. Por outro lado, os FS tais como AM, azul de toluidina, eosina, RB, hipericina, e curcumina são classificados como não porfirinóides^{40,42}. As ilustrações de alguns exemplos estão na Figura 5.

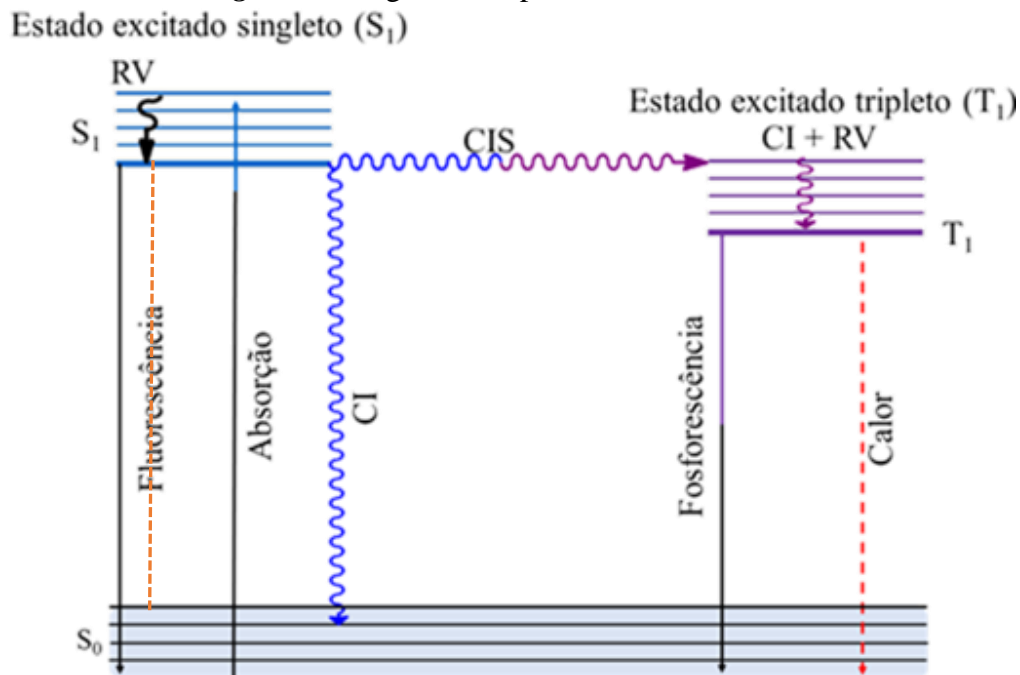
Figura 5: Exemplos de FS moleculares usados em IFD.



Fonte: Adaptado. Bekmukhametova *et al.* (2020)⁴².

Embora sejam separados nesses dois grandes grupos o mecanismo de ação fotodinâmica deles são semelhantes e podem ser explicados como o auxílio do diagrama de Jablonski, como representado na Figura 6.

Figura 6: Diagrama simplificado de Jablonski.



Fonte: Adaptado por Lima (2020)⁴³ de (Darbrpwski, 2017)⁴⁴.

Após absorver a luz, os elétrons do FS são excitados para o estado excitado singlete, como já é bem estabelecido alguns fenômenos podem acontecer após a excitação dos elétrons para o estado singlete tais como: Fluorescência, Conversão Interna (CI) e o Cruzamento de Inter-sistema (CIS)⁴⁴.

Quando ocorre o CIS pode acontecer as transferências de elétrons para o O₂ gerando EROs, esse mecanismo é conhecido como Tipo I⁴⁵. Ainda que muito raro, a transferência de elétrons também pode ocorrer antes do CIS, ainda estando o elétron no estado excitado singlete²⁵. Nesse sentido, o mecanismo Tipo I pode ocorrer através dos estados excitados singlete e tripleto. Entretanto, esse efeito é mais recorrente através do estado tripleto por conta dos tempos de vida dos estados tripletos serem maiores que os dos estados singletos⁴⁴. Enquanto o estado tripleto possui um tempo de vida na ordem de 10⁻² a 10² segundos, o estado excitado singlete possui um tempo de vida na ordem de 10⁻¹¹ a 10⁻⁸ segundos⁴⁶. Um exemplo de composto que gera EROs via estado singlete é o corante E-141ii que, embora não apresente estados tripletos permitidos, gera EROs conforme demonstrado por Caires *et al.*, 2020²⁵.

Além do mecanismo Tipo I também há o mecanismo Tipo II, o qual ocorre quando o FS no estado tripleto transfere energia para O₂ gerando ¹O₂. O ¹O₂ é uma molécula altamente reativa capaz de causar um grande estresse oxidativo na célula⁴³. Desse modo, os EROs e o

$^1\text{O}_2$ provocam um estresse oxidativo de multissítios inativando as bactérias sem gerar resistência antimicrobiana^{10,6}.

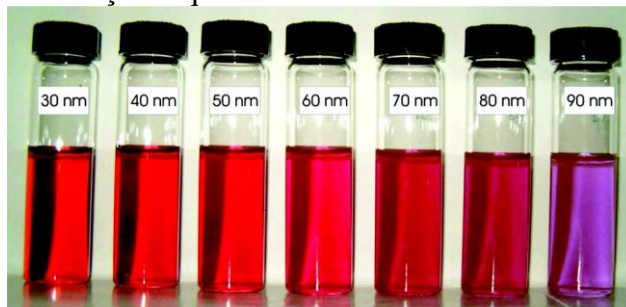
Desse modo, várias moléculas tiveram resultados satisfatórios em IFD através desses mecanismos de formação de EROs. Entretanto, como já mencionado, as bactérias são organismos que possuem meios sofisticados para impedir a entrada dessas moléculas. Nesse sentido, a nanotecnologia é utilizada afim de aprimorar a internalização do material que será usado como FS. Além disso, as NPs podem ser usadas como FS⁴⁷, entretanto o mecanismo de ação vai depender das características dessas NPs como por exemplo, constituição, condutividade, dimensão, entre outros aspectos.

1.3.3 Mecanismos de Ação de Nanopartículas metálicas

Algumas NPs metálicas já possuem atividade microbiana, como é o caso das NPs de prata (AgNPs) que tiveram seu efeito antimicrobiano confirmado para várias cepas bacterianas como a *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*^{48,49}. Além da AgNPs também foram observados efeitos antimicrobianos para as NPs de cobre (CuNPs) sintetizadas por diferentes rotas de síntese como demonstrado por Naik *et al.*, (2020)⁵⁰. Tanto as CuNPs quanto as AgNPs sem estarem associadas a outras moléculas possuem efeitos nocivos as bactérias, entretanto as AuNPs possuem uma facilidade de ser associadas a outras moléculas maximizando seus efeitos antimicrobianos⁵¹.

De modo geral, as NPs possuem dimensões reduzidas, que são inferiores a 100 nm, por conta disso elas tem uma extensa área superficial de reação e apresentam características diferentes do que os mesmos materiais com dimensões microscópicas⁵². Nota-se, por exemplo, a Figura 7 apresenta as fotos de soluções aquosas de AuNPs com diferentes dimensões.

Figura 7: Soluções aquosas de AuNPs de diferentes dimensões.



Fonte: Njoki *et al.*, (2011)⁵².

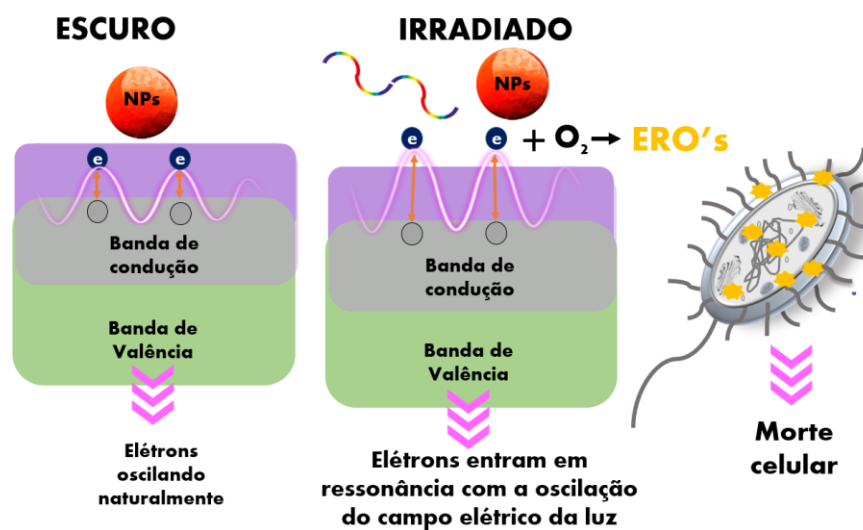
Na Figura 7 é evidente uma diferença na coloração da AuNPs de 90 nm para a de 30 nm, isso se dá pelo fato de que para as NPs metálicas, as características ópticas são dependentes do tamanho delas⁵². Além disso, por conta de suas dimensões reduzidas as NPs possuem maior capacidade de penetração e mobilidade através dos tecidos biológicos⁵³.

Assim, para aumentar a eficiência da ação antimicrobiana da NPs metálicas, pensou-se em utilizá-las como FS em IFD. Nesse contexto, alguns autores como Miao *et al.*, (2018)⁵⁴ e Caires *et al.*, (2020)⁵⁵ entendem que embora o fenômeno de Ressonância de Plasma Localizada (RPL) não seja o único efeito da interação da luz com as NPs metálicas, ele é determinante no efeito fotoantimicrobiano das mesmas.

A RLP acontece quando a radiação eletromagnética interage com as NPs metálicas que possuem uma constante dielétrica real⁵⁶. Como essas nanoestruturas possuem elétrons livres confinados que oscilam com uma frequência natural, no caso da incidência de radiação eletromagnética com frequência igual a frequência natural de oscilação desses elétrons, ocorre o efeito de ressonância entre a oscilação dos elétrons e a oscilação do campo elétrico da radiação incidente^{56,57}.

Enquanto a RLP está acontecendo a amplitude de oscilação dos elétrons pode gerar a transferência desses elétrons para moléculas adjacentes, o que libera energia na forma de fótons e/ou calor⁵⁸. Os elétrons podem ser transferidos para o oxigênio molecular gerando EROs⁵⁵ conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Mecanismo de ação da RLP no processo de IFD de bactéria.



Além disso, a RPL também pode liberar energia através da liberação de calor podendo também gerar um efeito fototérmico que é capaz de destruir as bactérias. Desse modo, as NPs metálicas têm a capacidade de inativar por via fotodinâmica, com um auxílio de irradiação luminosa de comprimento de onda adequado para gerar a RPL⁵⁵. A associação de NPs metálicas e FS moleculares não somente aumenta a capacidade de internalização das moléculas, mas também a chance de ocorrer mais de um mecanismo de IFD – a RPL⁵⁴.

Foi observado a IFD de várias cepas utilizando as NPs metálicas, dentre elas podemos citar o caso de que as NPs de platina (PtNPs), em formato hexagonal e cúbica, inibiram o crescimento microbiano da *S. aureus* sob a irradiação de luz visível⁴⁷. Outro exemplo de inativação de bactérias induzida por RLP são algumas AuNPs sozinhas, as quais quando irradiadas na região os 550 nm geram calor suficiente para destruir as bactérias. Estas também podem ser associadas com FS moleculares para aumentar tanto a internalização do FS, quanto contribuir na geração de EROs⁵⁹.

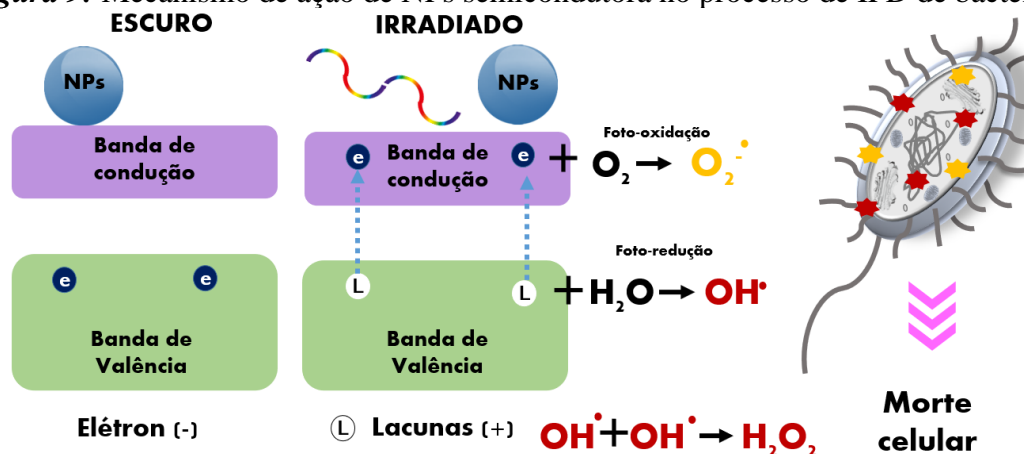
Ademais, AgNPs em formato de prisma também tiveram sucesso na inativação da *S. aureus* obtida de infecções de mastite bovina quando irradiadas com luz LED em 660 nm⁶⁰. Desse modo, a nanotecnologia envolvendo NPs metálicas podem contribuir para a solução e combate à os MRA tanto sozinhas, quanto associadas a outros FS moleculares. Por outro lado, as NPs condutoras não são as únicas que podem ser usadas como FS, há também as NPs semicondutoras que podem ser usadas como FS em IFD.

1.3.4 Mecanismos de Ação de Nanopartículas Semicondutoras

Além de um incremento na permeabilidade de membranas, a classe de NPs que apresentam algumas outras características interessantes para a IFD são as semicondutoras, as quais possuem mais de um mecanismo de ação fotodinâmico⁶¹. Vale lembrar que semicondutor é um material, no qual, a estrutura das bandas de condução de valência são separadas por um gap de energia⁶². Eles são definidos como substâncias cuja resistividade elétrica cobre uma ampla faixa, entre a dos metais e isolantes. Além disso, a resistividade elétrica diminui com o aumento da temperatura⁶³

Uma das maneiras de explicar o fenômeno de geração de espécies radicalares induzidas pela luz em de algumas NPs imersas em meio biológico é o fenômeno de foto-redução e foto-oxidação, conforme demonstrado Figura 9.

Figura 9: Mecanismo de ação de NPs semicondutora no processo de IFD de bactérias.



Fonte: Autora

Nesse modelo, a luz composta de fótons com energia igual ou superior a diferença de energia entre a banda de condução e a de valência do semicondutor, excita os elétrons livres da banda de valência para banda de condução, criando pares de elétrons com carga negativa e lacunas de elétrons carregado positivamente na banda de valência^{61,64}.

Dessa forma, os elétrons livres que estão na banda de condução podem interagir com o oxigênio molecular e gerar espécies reativas de oxigênio. Paralelamente a isso, as lacunas de elétrons carregados positivamente podem ser preenchidas por uma das moléculas adjacentes. Dentre as moléculas que podemos que podem preencher essa lacuna podemos citar a água^{61,65}.

Assim, os elétrons e lacunas gerados pelas reações têm forte poder redutor e oxidante, respectivamente. Elétrons e lacunas podem recombinar e reagir com o meio extracelular gerando radicais como o $O_2^{\bullet -}$ e OH^{\bullet} ^{61,65}. Além disso, o radical hidroxila é um oxidante extremamente agressivo e, como tal, pode atacar várias moléculas biológicas e prejudicar seu funcionamento adequado⁶¹.

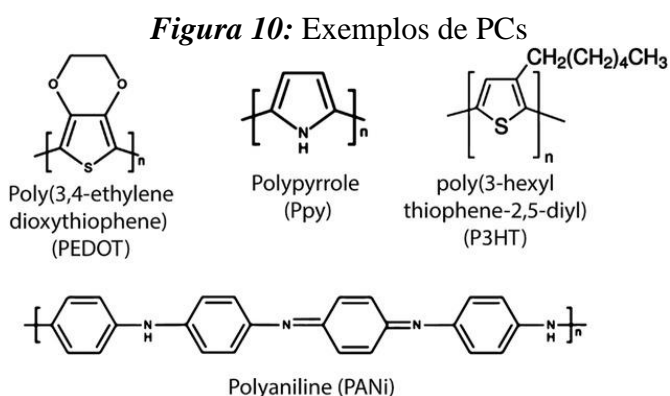
Alguns exemplos de semicondutores com potencial para o uso em IFD são NPs de nitreto de carbono grafítico (g- C_3N_4), que apresentam uma *gap* de 2,4 eV possibilitando o uso de luz visível para a geração de espécies radicalares⁶⁵. Desse modo, o uso do g- C_3N_4 no processo de IFD resultou na inativação total da cepa *E. coli* sob a irradiação de luz em 465 nm durante 60 minutos⁶⁶. Do mesmo modo acontece com as NPs de TiO_2 dopadas com cobre, as quais são usadas na foto-redução e foto-oxidação utilizando a luz visível⁶⁷.

Ademais, as NPs de polímeros conjugados são outra classe de NPs semicondutoras que vem sendo utilizadas como FS em IFD e têm apresentado bons resultados por

proporcionarem a indução simultânea de dois efeitos sob iluminação - a geração de EROs (efeito fotodinâmico) e a geração de calor (efeito fototérmico). Ambos efeitos, isolados ou de forma sinérgica, podem ser aplicados para fotoinativar bactérias⁶⁸.

1.4 Polímeros conjugados

Os polímeros conjugados (PCs) possuem monômeros com ligações alternadas simples (σ) e duplas (π) conforme exemplificado na Figura 10, por conta desses sistemas π -conjugados eles possuem propriedades ópticas e elétricas que conferem a eles um alto potencial de aplicação em diversos setores da indústria⁶⁹⁻⁷¹.



Fonte: Liu *et al.* (2021)⁷².

Os PCs são semicondutores, ou seja, possuem uma estrutura de banda na qual as bandas de condução e de valência são separadas por um *bandgap* de energia. Em alguns casos, o *bandgap* é proporcional a energia associada a algum comprimento de onda da luz visível. Quando isso ocorre o material pode absorver e emitir fótons na região do visível através das excitações e desexcitação dos elétrons, respectivamente⁷⁰.

Uma das utilidades dos PCs são seu uso em células solares orgânicas, como o desenvolvimento de dispositivos flexíveis para o armazenamento de energia⁷³. Outra aplicação é na remoção de poluentes através do método de fotocatalise⁷⁴. Além disso, eles também são usados como diodos orgânicos emissores de luz e transistores eletroquímicos orgânicos⁷⁵.

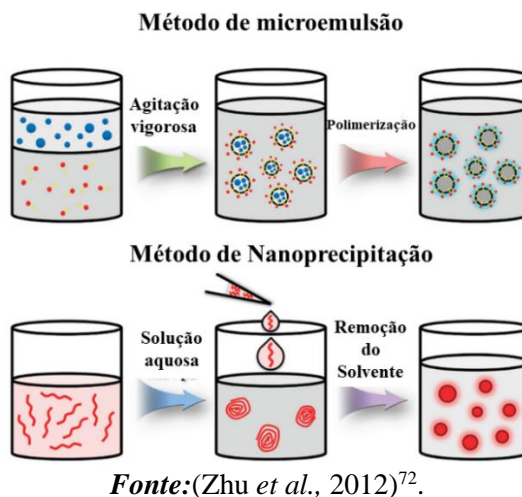
As aplicações biológicas dos PCs são mais facilmente executadas nos casos dos PCs solúveis em água, que geralmente apresentam cadeias laterais carregadas, como grupos catiônicos de amônio quaternário, grupos carboxila aniônicos, grupos sulfônicos e grupos fosfato. Esses PCs são aplicados em diversas áreas da biologia e da saúde, por exemplo no caso de diagnóstico e fluorescência de imagem, monitoramento de liberação e entrega de drogas, terapia antimicrobiana e anticâncer⁷³.

Outra forma de explorar a utilização dos PCs nas aplicações em ciências da vida é a produção de nanopartículas de PCs (PC-NPs) que podem ser dispersas em água⁷². Neste contexto, é importante ressaltar que mesmo a partir de matrizes poliméricas de PCs não solúveis em água, é possível obter PC-NPs em solução aquosa.^{76,77}

1.4.1 Nanopartículas de PCs (PC-NPs)

Tendo como objetivo contornar esse problema da solubilidade dos PCs, diversos pesquisadores têm efetuado desenvolvido PC-NPs^{68,77-80}. Há diferentes métodos que podem ser utilizados para sintetizar as PC-NPs, dentre eles podemos citar a polimerização de microemulsão e a nanoprecipitação⁷⁰ que estão representados na Figura 11.

Figura 11: Método de Sínteses de PC-NPs, sendo que em azul são as soluções aquosas e em vermelho são as soluções orgânicas.



No método de polimerização por microemulsão, o PC é inicialmente dissolvido em um solvente orgânico imiscível em água. Logo em seguida, a solução orgânica é combinada com uma solução aquosa contendo surfactantes. As NPs e a homogeneização é subsequentemente alcançada pela aplicação de forças de cisalhamento, por agitação vigorosa até a evaporação do solvente orgânico^{70,72,81,82}. Essa rota de síntese geralmente confere NPs com morfologias esféricas e elipsoidais, com diâmetros que variam de 20 a 500 nm⁷⁰.

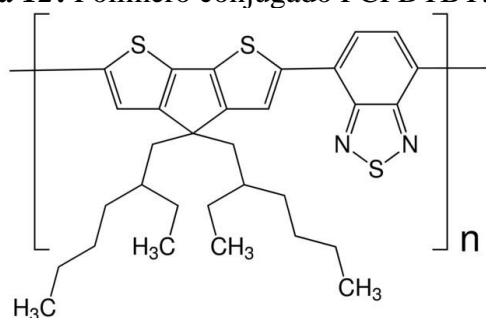
A síntese utilizando o método de nanoprecipitação utiliza-se de uma matriz que, geralmente, é uma molécula anfifílica ou co-polímero. Nessa técnica há o preparo de duas soluções, sendo uma delas contendo a molécula anfifílica e água e a outra dos PCs e do solvente orgânico^{70,81,82}. A solução contendo o PCs é adicionada, muitas vezes através de gotejamento, enquanto a solução aquosa é agitada vigorosamente. Essa técnica costuma

oferecer PC-NPs com morfologia esférica e um rendimento de formação de nanopartículas acima de 50%⁷⁰.

Dentre os trabalhos envolvendo o uso de PCs na conformação de NPs, podemos citar Zhang *et al.*, (2020)⁶⁸ que sintetizou e avaliou PC-NPs que foram denominadas DMCNPs. As DMCNPs foram sintetizadas a partir dos polímeros dicetopirrolpirrol-tienotiofeno) (PDPPTT) e o fotossensibilizador poli[2-metoxi-5-((2-etilhexil)oxi)-p-fenilenevinileno] (MEH-PPV) na presença de poli(estireno-co-anidrido maleico). Como resultado dessa síntese, os autores obtiveram NPs que geram EROs através dos mecanismos supramencionados, mas que também liberam calor durante o processo de irradiação. Sendo assim, essas DMCNPs foram capazes de inativar totalmente cepas de *E. coli* resistente a ampicilina através de tanto da irradiação (IFD) visível com luz branca (65 mW.cm^{-2}), quanto na irradiação na região dos 808 nm (550 mW.cm^{-2}), o que caracteriza inativação fototérmica (IFT).

Pode-se também citar como exemplo o poly[2,6-(4,4-bis-(2-ethylhexyl)-4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']-dithiophene)-alt-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (PCPDTBT) (Figura 12), que é um PC promissor com ampla janela de absorção de luz na região do visível. Contudo, como já mencionado, ele tem o limitante de ser um polímero não solúvel em água. Por conta disso pesquisadores têm desenvolvido nanopartículas desse PC para usufruir de seu potencial em aplicações biológicas⁷⁷.

Figura 12: Polímero conjugado PCPDTBT.



Fonte: Sigma-Aldrich

Nanopartículas de PCPDTBT (PCPDTBT-NPs) foram sintetizadas utilizando como matrizes o 1,2-dioctanoyl- sn-glicero-3-fosfocholine (DOPC) e 1,2-dioctanoyl-sn-glicero-3-fosfoethanolamine (DOPE)⁸³. Essas PCPDTBT-NPs não só demonstraram atividade fototérmica em células HeLa, mas também potencial para ser utilizadas como agente fluorescente para o monitoramento das células através da imagem de fluorescência. Nesse caso, como as PCPDTBT-NPs foram utilizadas no tratamento e no monitoramento dessas células podemos definir essas NPs como sendo um material teranóstico⁸³.

Outras PCPDTBT-NPs relevantes foram as sintetizadas por Abelha *et al.* (2019)⁷⁷, as quais possuíam como matriz o co-polímero poly(etilen glycol) methyl ether-block-poly(lactide-co-glycolide) (PEG-PLGA), e tinham como característica dimensões inferiores a 100 nm. Essas NPs foram testadas como agente fluorescente para avaliação nos comprimentos de onda do infravermelho próximo em sistema animal. Além disso, também foi avaliada quanto a citotoxicidade e a sua hemocompatibilidade, que é um estudo de análise da compatibilidade dos materiais com o sangue animal. As PCPDTBT-NPs tiveram sucesso na obtenção das imagens e apresentaram baixa citotoxicidade, além de serem consideradas hemocompatíveis.

As PCPDTBT-NPs também foram estudadas recentemente quanto a sua capacidade de regeneração celular das células *Hydra vulgaris*, assim como sua capacidade de alterar a dinâmica de proliferação de queranócitos. Ademais, foi verificado se as NPs induzem alterações no equilíbrio redox intracelular *in vivo*. Nesse estudo, demonstrou-se que as PCPDTBT-NPs possuem uma capacidade regenerativa no sistema sem irradiação e sob irradiação de luz branca com densidade de energia de 0.124 mW mm⁻² durante 24h. Por outro lado, foi constatado o estresse oxidativos nas células, além de uma redução da migração dos queranócitos quando submetidos a irradiação⁸⁴.

Desse modo, a ampla absorção de luz, a capacidade fototérmica de tratamento das células HeLa, a hemocompatibilidade, a capacidade de favorecer a regeneração celular, e, por fim, os indicativos de estresse oxidativo sugerem que as PCPDTBT-NPs têm alto potencial agregado de ser avaliado como um FS no processo de IFD. Assim, esse trabalho objetivou sintetizar, caracterizar e aplicar de maneira inovadora as PCPDTBT-NPs no processo de IFD sob irradiação da luz na região do visível.

2. Objetivos gerais

Desenvolver nanopartículas do polímero conjugado PCPDTBT com potencial aplicação como fotoinativador de bactérias quando submetido a irradiação na região do visível.

2.1 Objetivos Específicos

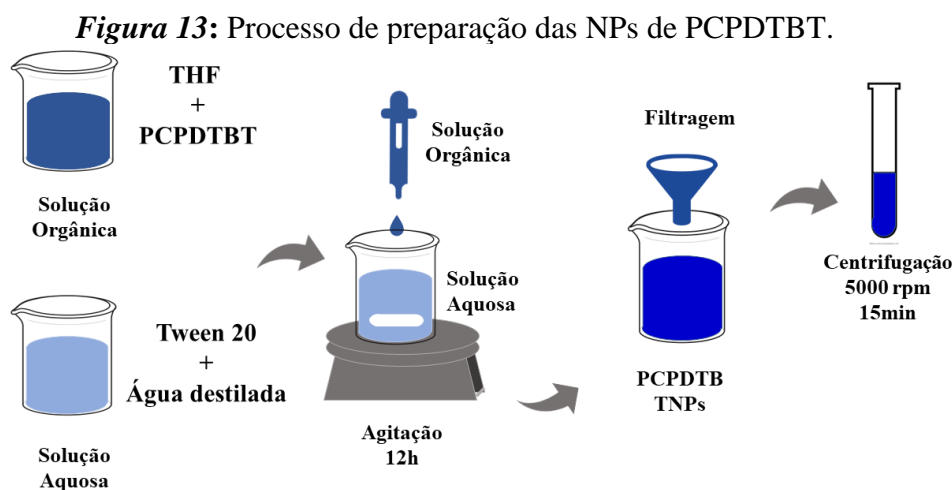
- ❖ Sintetizar PCPDTBT-NPs por meio do método de nanoprecipitação;
- ❖ Caracterizar as propriedades ópticas das PCPDTBT-NPs por espectroscopia de absorção UV-visível e fluorescência;

- ❖ Determinar o diâmetro hidrodinâmico das PCPDTBT-NPs utilizando espectroscopia EDL (Espalhamento Dinâmico da Luz), assim como avaliar a estabilidade das PCPDTBT-NPs através da medida de Potencial Zeta;
- ❖ Determinar a capacidade das PCPDTBT-NPs em atuar como agente fotoinativadores de bactérias, via efeitos fotodinâmicos e/ou fototérmicos, quando irradiados pela luz azul (450 nm), verde (525 nm), vermelho (625 nm) e branca (RGB);
- ❖ Avaliar o potencial fotodinâmico das PCPDTBT-NPs a partir da determinação da produção de EROs por meio da sonda fluorescente DCFHDA e espectroscopia de fluorescência;
- ❖ Avaliar o potencial fototérmicos das PCPDTBT-NPs quando irradiadas com os comprimentos de onda específicos 450, 525 e 625 nm e também com a luz branca.

3. Metodologia

3.1 Preparo das nanopartículas

A síntese das PCPDTBT-NPs foi realizada através do método de nanoprecipitação⁷⁷. Essa técnica consiste no preparo de duas soluções, sendo uma delas orgânica e a outra uma solução aquosa, em seguida precipita-se a solução orgânica na solução aquosa sob agitação vigorosa, conforme representado na Figura 13.



Fonte: Autora.

Nesse sentido, a solução orgânica estoque foi preparada diluindo 5 mg de PCPDTBT (Sigma-Aldrich) em 2 mL de Tetraidrofurano (THF, IMPEX), resultando em uma concentração de 2,5 mg.mL⁻¹. Essa solução estoque, posteriormente, foi diluída até alcançar a concentração de 45 µg.mL⁻¹ e um volume final de 10 mL.

Já a solução aquosa foi preparada a partir de um solução estoque de 10 mg.mL^{-1} de Polisorbato 20 (*Tween 20*, Quimesp Química). Desta solução foi retirado 1,2 mL o qual, em seguida, foi adicionado a 8,8 mL de água destilada. A solução final, contendo $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Tween 20, foi deixada em agitação de 100 rpm em um agitador magnético por 10 minutos. Em sequência, gotejou-se 2 mL da solução orgânica contendo o PCPDTBT nos 10 mL da solução aquosa contendo $1,2 \text{ mg. mL}^{-1}$ de *Tween 20*. Portanto, a relação fase orgânica e fase aquosa foi de 2 para 10 mL.

Após todo o gotejamento, o recipiente contendo a solução foi protegido da luz e reduziu-se a velocidade de agitação magnética para 60 rpm. Passado 12 horas em agitação, o solvente orgânico foi totalmente evaporado, tendo em vista que o perfil espectral de absorção de luz PCPDTBT em THF é diferente do que em água destilada⁸⁵. Sendo assim, a solução final continha PCPDTBT, água destilada e *Tween 20*. A solução foi, sequencialmente, retirada da agitação, filtrada e levada para a centrifugação na velocidade de 5000 rpm em uma centrífuga (FirstLab, FL90815A), essa solução final foi nomeada de formulação de trabalho. Ademais, também foi realizada uma síntese controle, na qual a água é a solução aquosa, apenas para os fins de caracterizações, essa formulação foi nomeada formulação controle (contendo água e PCPDTBT).

3.2 Caracterizações de Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ).

As soluções de PCPDTBT-NPs foram diluídas tomando como referência as suas concentrações de *Tween 20* em solução salina. Portanto, a concentração de *Tween 20* foi de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e de NaCl foi 9,15 mM para as PCPDTBT-NPs. Para a formulação controle a concentração de NaCl foi de 7,5 mM. E por fim, realizou-se as medidas de Potencial Zeta e de EDL (Malvern Zetasizers) utilizando uma cubeta de eletroforese (DTS1070). Vale ressaltar que o método de aproximação selecionado foi o Smoluchowski com base na dimensão das PCPDTBT-NPs⁸⁶.

3.4 Caracterizações ópticas.

Inicialmente, todas as formulações foram diluídas para a menor concentração obtida entre as formulações, no caso de $15 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na sequência, realizou-se a medida de espectrofotometria de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis) utilizando cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico para cada uma das amostras. Logo após efetuar a medida de absorção, foi aferida a espectroscopia de fluorescência (Scinco FluoroMate FS-2) das amostras com as condições experimentais conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Condições experimentais das análises de fluorescência.

Voltagem (V)	650
Tempo de Integração (ms)	50
Velocidade de digitalização (nm/min)	600
Excitação (nm)	408
Emissão (nm)	450 a 900

Fonte: Autora.

Além disso, também foi realizado a espectrofotometria de Absorção UV-Visível e a espectroscopia de fluorescência nas mesmas condições descritas na Tabela 1 com uma solução de *Tween 20* na concentração de 1,2 mg.mL⁻¹.

3.5 Experimentos biológicos

Os experimentos foram realizados com cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As quais foram mantidas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% e armazenadas em ultra freezer. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de estoque disposto em um microtubo que é mantido no freezer. Para a inoculação das cepas foi adicionado 40 µL do estoque em 4 mL de caldo BHI, em seguida, a solução foi mantida em um agitador orbital com incubadora (Marconi, MA 420) com agitação de 150 rpm e com controle de temperatura em 37 °C, durante 24 h para o crescimento bacteriano.

Após esse período, o inóculo foi diluído em solução PBS-Salina (*Phosphate Buffered Saline*) até a obtenção de turvação de 1,0 da escala de McFarland e foram adicionados 1 mL em microtubos. Na sequência, foi adicionado 1 mL da solução contendo as PCPDTBT-NPs, testadas anteriormente com as concentrações pré-determinadas (i) 0,0 (ii) 13,2 e (iii) 26,4 µg.mL⁻¹. Por conta disso, as concentrações finais foram de (i) 0,0; (ii) 6,6 e (iii) 13,2 µg.mL⁻¹. Assim, temos uma solução contendo as PCPDTBT-NPs em cada uma das concentrações já mencionadas, e as bactérias na concentração de 1,5.10⁸ UFC. mL⁻¹ (i.e., 0,5 na escala de McFarland).

Após as bactérias *S. aureus* e *E. coli* serem expostas aos tratamentos (i) 0,0; (ii) 6,6 e (iii) 13,2 µg.mL⁻¹ de PCPDTBT-NPs, elas foram protegidas da luz e destinadas a estufa em temperatura de 37 °C por um período de 1 h para o processo de internalização das PCPDTNT-NPs. Na sequência, 200 µL de cada amostra foram retirados e dispostos em duas microplacas de 96 poços separadamente como dois grupos - (i) irradiado e (ii) controle não irradiado.

Os grupos irradiados foram expostos em diferentes condições de irradiação em experimentos distintos, sendo o primeiro ensaio realizado com a luz branca (vermelho, azul e

verde, 27 mW. cm⁻²), o segundo contendo apenas a luz vermelha (625 nm, 9 mW. cm⁻²), o terceiro exclusivamente com a luz azul (450 nm, 9 mW. cm⁻²) e o quarto somente com luz verde (525 nm, 9 mW. cm⁻²), todas as luzes foram emitidas pelo mesmo painel de LED durante o período de 90 min.

A seguir, foram realizadas diluições seriadas para ambos os grupos, irradiado e não-irradiado (escuro), a diluição de 1:32 foi selecionada para plaqueamento. Desse modo, foram retirados separadamente 1 µL de cada poço da diluição 1:32, os quais foram semeados e espalhados em placas contendo meio PCA (*Plate Count Agar*). Estas placas foram dispostas em estufa com controle de temperatura de 37 °C durante 24 h.

Por fim, o crescimento bacteriano foi avaliado e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Logo, avaliou-se a sobrevivência ou morte das bactérias frente ao efeito fotodinâmico das PCPDTBT-NPs. Todas as análises ocorreram em duplicata, e o experimento foi repetido em outras ocasiões. Através do Teste T-Student, por meio do software Origin 9, realizou-se as análises estatísticas de variância dos resultados.

3.6 Avaliação da Geração de EROs

Os experimentos de determinação de EROs foram realizados com base em adaptações do procedimento realizado por Caires *et. al* (2020). Utilizou-se a sonda química DCFHDA (Dichlorofluoresceína), adquirida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), como marcador óptico para investigar o potencial das PCPDTBT-NPs em produzir EROs através de (i) processos fotoquímicos gerados pela irradiação e (ii) químicos que não dependem diretamente da irradiação.

Inicialmente, uma solução estoque de DCFHDA foi preparada em etanol absoluto (5 mM). Em seguida, preparou-se uma solução de tal forma a ter a concentração de 0,34 mM de DCFHDA e 9,4 µg.mL⁻¹ das PCPDTBT-NPs. Em seguida, 2 mL dessa solução contendo tanto o DCFHDA (0,34mM) quanto as PCPDTBT-NPs (9,4 µg.mL⁻¹) foi adicionado a uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Por conseguinte, foi avaliada a fluorescência com as condições relatadas na Tabela 2. As medições foram realizadas inicialmente no escuro por 12 min com intervalos de 2 min para cada medição. Passados os 12 min, iniciou-se o processo de irradiação que durou 10 minutos, nos quais a fluorescência foi aferida a cada 2 min.

Tabela 2: Parâmetros de Fluorescência para as medidas de avaliação de geração de EROs.

PMT Voltage (V)	650
PMT Integration Time (ms)	20
Velocidade de digitalização (nm/min)	600
Excitação (nm)	470
Emissão (nm)	500 a 600

Fonte: Autora.

É importante ressaltar que os procedimentos supramencionados foram realizados para 4 diferentes condições de irradiação separadamente. Além disso, as condições de irradiação foram os comprimentos de onda individuais de 450, 525 e 625 nm oriundos de um painel de LED com uma intensidade de 20 mW.cm⁻². Por outro lado, a quarta condição de iluminação foi a luz branca (vermelho, verde e vermelho) com uma intensidade de 60 mW.cm⁻².

As constantes de taxa de produção de EROs foram estimadas através da análise cinética dos produtos fluorescentes gerados pela interação entre DCFHDA e EROs, conforme relatado na Equação 1.



Onde: F são os produtos fluorescentes de produção de EROs, k é constante de formação desses produtos fluorescentes.

A taxa de produção EROs pode ser expressa como demonstrado na Equação 2:

$$-\frac{d[EROs]}{dt} = k_{EROs} [DCFHDA] [EROs] \quad (2)$$

Onde: k_{EROs} é a constante de taxa aparente de produção de EROs, sendo a constante de taxa aparente da reação entre DCFHDA com EROs, então a [EROs] ∝ F.

A equação de produção de EROs pode ser reescrita (Equação 3) com a (Equação 4).

$$-\frac{dF}{dt} = k_f F \quad (3)$$

$$k_f = k_{EROs}[DCFHDA] \quad (4)$$

Portanto, o rendimento formação de EROs pode ser obtido pela Equação 5.

$$F = a(1 - e^{-k_f t}) \quad (5)$$

3.8 Avaliação dos efeitos fototérmicos

Para avaliação da variação da temperatura produzida pelas PCPDBTNPs induzidas pela irradiação, preparou-se uma solução de $10 \mu\text{g.mL}^{-2}$ das PCPDTBT-NPs. Em seguida, foram adicionados $300 \mu\text{L}$ em 4 poços de uma microplaca de 96 poços e em outros 4 poços foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de água destilada. As placas foram destinadas para diferentes condições de irradiação tais como os comprimentos de onda individuais de 450, 525 e 625 nm oriundos de um painel de LED e com uma intensidade de 9 mW.cm^{-2} . Além disso, a quarta condição de iluminação foi a luz branca (vermelho, verde e azul) com intensidade de 27 mW.cm^{-2} .

Durante a irradiação, as imagens térmicas foram obtidas em intervalos de 10 min utilizando uma câmera térmica (FLIR C5). É importante ressaltar que o tempo de irradiação total para as diferentes condições de iluminação foi de 50 minutos. Especificamente para a luz branca foi realizado um segundo experimento com 80 minutos de irradiação com a intensidade de 27 mW.cm^{-2} tanto para com as PCPDTBT-NPs quanto com o controle em água destilada.

4. Resultados e discussões

4.1 Resultados EDL e Potencial Zeta.

O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de $140,6 \pm 15,82$ e o Potencial Zeta através de uma distribuição com o valor médio de $2,03 \pm 3,98$ mV foram obtidos para as PCPDTBT-NPs. Na Tabela 3 estão dispostos os resultados referentes ao DHM, os valores de Potencial Zeta (ζ) e o índice de polidispersividade (IP) utilizados tanto para a formulação principal quanto para a formulação controle, assim como alguns exemplo contidos na literatura^{83, 86-90}.

Tabela 3: Resultados DHM, Potencial Zeta (ζ) e Polidispersividade.

Método de Síntese	Matriz	Proporção $F_o:F_a$	DHM (nm)	Potencial Zeta (mV)	IP	Fonte
M.E	Sem Matriz	1:4	75 ± 6	$-29,8 \pm 1,6$	N.R	Rohatgi <i>et al.</i> (2018) ⁸⁷
Nano-P	PEG-PLGA	1:5	$120 \pm 1,4$	$-6,95 \pm 0,55$	$0,14 \pm 0,01$	Neuman <i>n et al.</i> (2019) ⁸⁸

M.E	DOPC	1:5	N.R*	-22	N.R	Yoon <i>et al.</i> , (2014) ⁸³
Nano-P	PEG _{5k} -PLGA 55k	1:5	142	-7	0,13	Abelha <i>et al.</i> , (2022) ⁸⁹
Nano-P	PEG _{2k} -PLGA 15k	1:5	131	-12	0,17	Abelha <i>et al.</i> , (2022) ⁸⁹
Nano-P	O-pentaceno	1:9	<100	N.R	N.R	Wang <i>et al.</i> , (2020) ⁹⁰
N.R	HS-PEC + Leticilina de Soja + Triglicerídios	N.R	~32	-3.13 ± 0.33	N.R	Modicano <i>et al.</i> , (2020) ⁹¹
Nano-P	<i>Tween 20</i>	1:5	140,6± 15,82	2,03±3,98	0,315± 0,013	Presente trabalho
Nano-P	Sem Matriz	1:5	911,3± 41,65	2,91±1,12	0,552±0,0 17	Presente trabalho

Legenda: F_o: Fase Orgânica; F_a: Fase Aquosa; N.R: Não relatado; M. E: Microemulsão; Nano-P: Nanoprecipitação; O-pentaceno: Pentaceno quinoidal incorporado em oxigênio

Fonte: Autora.

Há alguns fatos que devem ser levados em consideração nas comparações e discussões sobre as discrepâncias entre os valores de Potencial Zeta obtidos e os valores apresentados na literatura. O primeiro deles, e o mais importante, é que deve-se ter ciência de que o Potencial Zeta, quando obtido a partir da eletroforese, possui um valor calculado e não medido diretamente^{86,92,93}. O Potencial Zeta é relacionado com a mobilidade eletroforética (velocidade da partícula quando submetida ao campo eletromagnético) demonstrado na Equação 6⁹³.

$$\mu = \frac{U}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa_a)}{3\eta}$$

(6)

Logo, de modo intrínseco ao método de obtenção do valor do Potencial Zeta, temos que ele é dependente da permissividade dielétrica do solvente (ε); da viscosidade (η) e principalmente da função de Henry $F(\kappa_a)$, que pode variar de 1 a 3/2 dependendo do método

aproximativo selecionado, ou de Hückel–Onsager ou de Smoluchowski⁹³. Dentre os autores citados na Tabela 3, apenas Abelha *et al.* (2022)⁸⁹ especifica o método utilizado que é o de Smoluchowski, assim como o presente trabalho.

Outro importante fator a ser levado em consideração, durante as comparações entre os resultados obtidos para o Potencial Zeta e a literatura, é o de preparo das amostras. Variações de pH, temperatura, concentração salina e até mesmo o sal que foi utilizado interferem no valor e no sinal do Potencial Zeta (ζ). Por conta disso, a comparação entre diferentes matrizes ou entre amostras com diferentes preparações, é limitada⁹³.

Nesse sentido, vale ressaltar que para o caso de Neumann *et al.* (2015)⁸⁸, o Potencial Zeta foi obtido com uma amostra de tampão fosfato salino (pH 7,4) e em uma temperatura de 37 °C, ou seja, em condições diferentes das análises efetuadas pelas PCPDTBT-NPs desenvolvidas com o *Tween 20* como matriz. Em pH baixo, como é o caso da PCPDTBT-NPs que foram desenvolvidas no presente trabalho, as hidroxilas de superfície dos grupos podem ser protonadas e carregadas positivamente, o que leva a um Potencial Zeta (ζ) positivo tal como o obtido⁹³.

Um dos principais significados físicos do Potencial Zeta (ζ) é a definição da estabilidade das soluções coloidais de NPs. Desse modo, já é bem estabelecido na literatura que as NPs com valores dentro de intervalo de ± 30 mV são consideradas estáveis⁹². Além disso, para os casos de determinação do Potencial Zeta em circunstâncias específicas, tais quais com parâmetros fixados, o resultado relatado na Tabela 3 são dados qualitativos⁹³.

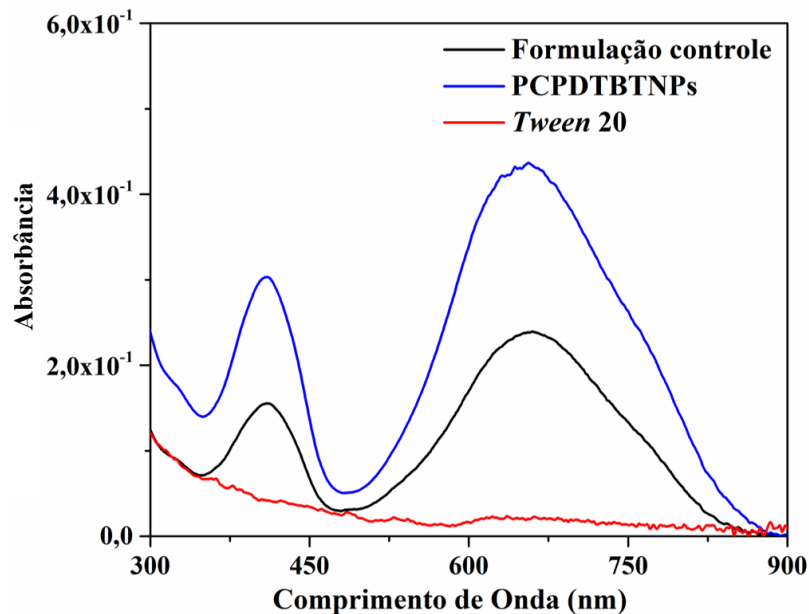
Para os resultados do DHM demonstrado na Tabela 3 nota-se que, apesar de terem matrizes diferentes, os DHM são semelhantes para a PCPDTBT-NPs sintetizadas a partir do método Nano-P. Entretanto, as flutuações entre os resultados podem ser explicadas primeiramente pelo fato de serem matrizes diferentes, mas também pelo fato de terem IP distintas umas das outras, tendo em vista que o DHM depende da IP⁹³.

Desse modo, é notável que por meio do método de nanoprecipitação, utilizando o polímero PCPDTBT-NPs e o *Tween 20* como matriz, obtemos soluções coloidais de PCPDTBT-NPs relativamente estáveis, com DHM na ordem dos 140 nm e que apresentam cargas de superfície positivas. Entretanto, para jugarmos as PCPDTBT-NPs como potenciais FS precisamos compreender o seu perfil óptico.

4.2 Caracterizações ópticas

Na Figura 14 são apresentadas as absorbâncias das amostras de PCPDTBT-NPs, da formulação controle e do *Tween 20*. Nessa figura é possível visualizar duas bandas principais, um com máximo em torno de 425 nm e outro com o máximo entorno de 660 nm.

Figura 14: Espectros de absorção UV-vís da PCPDTBT-NPs e formulação controle na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Tween 20* na concentração 1.2 mg.mL^{-1} , todos em água destilada.



Fonte: Autora.

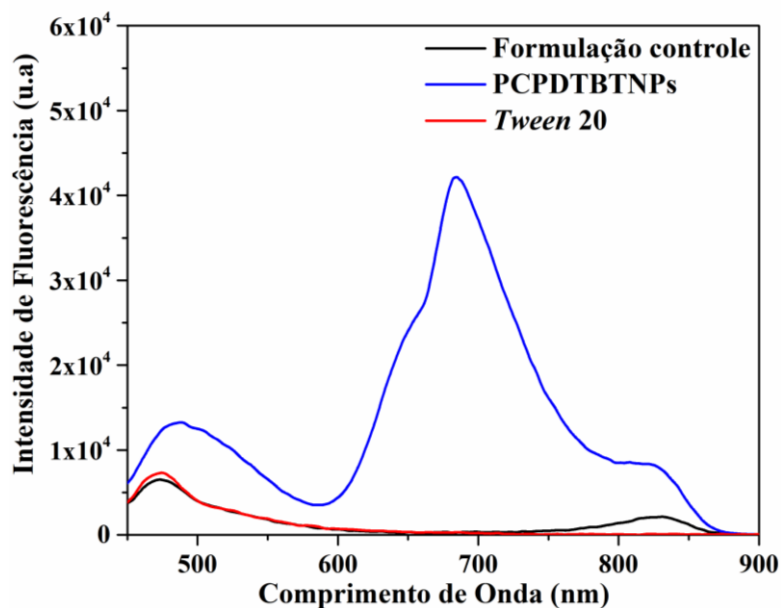
Como pode ser visualizado na Figura 14 as PCPDTBT-NPs possuem ampla absorção na região do espectro visível. Com base na comparação entre a formulação que contém (PCPDTBT-NPs) e não contém (Formulação controle) o *Tween 20* é evidente que o perfil espectral é do PCPDTBT.

As PCPDTBT-NPs desenvolvidas por Rohatgi *et al.* (2018)⁸⁷ apresentaram o segundo pico de absorção na região dos 700 nm e primeira banda na região dos 400 nm. Nesse caso, como já descrito na Tabela 3 as NPs possuem DHM em torno de 70 nm, não possuem matriz específica e foram sintetizadas através do método de microemulsão.

Em contrapartida, para as PCPDTBT-NPs desenvolvidas por Wang *et al.*, (2020)⁹⁰, que possuem uma matriz de O-pentaceno, o perfil espectral de absorção UV-visível é muito semelhante ao perfil apresentado pelas PCPDTBT-NPs desenvolvidas no presente estudo, contendo dois máximos principais, sendo um na região dos 425 nm e outro entre 600 e 700 nm.

Para os espectros de fluorescência, demonstrados na Figura 15, nota-se uma clara mudança no perfil espectral com um surgimento de duas bandas na região entre 600 e 800 nm nas amostras de PCPDTBT-NPs em comparação com a formulação controle.

Figura 15: Espectros de fluorescência da PCPDTBT-NPs e formulação controle na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Tween 20* na concentração 1.2 mg.mL^{-1} , todos em água destilada.



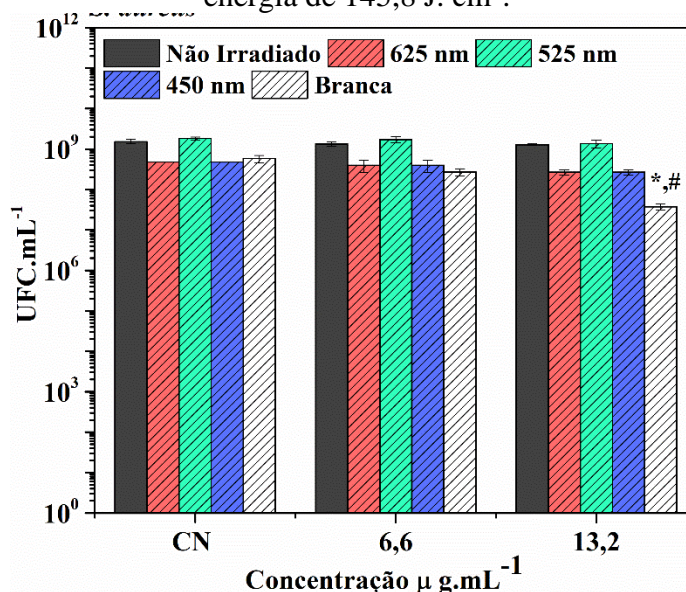
Fonte: Autora.

É perceptível que a mudança no perfil espectral não ocorre simplesmente pela presença do *Tween 20*, mas sim pela formação das PCPDTBT-NPs. Podemos afirmar isso, pois a região em que há o surgimento de duas bandas é entre 600 e 750 nm e nessa região, para as condições estudadas, o *Tween 20* sozinho não apresenta fluorescência, conforme demonstrado na Figura 15. O surgimento dessas bandas indica o confinamento do polímero dentro das NPs, dos quais a nova estrutura cristalina permite transições intercadeia e intracadeia⁹⁴.

4.3 Resultados dos Ensaios Biológicos

A investigação dos efeitos químicos e fotoquímicos das PCPDTBT-NPs sob a irradiação dos comprimentos de ondas individuais 450, 525 e 625 nm e da luz branca contra a bactéria *S. aureus* estão condensados na Figura 16.

Figura 16: Experimento biológicos realizados com a *S. aureus*. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 48,6 J. cm² e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 145,8 J. cm².



Legenda: *: apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T- Student em relação a amostra escuro respectiva ao mesmo tratamento; #: Apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T- Student em comparativo com o CN (Controle Negativo) escuro.

Fonte: Autora.

As PCPDTBT-NPs desenvolvidas no presente trabalho não apresentaram efeito químico, visto que não há diferença significativa, entre os grupos que não foram expostos as condições de irradiação realizadas e o CN, de acordo com o teste T-Student ($p < 0,05$). Quanto ao efeito fotodinâmico frente a bactéria *S. aureus*, *i.e.*, nota-se que não ocorreu uma redução das UFCs para o grupo irradiado com luz em 525 nm. Em contrapartida, para os grupos irradiados com luz em 625 e 450 nm apresentam uma redução sem a diferença significativa pelo teste T-student ($p < 0,05$).

A concentração de 6 μg.mL⁻¹ uma redução próxima a 1log₁₀ para a irradiação com luz branca 145,8 J.cm². Para os comprimentos de onda individuais, ressalta-se que a luz verde (525 nm, 48,6 J.cm²) não induziu a redução logarítmica. Nas irradiações com a luz vermelha (625 nm, 48,6 J.cm²) e luz azul (450 nm, 48,6 J.cm²) ocorreram a redução de aproximadamente 0,8log₁₀.

Por outro lado, para a concentração de 13,2 μg.mL⁻¹ teve uma redução próxima a 1,7log₁₀ quando irradiada com luz branca (145,8 J.cm²). Para os comprimentos de onda individuais temos que a luz verde (525 nm, 48,6 J.cm²), na qual, não ocorreu uma redução logarítmica. Ambos os comprimentos de onda individuais da luz azul (450 nm, 48,6 J.cm²) e luz vermelha (625 nm, 48,6 J.cm²) tiveram uma redução de aproximadamente 0,8~0,9log₁₀.

Dessa forma, para a *S. aureus* não ocorreu um efeito sinérgico entre os comprimentos de onda individuais.

Todavia, é importante ressaltar que ocorreu uma redução das UFCs para as amostras irradiadas com luz branca em relação ao CN, tendo até mesmo apresentado diferença significativa pelo teste T-student ($p < 0,05$). Entretanto, embora ocorra a inativação fotodinâmica das cepas de *S. aureus*, foi observado uma redução de ~ 99 % (redução de ~ 1,7 \log_{10}). Conseqüentemente, o efeito fotodinâmico não pode ser considerado um fotobactericida, uma vez que para isso deveria ter promovido uma redução superior a 3 \log_{10} (*i.e.*, 99,9 %) ⁹⁵.

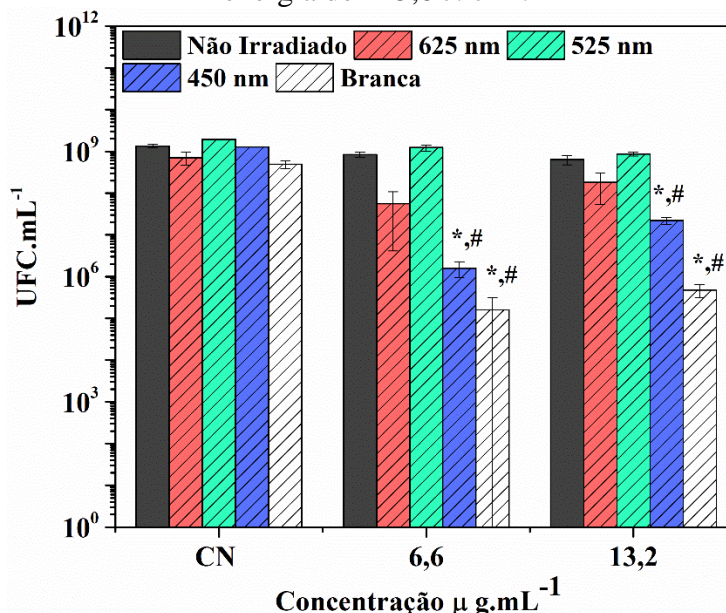
No trabalho de Lee *et al.*, (2019) ⁹⁶ foram desenvolvidas CPs de PCPDTBT através do método de emulsão - com matriz baseada em ácido octanóico - sendo que, a solução coloidal das PCPDTBT-NPs, com diâmetro médio de $185,6 \pm 16,7$ nm, também continha 18% (v/v) de DMSO. Após a síntese, as CPs foram aplicadas nas placas de Petri contendo meio de cultura e posteriormente, as *S. aureus* foram incubadas nas placas. Nesse modelo, as PCPDTBT-NPs contendo os 18% (v/v) de DMSO tiveram reduções de 2.3 \log_{10} , *i.e.*, uma redução de 99,5% em relação ao grupo controle. Esse efeito químico pode ser explicado pelo uso de 18% (v/v) de DMSO, que é comumente utilizado para facilitar a entrada dos agentes nas membranas biológicas em concentrações inferiores a 18%. É importante ressaltar que o DMSO sozinho é considerado tóxico acima de 10% (v/v) e seu uso é, geralmente, realizado com concentrações abaixo de 2% (v/v) ⁹⁷.

Em outro momento, Lee *et al.*, (2018) ⁹⁸ avaliou o efeito das PCPDTBT-NPs desenvolvidas com ácido octanóico e também N-dimetilformamida (DMF) como o solvente polar frente a *S. aureus* e a *E. coli*. Nesse trabalho, as NPs também foram secadas a fim de produzir um filme com uma concentração 1% (m/m) de PCPDTBT. Para a *S. aureus* também não ocorreu a inativação acima de 3 \log_{10} , a redução obtida foi de 94,2 % e para *E. coli* foi de 68,9 %. Vale citar que na literatura já foi demonstrado que o DMF apresenta uma ação de redução do crescimento antimicrobiano próximo de 2 \log_{10} para a *S. aureus* e de 4 \log_{10} para *E. coli*, ambos na concentração de 10% (v/v) e após 4 h de exposição ⁹⁹.

Embora Lee *et al* (2018) ⁹⁸ não realizou ensaios de IFD, ele também analisou o efeito da luz na mudança de temperatura dos filmes. Nesse caso, os filmes de PCPDTBT-NPs foram expostos a luz branca oriunda de um painel que simulou a luz solar durante 1h. Após esse período, ocorreu um aumento de temperatura de aproximadamente 25 °C em relação à

temperatura inicial. Os efeitos das PCPDTBT-NPs desenvolvidas nesse trabalho frente a *E. coli* são demonstrados na Figura 17.

Figura 17: Experimento biológicos realizados com a *E. coli*. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 48,6 J. cm² e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 145,8 J. cm².



Legenda: *: apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T- Student em relação a amostra escuro respectiva ao mesmo tratamento do claro; #: Apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T- Student em comparativo com o CN escuro.

Fonte: Autora.

Conforme demonstrado na Figura 17, nota-se que PCPDTBT-NPs não possuem efeitos químicos, *i.e.*, bactericidas para nenhuma das concentrações estudadas. A não ocorrência de um efeito químico expressivo é suportada pelo trabalho, já mencionado, desenvolvido por Lee *et al.*, (2018)⁹⁸ que não apresentou um efeito químico para as PCPDTBT-NPs sintetizadas utilizando ácido octanóico e DMF. Quanto ao efeito fotodinâmico frente a bactéria *E. coli*, *i.e.*, nota-se que não ocorreu uma redução das UFCs para o grupo irradiado com luz em 525 nm. Em contrapartida, para os grupos irradiados com luz em 625 nm apresenta uma redução sem a diferença significativa pelo teste T-student ($p < 0,05$).

Por outro lado, nota-se reduções significativas pelo teste ($p < 0,05$) T-Student em relação ao CN e ao seu respectivo grupo não irradiado para amostras irradiado pelas luzes branca e azul (450 nm). Além disso, o grupo irradiado com luz branca apresentou redução de mais de $3\log_{10}$ em relação ao CN. Logo, as PCPDTBT-NPs possuem efeito fotobactericida quando irradiadas com luz branca frente a *E. coli*.

Do ponto de vista de comparativos entre as concentrações estudadas foi observado que a concentração de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ teve um efeito fotodinâmico um pouco mais pronunciado visto que teve uma redução próxima a $4 \log_{10}$ para a irradiação com luz branca ($145,8 \text{ J.cm}^2$). Para os comprimentos de onda individuais temos a luz verde (525 nm , $48,6 \text{ J.cm}^2$) que não ocorreu redução logarítmica e as irradiações com luz azul e vermelha que tiveram reduções logarítmicas. Nas amostras irradiadas com luz vermelha (625 nm , $48,6 \text{ J.cm}^2$) houveram uma redução de aproximadamente $1 \log_{10}$ e as irradiadas com a luz azul a redução foi próxima e $3 \log_{10}$. Considerando que a luz branca é a soma dos comprimentos de onda individuais podemos concluir que para essa concentração não está ocorrendo o efeito sinérgico.

Por outro lado, para a concentração de $13,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ teve uma redução próxima a $3,5 \log_{10}$ quando irradiada com luz branca $145,8 \text{ J.cm}^2$. Para os comprimentos de onda individuais temos luz verde (525 nm , $48,6 \text{ J.cm}^2$), na qual, não ocorreu uma redução logarítmica. Por outro lado, a luz vermelha (625 nm , $48,6 \text{ J.cm}^2$) induziu uma redução de aproximadamente $1 \log_{10}$. Também podemos citar que a luz azul (450 nm , $48,6 \text{ J.cm}^2$) teve uma redução próxima de $2 \log_{10}$. Nesse caso, ocorreu um efeito sinérgico entre os comprimentos de onda individuais. Por conta desse resultado, não podemos atribuir o melhor resultado da luz branca ao fato dela ter uma dose de energia maior que os demais comprimentos de onda da luz.

Na literatura, as PCPDTBT-NPs são amplamente usadas para imagem de diagnósticos, há alguns exemplos de usos com FS de interesse em terapia fotodinâmica para células cancerígenas¹⁰⁰. No entanto, o uso como FS no processo de IFD de bactérias ainda foi pouco explorado. Dentre os trabalhos que podemos citar temos o desenvolvido por Zhou *et al.* (2022)¹⁰¹ que sintetizou suas NPs intituladas ALPBs pelo método de dupla emulsão usando PLGA-PEG₅₀₀₀ (poli(etilenoglicol) éter metílico-bloco-poli(l-lactídeo-co-glicólido)) como matriz para encapsular o corante TTDC, luminol, BNN6 (N,N'-di-sec-butyl-N,N'-dinitroso-1,4-phenylenediamine) e PCPDTBT.

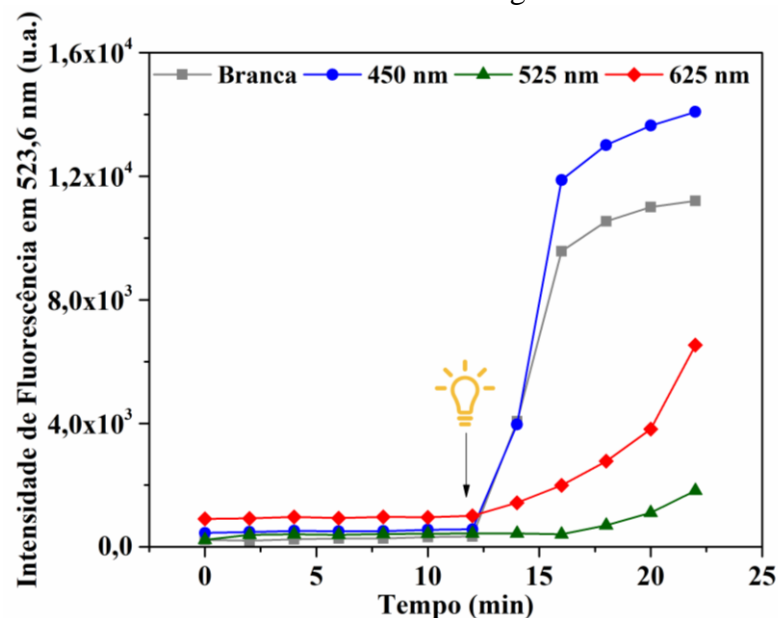
Além disso, Zhou *et al.* (2022)¹⁰¹ sintetizou as ALPs que não continham o BNN6. As duas formulações foram analisadas quanto as suas propriedades bactericidas e fototérmicas com irradiação laser de 808 nm ($1,0 \text{ W.cm}^{-2}$) por 10 min , frente *S. aureus* e a *E. coli*. Para ambas as bactérias não é especificado o valor exato da inativação fototérmica, entretanto com base na representação gráfica de Zhou *et al.* (2022)¹⁰¹ podemos supor que a redução foi maior de 95% e menor de 99% para o grupo irradiado e exposto as ALPBs.

Porém, as APLs sob as mesmas condições de irradiação tiveram uma redução maior de 80% e menor que 90% para ambas as bactérias. Nota-se que as ALPBs possuem apenas 0,66% de PCPDTBT e possuem matriz bem mais complexa do que as PCPDTBT-NPs sintetizadas pelo presente trabalho, além do que a adição de BNN6, nesse caso, foi significativa para o aumento da redução da UFC.mL⁻¹. Por outro lado, mesmo com essa adição e com a terapia fototérmica não foi obtido um resultado fotobactericida¹⁰¹. Nesse sentido, o resultado fotobactericida frente a *E. coli* utilizando as PCPDTBT-NPs com uma matriz simples é um resultado inédito e inovador.

4.4 Resultados Geração de EROs

Podem ocorrer dois tipos de mecanismos de formação de EROs durante a IFD: (i) transferência de elétrons denominado Tipo I ou (ii) transferência de energia denominado Tipo II²⁵. A sonda DCFH-DA pode apenas avaliar o mecanismo de geração Tipo I²⁵, assim os resultados de geração de EROs demonstrados na Figura 18 são uma parcela do efeito fotofísico.

Figura 18: Resultados de geração de EROs para todas as condições de irradiação estudadas. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 108 J. cm² e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 324 J. cm².

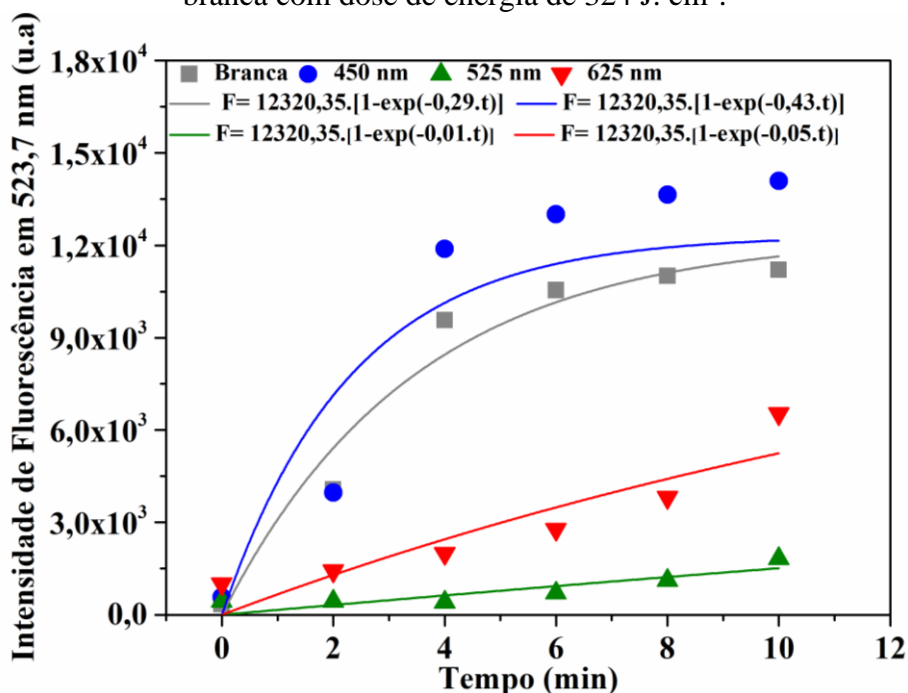


Fonte: Autora.

Quando o DCFH-DA, um composto não fluorescente, está presente em um meio rico em EROs ocorre a conversão da molécula em DCF (2'-7'diclorofluoresceína). Diferentemente do DCFH-DA, o DCF emite fluorescência¹⁰². Nesse sentido, o aumento

intensidade de Fluorescência em 523,6 nm em função do tempo de irradiação conforme relatado na Figura 19 demonstra a geração de EROs.

Figura 19: Aproximações equacionais para as curvas de geração de EROs. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia 108 J. cm² e a irradiação com a luz branca com dose de energia de 324 J. cm².



Fonte: Autora.

Com base nos dados da Figura 19 e o desenvolvimento equacional que foi relatado na metodologia podemos calcular as taxas de geração de EROs via mecanismo Tipo I. As taxas de geração de EROs estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4: Taxas de produção de EROs das PCPDTBT- NPs para diferentes condições de irradiação.

Luz	k_f (10 ⁻³ s ⁻¹)	k_{ROS} (M ⁻¹ s ⁻¹)
BRANCA	4,817 ± 0,517	14,168 ± 1,520
450 nm	7,200 ± 2,350	21,176 ± 6,912
525 nm	0,217 ± 0,031	2,697 ± 0,353
625 nm	0,917 ± 0,120	0,638 ± 0,088

Fonte: Autora

Os resultados demonstraram que as quatro condições de irradiação possuem a capacidade de induzir a geração de EROs pelas PCPDTBT-NPs. Entretanto as duas condições que possuem taxas mais significativas são a irradiação em 450 nm e a luz branca. Além disso, é importante ressaltar que a amostra que foi irradiada com o comprimento de onda específico

de 450 nm teve a maior taxa de produção de EROs. A dose de energia da luz branca é maior que a dose de energia da luz azul. Nesse sentido, esperava-se que a luz branca tivesse uma maior taxa de geração de EROs porém os resultados sugerem o contrário. Tal resultado induz a hipótese de que a luz branca também gera calor além de EROs. Esse efeito fototérmico é induzido pela relaxação vibracional que pode potencialmente influenciar na eficiência de fluorescência⁴⁴.

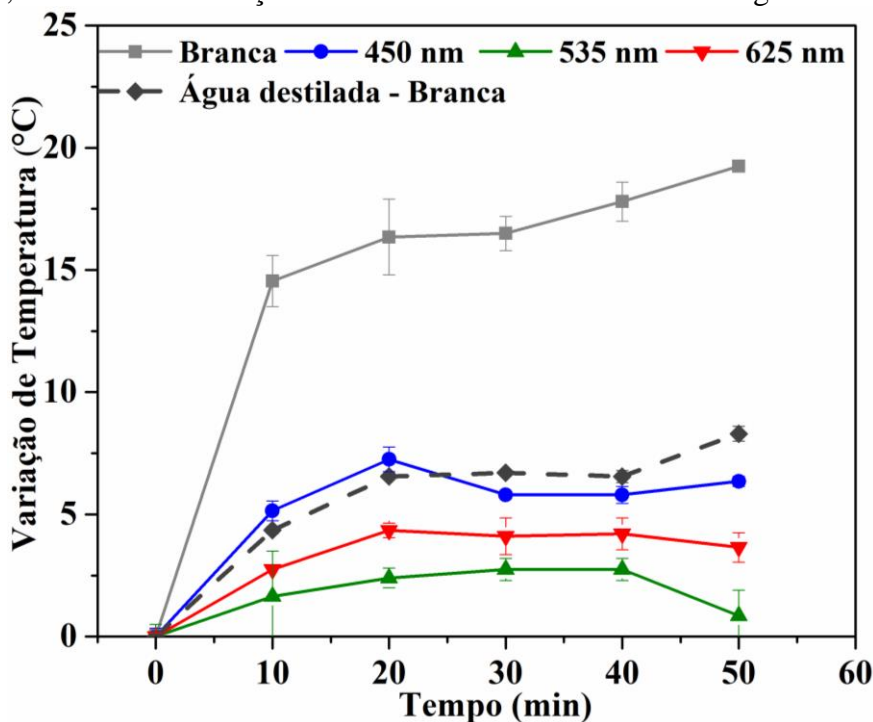
A geração de EROs pelas PCPDTBT- NPs já foi relatada na literatura, dentre os casos podemos citar novamente as ALPBs sintetizadas por Zhou *et al.* (2022)¹⁰¹, o qual utilizou a sonda fluorescente DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato) para determinar a produção de NO (Óxido Nítrico) quando irradiado com um laser de 808 nm. Os resultados confirmaram a ocorrência da geração de NO, sendo essa produção um dos mecanismos apresentados pelos autores para explicar a redução nas UFCs. Para essas ALPBs também foi observado um aumento em torno de 25 °C de temperatura em comparação com o controle em PBS, isso após 20 minutos de irradiação com um laser de 808 nm (1.0 Wcm^{-2}).

Com base no mecanismo de geração de EROs para o contexto de nanopartículas semicondutoras, podemos supor que elétrons excitados para banda de condução foram transferidos para o oxigênio molecular gerando EROs^{61,65} via mecanismo Tipo I. Além disso, as lacunas presente na banda de valência podem interagir com água produzindo OH^{\cdot} ^{61,65}. Tendo em vista que esses radicais são oxidantes extremamente agressivos, eles podem atacar as cepas bacterianas e prejudicar seu funcionamento adequado, acarretando no efeito fotodinâmico demonstrado em ambas as cepas bacterianas⁶¹.

4.6 Resultados dos efeitos fototérmicos

As bactérias são microrganismos que dependem de condições específicas de temperatura para a sua sobrevivência. Nesse sentido, a indução de alterações da temperatura devido o processo fototérmico das PCPDTBT-NPs podem inferir no processo de inativação das bactérias. Os resultados referentes a variação de temperatura induzida pelas PCPDTBT-NPs sob diferentes condições de irradiação estão dispostos na Figura 20.

Figura 20: Variação de temperatura induzida pelas PCPDTBT-NPs ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para diferentes condições de irradiação. Os grupos irradiados (450, 525 e 625 nm) com doses de energia $48,6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ e a irradiação com a luz branca com dose de energia de $145,8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.



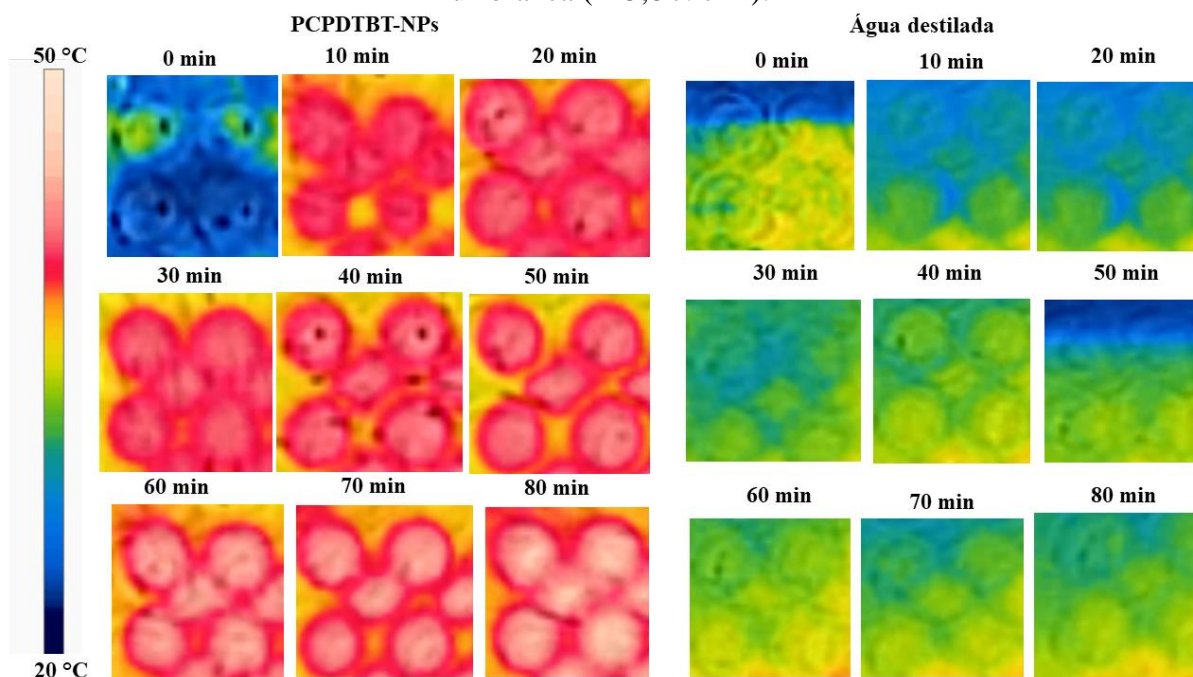
Fonte: Autora.

Na Figura 20 pode-se observar que ocorre a variação de temperatura da ordem de 20 °C quando a amostra foi irradiada com luz branca. Esse comportamento fototérmico das PCPDTBT-NPs já foi observado na literatura. Dentre os trabalhos que observaram esse efeito podemos citar o desenvolvido por Cai *et al.*, (2022)¹⁰³ que sintetizou NPs de PCPDTBT, intituladas NP-Ab, baseadas no encapsulamento do PCPDTBT pelo DSPE-PEG2000-NHS (1,2-Distearol-sn-Glicerol-3-Fosfoetanolamina; polietileno glicol (PEG); carboxila N-Hydroxisucinimida ester (NHS)), as quais foram associadas ao anticorpo IgG2b com o objetivo de inativar o SARS-CoV-2. Nesse trabalho, foram analisados a capacidade de inativar o vírus dentro das células ACE2/HEK293T quando utilizado as NP-Ab, apenas as NPs somado ao anticorpo e as NP-Ab quando irradiadas por um painel de LED emitindo luz em 650 nm. Os resultados demonstraram que o efeito fototérmico das NP-Ab inativaram mais rapidamente o vírus em comparação com os outros grupos estudados.

Outro dado importante é a alteração de temperatura, pelo fato de que depois de 10 min de irradiação ocorreu um aumento de 28 °C na solução contendo as PCPDTBT-NPs, enquanto que no controle irradiado com apenas o PBS a alteração da temperatura foi de apenas 2°C durante o mesmo período. Desse modo, as NP-Abs foram capazes de neutralizar o vírus SARS-CoV-2 dentro de células com através da terapia fototérmica¹⁰³.

Na Figura 21 estão dispostas as imagens térmicas obtidas utilizando a câmera fototérmica, em intervalos de 10 min, durante a irradiação com luz branca (27 mW.cm^{-2}). As imagens foram obtidas tanto do controle água destilada quanto da solução contendo as PCPDTBT-NPs na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 21: Efeito fototérmico das PCPDTNB-NPs ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induzido pela irradiação de luz branca ($145,8 \text{ J. cm}^{-2}$).



Fonte: Autora.

Os resultados demonstram que as PCPDTBT-NPs quando irradiadas com luz branca possui a capacidade de gerar calor de tal forma a alcançar temperaturas próximas a 50°C após 60 min de irradiação. Em contrapartida o controle utilizando a água destilada, para o mesmo, alcançou temperaturas em torno dos $27,2^\circ\text{C}$. Tendo em vista que para o caso dos microrganismos mais complexos tais como as bactérias, é amplamente conhecido que a maioria das bactérias patogênicas são mesófilas e tem seu desenvolvimento ocorrendo em temperaturas entre 33 e 41°C ¹⁰⁴. No entanto, em temperaturas elevadas o crescimento bacteriano é inibido assim como a sua mobilidade¹⁰⁵. Especificamente para o caso da *E. coli* foi demonstrado que em temperaturas acima de 46°C ocorre dano na membrana externa permitindo a melhor entrada do FS¹⁰⁵. Ainda para o caso específico da *E. coli* também já é conhecido que a exposição das cepas as temperaturas entre 44 e 45°C por 10 min concomita na redução da síntese proteica^{106,107}.

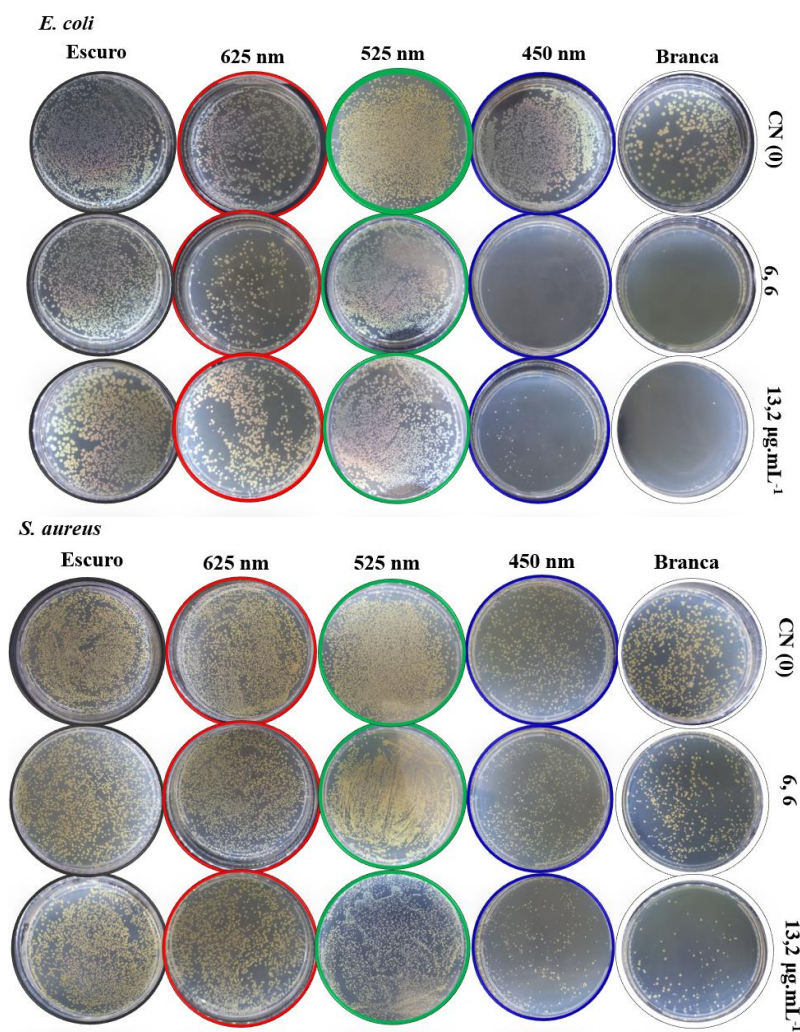
Por outro lado, para o caso da *S. aureus* estudos demonstram que quando as cepas são expostas a temperatura de 50°C ocorre uma redução de 50 % do número de células viáveis.

Entretanto, apenas após 2h de exposição a temperatura de 60°C que foi observada uma redução de células viáveis próxima a 100 %¹⁰⁸. Nesse sentido, podemos supor que a temperatura tem um importante papel no processo de IFD utilizando as PCPDTBT-NPs como FS para ambas as bactérias. Mas vale ressaltar que para o caso da *E. coli* podemos supor, com base na literatura, que a elevação até as temperaturas de 43 e 45 °C induzida pelo efeito fototérmico da luz branca, contribuiu para facilitar a entrada do FS¹⁰³ assim como deve ter dificultado a síntese proteica da bactéria^{104,105}.

4.1 Possíveis mecanismos de inativação com base nos resultados.

Conforme já demonstrado nos resultados dos experimentos biológicos, ocorre a IFD para ambas as bactérias, este resultado está ilustrado na Figura 22. Entretanto, apenas a *E. coli* apresentou efeito fotobactericida quando irradiado com a luz branca.

Figura 22: Placas de petri dos ensaios biológicos.



Fonte: Autora.

Para compreendermos esses resultados podemos supor alguns aspectos que podem estar acontecendo antes da irradiação e durante a irradiação. Antes do processo de irradiação temos o período de internalização das PCPDTBT-NPs. Nessa primeira etapa, podemos citar o aspecto da interação eletrostática entre as bactérias e a PCPDTBT-NPs. Um exemplo para ilustrar o efeito da carga das NPs no processo de internalização é o estudo desenvolvido por Alpaslan *et al.*, (2017)¹⁰⁹ sintetizou nanopartículas de Oxido de Cério (nanocería) e avaliou-as quanto a seu possível efeito bactericida em diferentes pH, frente a *P. aeruginosa* e a *Staphylococcus epidermidis*. O resultado obtido demonstrou que para o pH 9, no qual as nanocerías possuem Potencial Zeta de $11,76 \pm 3,54$ mV, teve um efeito maior na bactéria gram-negativa *P. aeruginosa* e na gram-positiva *S. epidermidis* do que as nanocerías no pH 6 contendo um Potencial Zeta de $-8,75 \pm 4,17$ mV.

Entretanto, é importante ressaltar a redução do crescimento microbiano foi maior para *P. aeruginosa* em pH 9 do que para *S. epidermidis*. Portanto, a mesma matriz de nanopartícula em um pH teve um efeito maior em uma bactéria Gram-negativa do que em uma gram-positiva por conta da carga dessa nanopartícula¹⁰⁹.

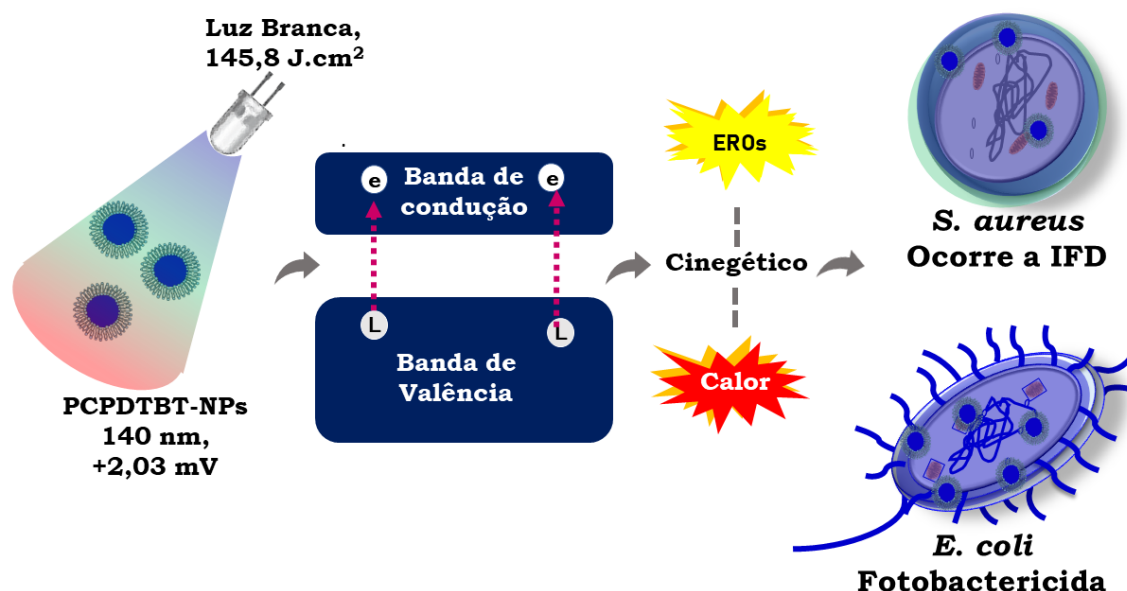
A explicação para isso é a interação eletrostática entre as nanopartículas e as bactérias, sendo que, quando as NPs possuem uma carga positiva são mais atraídas pelas bactérias gram-negativa do que pelas bactérias gram-positiva. Nesse caso a carga da *P. aeruginosa* era de -8 mV e da *S. epidermidis* de -7 mV. Por conta dessa diferença entre as cargas, as nanocerías com pH 9 contendo uma carga positiva foram mais eficazes contra a *P. aeruginosa*¹⁰⁹.

Paralelamente a isso, sabemos que carga global da *S aureus* é em torno de -10 mV e a da *E. coli* é de -16 mV, ambas em PBS¹¹⁰. Por conta disso, podemos supor que as PCPDTBT-NPs possuem uma atração maior pela *E. coli* do que pela *S. aureus* o que ocasiona em um resultado de IFD mais proeminente na *E coli*.

Durante o processo de irradiação foi demonstrado que ocorre a geração de EROs, além da produção de calor. Como já mencionado, o aumento da temperatura no caso da *E. coli* facilita a entrada do FS e também desestabiliza a membrana externa, assim como dificulta a síntese de proteínas¹⁰⁹. Por conta disso, podemos supor que enquanto está ocorrendo a irradiação a geração de calor facilita a entrada das PCPDTBT-NPs, além de produzir um estresse térmico. Paralelamente a isso, ocorre a geração de EROs que acarreta em estresse oxidativo. Desse modo, esse efeito sinérgico entre o estresse oxidativo e o estresse térmico

acarreta em um maior efeito biológico com a irradiação com luz branca. Nesse sentido, temos como um possível mecanismo de ação descrito na Figura 23.

Figura 23: Possível mecanismo de ação da fotoinativação das bactérias.



Fonte: Autora.

Outro indício que está ocorrendo um efeito sinérgico entre a terapia fotodinâmica e a terapia fototérmica é o fato que a luz azul obteve uma maior taxa de geração de EROs, porém, sem aquecimento. Enquanto para a luz branca ocorre, não só a geração de EROs mas também a geração de calor, a irradiação com luz branca foi a que teve o melhor resultado em termos de morte bacteriana.

Do mesmo modo, o estresse térmico relacionado com o estresse oxidativo resulta na fotoinativação da *S. aureus* quando irradiada com a luz branca. Entretanto, na *S. aureus* a atração eletrostática é inferior, como resultado disso menos PCPDTBT-NPs entram em contato com a membrana. Desse modo, quando ocorreu a irradiação as PCPDTBT-NPs que estavam ligadas a parede ou internalizadas não foram capazes de gerar EROs e calor o suficiente para que ocorresse um efeito fotobactericida.

5 Conclusões

Foram preparadas PCPDTBT-NPs com dimensões em torno de 140 nm, as quais possuem alta capacidade de absorção e emissão de luz nas regiões do visível e do infravermelho próximo. As PCPDTBT-NPs possuem efeito fotoantimicrobiano frente a *S. aureus*, todavia não possuem efeito fotobactericida para as condições avaliadas no presente

trabalho. A redução das UFCs observadas no grupo irradiado são indícios que com um ajuste nas condições experimentais, em um novo estudo, poderíamos alcançar o efeito fotobactericida para *S. aureus*.

Por outro lado, para a bactéria *E coli* as PCPDTBT-NPs não apresentaram efeitos bactericidas, porém apresentaram efeitos fotobactericidas obtendo uma redução superior a $3\log_{10}$ das UFCs para o grupo irradiado com luz branca com dose de energia de $145,8 \text{ J.cm}^2$. Nesse sentido, as PCPDTBT-NPs podem atuar como um FS em no processo de terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Os resultados apresentados apontam que as PCPDTBT-NPs quando irradiadas com os comprimentos de onda específicos de 450, 525 e 625 nm e também com a luz branca produzem EROs. Entretanto apenas quando irradiados com a luz branca ocorre produção de calor com variação significativa para afetar os microrganismos, alcançando temperaturas próximas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dessa forma, fica claro que as PCPDTBT-NPs capazes de gerar estresse oxidativo e térmico em ambas as bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *E coli* (ATCC 25922). Ademais, os resultados sugerem que as PCPDTBT-NPs atuam em um efeito sinérgico entre a inativação fotodinâmica e inativação fototérmica quando irradiadas com a luz branca com uma dose de energia de $145,8 \text{ J.cm}^2$.

7. Referências

1. Spyrou, M. A. *et al.* Short Article Historical Y . pestis Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Short Article Historical Y . pestis Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics. 874–881 (2016) doi:10.1016/j.chom.2016.05.012.
2. Jarovsky, D. Treatment of Tuberculosis in Brazil — Past , Present , and Future Challenges. 58–72 (2019) doi:10.1007/s40506-019-0182-3.
3. Ma, J. *et al.* Antimicrobial resistance patterns, clinical features, and risk factors for septic shock and death of nosocomial *e coli* bacteremia in adult patients with hematological disease. *Med. (United States)* **96**, (2017).
4. Lee, J. Perspectives towards antibiotic resistance : from molecules to population. **57**, 181–184 (2019).

5. Abushaheen, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month* **66**, (2020).
6. Maisch, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1518–1526 (2015).
7. Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R. & Serruto, D. The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 287–302 (2021).
8. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **4**, 1–13 (2013).
9. Christaki, E., Marcou, M. & Tofarides, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J. Mol. Evol.* **88**, 26–40 (2020).
10. United Nations General Assembly. Follow-up to the political declaration of the high-level meeting of the General Assembly on antimicrobial resistance. General Assembly Seventy-third session. **07777**, 25 (2019).
11. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2021*. (2021).
12. By, C. & Neill, J. I. M. O. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY : FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON. (2016).
13. Dadgostar, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect. Drug Resist.* **12**, 3903–3910 (2019).
14. World Bank. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future. *World Bank Rep.* **2**, 1–132 (2017).
15. Holmes, A. H. *et al.* Antimicrobials : access and sustainable effectiveness 2 Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **387**, (2016).
16. Alexandra, J. *et al.* Molecular mechanisms of multidrug resistance in clinically relevant enteropathogenic bacteria (Review). 1–11 (2022)
doi:10.3892/etm.2022.11689.
17. Douafer, H., Andrieu, V., Phanstiel, O. & Brunel, J. M. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! *J. Med. Chem.* **62**, 8665–8681 (2019).

18. Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S. & Laxminarayan, R. Articles Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance : a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet. Heal.* **2**, e398–e405.
19. Dphil, I. F. *et al.* Global geographic trends in antimicrobial resistance : the role of international travel. 1–13 (2019) doi:10.1093/jtm/taz036.
20. Neill, J. O. '. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. (2014).
21. Rossi, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in. *Antimicrob. Resist. Invit.* **52**, 1138–1143 (2011).
22. Zhou, Y., Wu, W., Yang, P., Mao, D. & Liu, B. Biomaterials Near-infrared chemiluminescent nanoprobe for deep imaging and synergistic photothermal-nitric-oxide therapy of bacterial infection. **288**, (2022).
23. Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2329–2335 (2005).
24. Hamblin, M. R. & Abrahamse, H. Oxygen-independent antimicrobial photoinactivation: Type III photochemical mechanism? *Antibiotics* **9**, 1–17 (2020).
25. Caires, C. S. A. *et al.* Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by a Natural Food Colorant (E-141ii). *Molecules* **25**, 4464 (2020).
26. Diogo, P. *et al.* An insight into advanced approaches for photosensitizer optimization in endodontics—a critical review. *J. Funct. Biomater.* **10**, (2019).
27. Hamblin, M. R. ScienceDirect Antimicrobial photodynamic inactivation : a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67–73 (2016).
28. Sebraõ, C. C. N., Bezerra, A. G., De França, P. H. C., Ferreira, L. E. & Westphalen, V. P. D. Comparison of the Efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as Photosensitizers in Photodynamic Therapy Techniques for *Enterococcus faecalis* Inactivation. *Photomed. Laser Surg.* **35**, 18–23 (2017).
29. Caires, C. S. A. *et al.* Photoinactivation effect of eosin methylene blue and

- chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 1081–1088 (2017) doi:10.1007/s10103-017-2210-1.
30. Pérez-laguna, V., García-luque, I., Ballesta, S. & Pérez-artiaga, L. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Photodynamic therapy using methylene blue , combined or not with gentamicin , against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **31**, 101810 (2020).
 31. Benedetti, C. *et al.* LWT - Food Science and Technology Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **76**, 198–202 (2017).
 32. Khan, S. *et al.* Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Photoinactivation of multidrug resistant bacteria by monomeric methylene blue conjugated gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **174**, 150–161 (2017).
 33. Caires, C. S. A. *et al.* Photoinactivation of mcr-1 positive *Escherichia coli*. *Laser Phys. Lett. Lett.* **15**, 5 (2018).
 34. Orlandi, V. T., Martegani, E. & Bolognese, F. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Catalase A is involved in the response to photooxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **22**, 233–240 (2018).
 35. Lambrechts, S. A. G., Aalders, M. C. G. & Marle, J. Van. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. **49**, 2026–2034 (2005).
 36. Engelmann, F. M. *et al.* Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 175–185 (2007).
 37. Alberts, B. *et al.* *Biologia molecular da célula. Biologia Molecular da Célula* (2017).
 38. Moreira, José Luciano Bezerra; Carvalho, Cibele Barreto Mano; Frota, C. C. *Visualização de bactérias e colorações.* (Imprensa Universitária, 2015).
 39. Zhang, X. Gold Nanoparticles : Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochem. Biophys.* 771–775 (2015) doi:10.1007/s12013-015-0529-4.
 40. Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A. & Bahador, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview. *Laser Ther.* **27**, 293–302 (2018).
 41. Sobczynski, J. & Polski, A. Nanocarriers for Photosensitizers for Use in Antimicrobial

- Photodynamic Therapy. 481–502 (2017) doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00021-4.
42. Bekmukhametova, A. *et al.* Photodynamic therapy with nanoparticles to combat microbial infection and resistance. *Nanoscale* **12**, 21034–21059 (2020).
 43. Lima, A. R. Estudo de Fotossensibilizadores para o Controle Fotodinâmico da População de Larvas de *Aedes aegypti* (*diptera* : *culicidae*). Alessandra Ramos Lima. *Tese de Doutorado* (2020).
 44. Darbrpwski, J. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy : Mechanisms of Their Generation and Potentiation. **70**, (2017).
 45. Kwiatkowski, S. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy Photodynamic therapy – mechanisms , photosensitizers and combinations. **106**, 1098–1107 (2018).
 46. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J. & Berr, F. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy : fundamental aspects. 259–268 (2009) doi:10.1007/s10103-008-0539-1.
 47. Managa, M. & Nyokong, T. Photodynamic antimicrobial chemotherapy activity of gallium tetra-(4-carboxyphenyl) porphyrin when conjugated to differently shaped platinum nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **1099**, 432–440 (2015).
 48. Garibo, D. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high - antimicrobial activity. *Sci. Rep.* 1–11 (2020) doi:10.1038/s41598-020-69606-7.
 49. Porter, G. C. *et al.* AgNP / Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications. *Carbohydr. Polym.* **251**, 117017 (2021).
 50. Naik, T. R. R., Shivashankar, S. A. & Bindu, P. J. Materials NanoScience Microwave-assisted synthesis of copper nanoparticles : influence of copper nanoparticles morphology on the antimicrobial activity. **7**, 62–67 (2020).
 51. Tao, C. Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles : research progress , challenges and prospects. 537–543 (2018) doi:10.1111/lam.13082.
 52. Njoki, P. N. *et al.* Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. 14664–14669 (2007).
 53. Service, R. F. Nanotechnology grows up. *Science* (80-.). **304**, 1732–1734 (2004).

54. Miao, H., Yang, J., Wei, Y., Li, W. & Zhu, Y. Applied Catalysis B : Environmental Visible-light photocatalysis of PDI nanowires enhanced by plasmonic effect of the gold nanoparticles. *Appl. Catal. B Environ.* **239**, 61–67 (2018).
55. Caires, C. S. A. *et al.* Materials Science & Engineering C Effective killing of bacteria under blue-light irradiation promoted by green synthesized silver nanoparticles loaded on reduced graphene oxide sheets. *Mater. Sci. Eng. C* **113**, 110984 (2020).
56. Krajczewski, J. & Ko, K. Plasmonic nanoparticles in chemical analysis. 17559–17576 (2017) doi:10.1039/c7ra01034f.
57. Clavero, C. Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices. *Nat. Publ. Gr.* **8**, (2014).
58. Amendola, V., Pilot, R. & Frascioni, M. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles : a review. (2017).
59. Feng, Y., Liu, L., Zhang, J., Aslan, H. & Dong, M. Photoactive antimicrobial nanomaterials. *J. Mater. Chem. B* **5**, 8631–8652 (2017).
60. Rodrigues, C. H. *et al.* Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, (2021).
61. Yadav, H. M., Kim, J. & Pawar, S. H. Developments in photocatalytic antibacterial activity of nano TiO₂ : A review. *Korean J. Chem. Eng.* **33**, 1989–1998 (2016).
62. Bisquert, Juan; Cendula, Peter; Bertoluzzi, Luca, and Gimenez, S. Energy Diagram of Semiconductor/Electrolyte Junctions. 2013–2015 (2014).
63. Lutz, J., Schlangenotto, H., Scheuermann, U., De Doncker, R. *Semiconductor Properties. Nanoelectronics* (2018). doi:10.1201/b18131-15.
64. Shu, J., Wang, Z., Xia, G. & Zheng, Y. One-pot synthesis of AgCl @ Ag hybrid photocatalyst with high photocatalytic activity and photostability under visible light and sunlight irradiation. *Chem. Eng. J.* **252**, 374–381 (2014).
65. You, J., Guo, Y., Guo, R. & Liu, X. A review of visible light-active photocatalysts for water disinfection : Features and prospects. *Chem. Eng. J.* **373**, 624–641 (2019).
66. Huang, J., Ho, W. & Wang, X. Metal-free disinfection effects induced by graphitic

- carbon nitride polymers under visible light illumination. *Chem. Commun.* **50**, 4338–4340 (2014).
67. Liao, C. & Li, Y. Visible-Light Active Titanium Dioxide Nanomaterials with Bactericidal Properties. (2020).
 68. Zhang, H. *et al.* Dual-Mode Antibacterial Conjugated Polymer Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. **1900301**, 1–7 (2020).
 69. Le, Thanh-Hai; Kim, Yookyung; Yoon, H. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. *Polymers (Basel)*. (2017) doi:10.3390/polym9040150.
 70. Macfarlane, L. R., Shaikh, H., Garcia-hernandez, J. D. & Vespa, M. Functional nanoparticles through. *Nat. Rev. Mater.* doi:10.1038/s41578-020-00233-4.
 71. Zeglio, E., Rutz, A. L., Winkler, T. E., Malliaras, G. G. & Herland, A. Conjugated Polymers for Assessing and Controlling Biological Functions. **1806712**, (2019).
 72. Zhu, C., Liu, L., Yang, Q., Lv, F. & Wang, S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy. *Chem. Rev.* **112**, 4687–4735 (2012).
 73. Zhang, Z. *et al.* Conjugated Polymers for Flexible Energy Harvesting and Storage. **1704261**, 1–19 (2018).
 74. Liras, M., De, V. A., Shea, P. O. & Liras, M. *Chem Soc Rev.* **48**, (2019).
 75. Fratini, S., Nikolka, M., Salleo, A., Schweicher, G. & Siringhaus, H. polymers and molecular semiconductors. *Nat. Mater.* **19**, 491–502 (2020).
 76. Zhang, H. *et al.* Dual-Mode Antibacterial Conjugated Polymer Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. *Macromol. Biosci.* **20**, 1–7 (2020).
 77. Abelha, T. F. *et al.* Low molecular weight PEG-PLGA polymers provide a superior matrix for conjugated polymer nanoparticles in terms of physicochemical properties, biocompatibility and optical/photoacoustic performance. *Mater. Chem. B* (2019) doi:10.1039/C9TB00937J.
 78. Nagy-simon, T. *et al.* Pluronic stabilized conjugated polymer nanoparticles for NIR fluorescence imaging and dual phototherapy applications. *J. Mol. Struct.* **1243**, 130931 (2021).

79. Abelha, T. Introdução às aplicações biológicas de biomateriais. 1–35 (2021).
80. Feng, G. *et al.* Multifunctional Conjugated Polymer Nanoparticles for Image-Guided Photodynamic and Photothermal Therapy. **1602807**, 1–12 (2017).
81. Wang, Y., Feng, L. & Wang, S. Conjugated Polymer Nanoparticles for Imaging, Cell Activity Regulation, and Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1–20 (2019).
82. Pecher, J. & Mecking, S. Nanoparticles of conjugated polymers. *Chem. Rev.* **110**, 6260–6279 (2010).
83. Yoon, J. *et al.* Nanoparticles of Conjugated Polymers Prepared from Phase-Separated Films of Phospholipids and Polymers for Biomedical Applications. 4559–4564 (2014) doi:10.1002/adma.201400906.
84. Onorato, G. *et al.* Optical Control of Tissue Regeneration through Photostimulation of Organic Semiconducting Nanoparticles. **2200366**, 1–13 (2022).
85. Fedatto Abelha, T. & Rodrigues Lima Caires, A. Light-Activated Conjugated Polymers for Antibacterial Photodynamic and Photothermal Therapy. *Adv. NanoBiomed Res.* **1**, 2100012 (2021).
86. Delgado, A. V, González-caballero, F., Hunter, R. J. & Koopal, L. K. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena ☆. **309**, 194–224 (2007).
87. Rohatgi, C. V *et al.* Low-Bandgap Conjugated Polymer Dots for Near-Infrared Fluorescence Imaging. (2018) doi:10.1021/acsanm.8b01014.
88. Neumann, P. R. *et al.* In Vivo Optical Performance of a New Class of Near-Infrared-Emitting Conjugated Polymers : Borylated PF8-BT. (2019) doi:10.1021/acsami.9b17022.
89. Abelha, T. F. *et al.* Thermal Lens Spectrometry Reveals Thermo-Optical Property Tuning of Conjugated Polymer Nanoparticles Prepared by Microfluidics. (2022) doi:10.1021/acsapm.2c00992.
90. Wang, B. *et al.* Oxygen-Embedded Pentacene Based Near-Infrared Chemiluminescent Nanoprobe for Highly Selective and Sensitive Visualization of Peroxynitrite In Vivo. (2020) doi:10.1021/acs.analchem.0c00329.
91. Modicano, P., Robert, P., Schüller, M., Holthof, J. & Kyrilis, F. L. European Journal of

- Pharmaceutics and Biopharmaceutics Enhanced optical imaging properties of lipid nanocapsules as vehicles for fluorescent conjugated polymers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **154**, 297–308 (2020).
92. Bhattacharjee, S. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
93. Lowry, G. V *et al.* Environmental Science Nano Guidance to improve the scientific value of zeta- potential measurements in nanoEHS. *Environ. Sci. Nano* **3**, 953–965 (2016).
94. Schwartz, B. J. C ONJUGATED P OLYMERS AS M OLECULAR M ATERIALS : How Chain Conformation and Film Morphology Influence Energy Transfer and Interchain Interactions. (2003) doi:10.1146/annurev.physchem.54.011002.103811.
95. Pinto, M. P. & Cardoso, M. Avaliação da eficácia de dois protocolos de higienização em áreas de produção de alimentos de um supermercado. *Hig. Aliment.* **22**, 106–111 (2008).
96. Lee, D., Sang, J. S., Yoo, P. J., Shin, T. J. & Oh, K. W. Machine-Washable Smart Textiles with Photothermal and Antibacterial Activities from Nanocomposite Fibers of Conjugated Polymer Nanoparticles. *Polymer (Guildf)*. **11**, (2019).
97. Summer, K., Browne, J., Hollanders, M. & Benkendorff, K. Biofilm Out of control : The need for standardised solvent approaches and data reporting in antibiofilm assays incorporating dimethyl-sulfoxide (DMSO). *Biofilm* **4**, 100081 (2022).
98. Lee, D., Joo, T., Yoo, P. J., Wha, K. & Park, J. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Conjugated polymer nano-ellipsoids assembled with octanoic acid and their polyurethane nanocomposites with simultaneous thermal storage and antibacterial activity. *J. Ind. Eng. Chem.* **63**, 33–40 (2018).
99. Barry, A. L., Lasner, R. A. & Diseases, I. Inhibition of Bacterial Growth by the Nitrofurantoin. **9**, 549–550 (1976).
100. Jasim, K. A. & Gesquiere, A. J. Ultrastable and Biofunctionalizable Conjugated Polymer Nanoparticles with Encapsulated Iron for Ferroptosis Assisted Chemodynamic Therapy. (2019) doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00737.
101. Zhou, Y., Wu, W., Yang, P., Mao, D. & Liu, B. Biomaterials Near-infrared

- chemiluminescent nanoprobe for deep imaging and synergistic photothermal-nitric-oxide therapy of bacterial infection. *Biomaterials* **288**, 121693 (2022).
102. Kim, H. & Xue, X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *J. Vis. Exp.* **2020**, 1–5 (2020).
 103. Cai, X. *et al.* A Multifunctional Neutralizing Antibody-Conjugated Nanoparticle Inhibits and Inactivates SARS-CoV-2. **2103240**, 1–12 (2022).
 104. Mackowiak, P. A. Direct Effects of Hyperthermia on Pathogenic Microorganisms: Teleologic Implications with Regard to Fever. **3**, 33–41 (1981).
 105. Menezes, S.; Teixeira, P. Lethal interaction between heat and methylene blue in. *INT. J. Hyperth.* **8**, 689–699 (1992).
 106. Eshraghi, N. *et al.* Effects of heat and amino acid supplementation on the uptake of arginine and its incorporation into proteins in *Escherichia coli*. **6736**, (2016).
 107. Ibelli, T., Templeton, S. & Levi-polyachenko, N. Progress on utilizing hyperthermia for mitigating bacterial infections. *Int. J. Hyperth.* **0**, 144–156 (2018).
 108. Richardson, I. P. *et al.* Hemodialysis Catheter Heat Transfer for Biofilm Prevention and Treatment. 92–99 (2016) doi:10.1097/MAT.0000000000000300.
 109. Alpaslan, E., Geilich, B. M., Yazici, H. & Webster, T. J. pH-Controlled Cerium Oxide Nanoparticle Inhibition of Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Growth. *Nat. Publ. Gr.* 1–12 (2017) doi:10.1038/srep45859.
 110. Gottenbos, B., Grijpma, D. W., Mei, H. C. Van Der, Feijen, J. & Busscher, H. J. JAC Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. 7–13 (2001).