

**Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo**

**Pedro Paulo Noronha Silva De Jesus**

**Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas a base de cobre com propriedades antimicrobianas aplicadas contra os patógenos da mastite bovina**

**São Paulo  
2020**

Pedro Paulo Noronha Silva de Jesus

Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas a base de cobre com propriedades antimicrobianas aplicadas contra os patógenos da mastite bovina

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas como parte dos requisitos para a conclusão do curso de mestrado de Processos Industriais.

Data da aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira  
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas  
do Estado de São Paulo

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira (Orientador)  
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Kléber Lanigra Guimarães (Membro)  
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera (Membro)  
FMVZ-UPS – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pedro Paulo Noronha Silva de Jesus

Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas a base de cobre com propriedades antimicrobianas aplicadas contra os patógenos da mastite bovina

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Área de Concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais

Orientador: Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira

São Paulo  
Set./2020

Ficha Catalográfica  
Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT  
do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

J58d **Jesus, Pedro Paulo Noronha Silva de**  
Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas a base de cobre com propriedades antimicrobianas aplicadas contra os patógenos da mastite bovina. / Pedro Paulo Noronha Silva de Jesus. São Paulo, 2020.  
253p.

Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira

1. Nanoestruturas 2. Cobre metálico 3. Aplicação in vitro 4. Microrganismos patógenos 5. Mastite bovina 6. Tese I. Oliveira, Adriano Marin de, orient. II. IPT. Coordenadoria de Ensino Tecnológico III. Título

2020-43 CDU 67.02(043)

“Se não tiver sucesso na primeira vez, continue tentando, e tente desvendar o que aconteceu.” – Prof<sup>o</sup> Dr. Henrique Eisi Toma

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente à toda a minha família, por todo o amor, paciência e força para superar todos os desafios impostos.

Agradeço, primeiramente, a minha mãe, Ana Paula, por estar ao meu lado durante todos os meus melhores e piores momentos da vida.

Agradeço a todos os pais que tive durante a minha vida, o meu avô Mário Sebastião, o meu padrasto Luiz Henrique e o meu padrinho Leonardo, o quais olharam por mim e me ensinaram todos os valores que me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a minha querida avó, Maria Aparecida, por todo o amor, carinho, cuidado, proteção, companhia, ensinamentos e exemplos que me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço aos meus irmãos, Bruna e Victor, por todo o amor, carinho e apoio fornecidos.

Agradeço a minha namorada, Angélica, por todo o amor, cuidado, compreensão e ajuda fornecida, fazendo com que eu me torne um homem melhor todos os dias.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Dr. Adriano Marim de Oliveira pela confiança, paciência e orientação em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço à toda a equipe do IPT por todo o suporte técnico fornecido, em especial aos meus amigos e colegas de trabalho, sendo o Jonas, a Danae, a Luana, a Natália, a Rubia e tantos outros colaboradores do instituto.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Dr. Hirochi Yamamura, ao Mestre Ricardo Spacanga Jordão, a Mestre Eliza Mami Ota e ao Mestre Sergio Fernandes por serem grandes orientadores nas etapas iniciais que me trouxeram até o atual momento.

Agradeço à Cecil S/A pela confiança e fé investida no meu trabalho.

Agradeço à Thayna, Mario, Rafael, Marina, Shuiti e vários outros amigos pela amizade, torcida e fé investida.

## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas nanoestruturas a base de cobre metálico para aplicação antimicrobiana *in vitro* contra os microrganismos patógenos da mastite. A síntese das nanoestruturas foi realizada pelo método de coprecipitação conduzida por uma reação de redução química entre o sulfato de cobre e o borohidreto de sódio em um sistema de atmosfera inerte e de alto cisalhamento, utilizando a quitosana, o cloreto de cetilpiridínio e a carboximetilcelulose como agentes de revestimento das nanopartículas de cobre. As estruturas foram caracterizadas quanto a suas propriedades químicas, físicas e morfológicas por espectrometria UV-Vis. e FTIR, XRD, DLS, SEM e TEM. Para obter resultados factíveis nas análises toxicológicas *in vitro*, foi realizada a padronização da quantidade de células inoculadas pela concentração de UFC/mL pelo estudo da cinética de crescimento dos microrganismos estudados. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar e pela obtenção da CIM pelo estudo da cinética de crescimento analisada pelo acompanhamento da DO ao longo do tempo. Desta forma, foi obtido uma CIM de crescimento microbiano de 79,4 mg/L, 79,4 mg/L e 317,5 mg/L de cobre com revestimento de quitosana, cloreto de cetilpiridínio e carboximetilcelulose, respectivamente, para promover a ampla e não seletiva ação biocida contra os patógenos da mastite estudados *in vitro*.

**Palavras-chave:** Cobre; Nanopartículas; Antimicrobiano; Mastite; Quitosana; Carboximetilcelulose; Cloreto de cetilpiridínio.

## ABSTRACT

### **Development and characterization of copper-based nanostructures with antimicrobial properties applied against bovine mastitis pathogens**

In this work copper-based nanostructures were developed for antimicrobial application *in vitro* against pathogenic microorganisms of mastitis. The synthesis of the nanostructures was performed by the coprecipitation method conducted by a chemical reduction reaction by copper sulfate and sodium borohydride in an inert atmosphere and high shear system, using chitosan, cetylpyridinium chloride and carboxymethylcellulose as coating agents of copper nanoparticles. The structures were characterized for their chemical, physical and morphological properties by UV-Vis spectrometry. and FTIR, XRD, DLS, SEM and TEM. To obtain feasible results in the *in vitro* toxicological analyzes, the amount of cells inoculated by CFU/mL concentration was standardized by studying the growth kinetics of microorganisms. Antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion method and by the obtaining MIC by studying the growth kinetics analyzed by the DO. To date, a microbial growth MIC of 79,4 mg/L, 79,4 mg/L e 317,5 mg/L of copper with coating agents of chitosan, cetylpyridinium chloride and carboxymethylcellulose, respectively, has been obtained to promote the broad and non-selective biocidal action against the mastitis pathogens studied *in vitro*.

**Keywords:** Copper; Nanoparticle; Antimicrobial; Mastitis; Chitosan; Carboximetylcellulose; Cetylpyridinium chloride.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos métodos top down e bottom up na obtenção de nanopartículas.....	25
Figura 2 – Estrutura da molécula de sulfato de cobre.....	35
Figura 3 – Estrutura da molécula de borohidreto de sódio.....	36
Figura 4 – Estrutura da molécula biopolimérica da carboximetilcelulose.....	37
Figura 5 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por CMC.....	38
Figura 6 – Estrutura da molécula biopolimérica da quitosana.....	39
Figura 7 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por quitosana.....	39
Figura 8 – Estrutura da molécula surfactante do cloreto cetilpiridínio.....	40
Figura 9 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por CCP.....	41
Figura 10 – Estrutura da molécula do ácido ascórbico.....	41
Figura 11 – Demonstração do efeito antimicrobiano das nanopartículas de cobre contra a célula.....	55
Figura 12 – Fluxograma de síntese e caracterização de nanoestruturas a base de cobre.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 13 – Esquema do sistema de síntese de nanopartículas de cobre em reator de batelada alimentada com controle de temperatura e pH e inertização oxidativa por aeração.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 14 – Fluxograma da metodologia de avaliação da atividade antimicrobiana das nanoestruturas a base de cobre contra os diferentes microrganismos patógenos da mastite.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 15 – Sistema de síntese das nanoestruturas a base de cobre com controle de agitação, temperatura, pH e vazão de alimentação de reagentes.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 16 – Fluxograma do processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de NaBH <sub>4</sub> em sistema carregado com solução de CuSO <sub>4</sub> , solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 17 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana em função da variação da proporção mássica de quitosana pelo processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de NaBH <sub>4</sub> em sistema carregado com solução de CuSO <sub>4</sub> , solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 18 – Fluxograma do processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de CuSO <sub>4</sub> , solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico em sistema carregado com solução de NaBH <sub>4</sub> e água deionizada.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

Figura 19 – Fluxograma do processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de  $\text{CuSO}_4$  e solução de  $\text{NaBH}_4$  simultaneamente, em sistema carregado com solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana em função da variação da proporção mássica de quitosana pelo processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de  $\text{NaBH}_4$  e solução de  $\text{CuSO}_4$  simultaneamente em sistema carregado com solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP em função da variação da proporção mássica de CCP pelo processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de  $\text{NaBH}_4$  em sistema carregado com solução de  $\text{CuSO}_4$ , solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC em função da variação da proporção mássica de CMC pelo processo de alimentação pelo gotejamento controlado de solução de  $\text{NaBH}_4$  e solução de  $\text{CuSO}_4$  simultaneamente em sistema carregado com solução de agente de revestimento, solução de ácido ascórbico e água deionizada. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana em função da variação da relação molar entre  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{CuSO}_4$  de 1:1. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana em função da variação da relação molar entre  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{CuSO}_4$  de 1:1,5. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da relação molar entre  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{CuSO}_4$  de 1:1,5. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da relação molar entre  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{CuSO}_4$  de 1:1. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 250 rpm. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 500 rpm. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 750 rpm. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 1000 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 250 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 500 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 750 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 1000 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 250 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 500 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 750 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da velocidade de agitação do sistema de 1000 rpm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 39 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 25°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 40 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 40°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 50°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 42 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 60°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 43 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 70°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 44 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 25°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 45 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 40°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 46 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 50°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 47 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 60°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 25°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 49 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 40°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 50 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 50°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 51 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da temperatura de aquecimento do sistema fixada em 60°C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 52 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 3,0$ . .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 53 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 4,0$ . .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 54 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 2,0$ . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 55 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 3,0$ . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 56 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 4,0$ . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 57 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 5,0$ . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 58 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 2,0$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 59 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 3,0$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 60 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 4,0$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 61 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 5,0$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 62 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação do  $\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 6,0$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 63 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 500  $\mu\text{mol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 64 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 1,00  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 65 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 2,50  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 66 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e quitosana na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 5,00  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 67 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 500  $\mu\text{mol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 68 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 1,00  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 69 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 2,50  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 70 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 5,00  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 71 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CCP na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 10,00  $\text{mmol/L}$  no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 72 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 500 µmol/L no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 73 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 1,00 mmol/L no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 74 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 2,50 mmol/L no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 75 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 5,00 mmol/L no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 76 – Tamanho do raio hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das nanoestruturas a base de cobre e CMC na avaliação da concentração de ácido ascórbico de 10,00 mmol/L no sistema. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 77 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m) com magnificação de 100.000 vezes... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 78 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m) com magnificação de 50.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 79 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m) com magnificação de 15.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 80 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m) com magnificação de 100.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 81 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m) com magnificação de 50.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 82 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m) com magnificação de 15.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 83 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m) com magnificação de 100.000 vezes. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 84 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m) com magnificação de 50.000 vezes. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 85 – Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m) com magnificação de 50.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 86 – Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m) com magnificação de 100.000 vezes... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 87 – Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m) com magnificação de 50.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 88 – Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m) com magnificação de 100.000 vezes..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 89 – Análise de varredura do espectro visível sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 90 – Análise de varredura do espectro visível sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m)..**Erro! Indicador não definido.**

Figura 91 – Análise de varredura do espectro visível sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 92 – Espectrograma no infravermelho da transformada de Fourier sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 93 – Espectrograma no infravermelho da transformada de Fourier sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 94 – Espectrograma no infravermelho da transformada de Fourier sobre a dispersão de nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 95 – Distribuição da intensidade do tamanho das nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 96 – Distribuição da intensidade do tamanho das nanoestruturas a base de cobre e CCP 1,00% (m/m). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 97 – Distribuição da intensidade do tamanho das nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 98 – Difratoograma das nanoestruturas a base de cobre e quitosana 0,50% (m/m)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 99 – Difratoograma das nanoestruturas a base de cobre e CMC 1,00% (m/m). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 100 – Perfil de crescimento da *Escherichia coli* ATCC® 8739™ em caldo Mueller-Hinton 111,0% (m/m) pela análise da DO em função do tempo..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 101 – Acompanhamento do crescimento da *Escherichia coli* ATCC® 8739™ em ágar Mueller-Hinton pela contagem da UFC/mL em função do tempo..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 102 – Acompanhamento do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ em caldo Mueller-Hinton 111,0% (m/m) pela análise da DO em função do tempo..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 103 – Acompanhamento do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ em ágar Mueller-Hinton pela contagem da UFC/mL em função do tempo. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 104 – Acompanhamento do crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ em caldo Mueller-Hinton 111,0% (m/m) pela análise da DO em função do tempo. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 105 – Acompanhamento do crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ em ágar Mueller-Hinton pela contagem da UFC/mL em função do tempo. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 106 – Acompanhamento do crescimento da *Candida albicans* ATCC® 10231™ em caldo Mueller-Hinton 111,0% (m/m) pela análise da DO em função do tempo. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 107 – Acompanhamento do crescimento da *Candida albicans* ATCC® 10231™ em ágar Mueller-Hinton pela contagem da UFC/mL em função do tempo. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 108 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton dos componentes da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre contra a *Escherichia coli* ATCC® 8739™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 109 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton das nanoestruturas a base de cobre com os diferentes agentes de revestimentos estudados, sendo a quitosana, o CCP e o CMC, contra a *Escherichia coli* ATCC® 8739™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 110 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton dos componentes da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre contra a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 111 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton das nanoestruturas a base de cobre com os diferentes agentes de revestimentos estudados, sendo a quitosana, o CCP e o CMC, contra a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 112 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton dos componentes da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre contra a *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 113 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton das nanoestruturas a base de cobre com os diferentes agentes de revestimentos estudados, sendo a quitosana, o CCP e o CMC, contra a *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 114 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton dos componentes da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre contra a *Candida albicans* ATCC® 10231™ ..... **Erro! Indicador não definido.**



Figura 115 – Avaliação da atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton das nanoestruturas a base de cobre com os diferentes agentes de revestimentos estudados, sendo a quitosana, o CCP e o CMC, contra a *Candida albicans* ATCC® 10231™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 116 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com quitosana 0,50% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Escherichia coli* ATCC® 8739™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 117 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CCP 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Escherichia coli* ATCC® 8739™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 118 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CMC 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Escherichia coli* ATCC® 8739™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 119 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com quitosana 0,50% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 120 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CCP 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 121 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CMC 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 122 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com quitosana 0,50% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 123 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CCP 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 124 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CMC 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 125 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com

quitosana 0,50% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Candida albicans* ATCC® 10231™. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 126 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CCP 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Candida albicans* ATCC® 10231™. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 127 – Comparação da avaliação da atividade antimicrobiana em caldo Mueller-Hinton da amostra dispersão de nanoestruturas a base de cobre com CMC 1,00% (m/m) para determinação da concentração inibitória mínima da *Candida albicans* ATCC® 10231™. .... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades gerais do Cobre (Cu).....	42
Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e a metodologia analítica utilizada na síntese e caracterização das nanoestruturas a base de cobre. ....	58
Tabela 3 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento do efeito antimicrobiano das nanoestruturas a base de cobre.....	60
Tabela 4 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento do metabolismo e da toxicologia do cobre em sistemas microbianos. ....	61
Tabela 5 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento da mastite e identificação dos principais sistemas microbianos patógenos. ....	62
Tabela 6 – Identificação da relação de componentes da dispersão de nanoestruturas a base de cobre avaliados separadamente contra os diferentes microrganismos patógenos da mastite. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

[Fe-S] – ligação ferro-enxofre  
Å – ångström  
ATCC® – *American Type Cell Culture*®  
ATPase – enzima adenosinatrifosfatase  
CCP – cloreto de cetilpiridínio  
CIM – concentração inibitória mínima  
CMC – carboximetilcelulose  
DLS – *dynamic light scattering*  
DO – densidade óptica  
EMA – *European Medicines Agency*  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPA – Environmental Protection Agency  
FDA – *American Food and Drug Administration*  
FEG – *Fiel Emission Gun*  
FTIR – *Fourier Transform Infra-Red*  
J – joule  
 $k_B$  – constante de Boltzmann  
K – Kelvin  
m/m – relação entre massas  
MH – Mueller-Hinton  
ROS – *Reactive Oxygen Species*  
STP – *Standard Temperature and Pressure*  
SEM – Scanning Eletron Microscopy  
STM – Scanning Tunneling Microscope  
TEM – Transmission Eletron Microscopy  
UFC – unidades celulares formadoras de colônias  
v/v – relação entre volumes  
WHS – *World Health Organization*  
XRD – *X-Ray Diffraction*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVO</b> .....	22
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1 NANOTECNOLOGIA .....	23
3.1.1 Síntese de nanoestruturas com base metálica.....	24
3.1.2 Síntese de nanopartículas metálicas por coprecipitação.....	25
3.1.3 Química da produção de nanopartículas metálicas por coprecipitação .....	32
3.1.4 Componentes do sistema de produção de partículas metálicas .....	34
3.2 PROPRIEDADES DO COBRE .....	42
3.2.1 Aplicações tecnológicas do cobre.....	42
3.2.2 O cobre no sistema biológico .....	43
3.2.3 O cobre como agente antimicrobiano .....	53
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	57
4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	57
4.2 LISTA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	62
4.2.1 Síntese de nanoestruturas de cobre .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2 Caracterização de nanoestruturas de cobre .....	63
4.2.3 Avaliação antimicrobiana de nanoestruturas de cobre.....	63
4.3 SÍNTESE DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3.1 Preparo de soluções de sal conjugado, de agente redutor, agente antioxidante e de agente de revestimento.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3.2 Síntese de nanoestruturas a base de cobre por redução química	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.4.1 Caracterização físico-química das nanoestruturas a base de cobre ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.4.2 Caracterização morfológica das nanoestruturas a base de cobre	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.5.1 Padronização das condições de avaliação da atividade antimicrobiana.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1 SÍNTESE DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE POR REDUÇÃO QUÍMICA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

5.1.1	Variação do método de alimentação dos reagentes no sistema ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2	Variação da relação entre a concentração molar (mol/L) de CuSO <sub>4</sub> e NaBH <sub>4</sub> no sistema .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.3	Variação da velocidade de agitação do sistema .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.4	Variação da temperatura de aquecimento do sistema ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.5	Variação do pH do sistema .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.6	Variação a concentração de ácido ascórbico no sistema .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2	<b>CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE.</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das nanoestruturas a base de cobre .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.2	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanoestruturas a base de cobre .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.3	Espectroscopia no UV-Vis das nanoestruturas a base de cobre...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.4	Espectroscopia da transformada de Fourier no infravermelho ( <i>Fourier Transform Infra-Red</i> – FTIR) das nanoestruturas a base de cobre.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.5	Espalhamento dinâmico de luz ( <i>Dynamic Light Scattering</i> – DLS) das nanoestruturas a base de cobre .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.6	Difração de raios-X (DRX) das nanoestruturas a base de cobre...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOESTRUTURAS A BASE DE COBRE</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.1	Estudo da cinética de crescimento dos microrganismos patógenos da mastite	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.2	Estudo da atividade antimicrobiana das nanoestruturas a base de cobre microrganismos patógenos da mastite em meio sólido .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.3	Estudo da atividade antimicrobiana das nanoestruturas a base de cobre microrganismos patógenos da mastite em meio líquido .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo o anuário do leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, em 2018 foi produzido cerca de 35,1 bilhões de litros de leite, tornando o país no quarto maior produtor mundial no *ranking* de produtores de leite (EMBRAPA, 2019). A produção de leite brasileiro cresce junto a sua economia, ficando atrás apenas da produção da Índia, dos Estados Unidos da América e do Paquistão (ACOSTA et al, 2016; EMBRAPA, 2019).

Para garantir a qualidade de toda a quantidade do leite produzido, deve ser realizado o controle dos fatores de logística durante a obtenção e o armazenamento, os fator zootécnicos, sendo o manejo, a alimentação e o potencial genético do rebanho, e, por fim, os fatores sanitários da glândula mamária e do animal em geral (ACOSTA et al, 2016). O não cumprimento do controle destes fatores pode acarretar várias doenças no gado leiteiro, em particular a mastite, a qual é um dos principais influenciadores na diminuição da produção e/ou da qualidade do leite produzido (KIBEBEW, 2017).

A mastite é a doença mais difundida na indústria leiteira, com valores de infecção que variam de 15,4 e 28,6 % para o gado bovino (ACOSTA et al, 2016). Devido a esta alta incidência, é considerada a doença com maior potencial de devastação para a indústria leiteira mundial (OJO et al, 2009 apud KIBEBEW, 2017). Com isso, levando em consideração o ponto de vista zoonótico, conseqüente a mastite, pode ocorrer a transmissão de outras doenças como a tuberculose, brucelose, leptospirose, etc. aos consumidores finais de leite (MOGES et al, 2011).

Desta forma, a mastite é definida como uma inflamação do úbere, causada por microrganismos que adentram um ou mais dos quartos mamários de maneira ascendente pelo canal do teto, por alterações físico-químicas a glândula mamária ou outros fatores externos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2016 apud KIBEBEW, 2017; RADOSTITS et al, 2007 apud KIBEBEW, 2017). Devido a estas lesões, a destruição e neutralização dos agentes infecciosos é buscada para preparar o processo de cura tecidual.

Sendo uma doença multifatorial, a mastite geralmente é resultado da interação de diferentes fatores relacionados ao hospedeiro, ao patógeno, ao meio ambiente e a manipulação do animal. São vários e complexos os agentes etiológicos da mastite, sendo conhecido um grande número de microrganismos causadores da doença. Dentre os agentes infecciosos estão as bactérias *Streptococcus agalactiae*,

a *Staphylococcus aureus*, a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*, e a levedura *Candida albicans*, onde os patógenos bacterianos tem maior importância no cenário da doença, pois, devido ao seu maior potencial de contágio e a sua maior presença nos ambientes da produção leiteira, aumentam a taxa de prevalência de infecções primárias (ACOSTA et al, 2016; KIBEBEW, 2017).

Neste cenário a mastite pode ocorrer de maneira clínica ou subclínica, ou seja, pode, ou não, apresentar sintomas (ACOSTA et al, 2016), e para controlar a infecção da mastite no gado leiteiro, ou mesmo a sua prevenção, normalmente são utilizados agentes antimicrobianos (KRÖMER, LEIMBACH, 2017).

A *European Medicines Agency* categoriza as substâncias antibióticas disponíveis em três categorias principais de acordo com a importância crescente em relação a saúde humana, das quais apenas duas categorias destes compostos são utilizados na veterinária (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014 apud KRÖMER, LEIMBACH, 2017). Desta forma, alguns antibióticos tem uso controlado, sendo utilizados em casos onde não exista tratamento alternativo, evitando formação de microrganismos resistentes a estes medicamentos (KRÖMER, LEIMBACH, 2017).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade de um agente antimicrobiano de amplo espectro, ou seja, compostos que inibem o crescimento de um grande número de microrganismos em pequenas quantidades de aplicação de maneira seletiva ou não (TORTORA, 2012).

Com a necessidade de agentes antimicrobianos alternativos, a síntese ou a extração de compostos orgânicos ou inorgânicos com propriedades antimicrobianas é essencial, tendo aplicações potencialmente promissoras neste contexto (TORTORA, 2012). Como matéria prima inorgânica, o cobre foi registrado em 2008 pela organização estadunidense *Environmental Protection Agency* (EPA), onde as suas propriedades eletroquímicas competem aplicações antimicrobianas em superfícies de contato, exibindo 99,9% de eficiência no controle de proliferação de microrganismos (DEPNER et al, 2015; DEPNER et al, 2016; GRASS, RENSING, SOLIOZ, 2011; VINCENT et al, 2018), sendo amplamente estudado e utilizado devido a sua propriedade antimicrobiana (USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013).

O cobre é um agente antimicrobiano de amplo espectro biocida, sendo efetivo contra espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de algumas espécies de leveduras e fungos (USMAN et al, 2013). Desta forma, utiliza-se a nanotecnologia para ampliar ou conferir características químicas e físicas a um



determinado material, como a ação antimicrobiana do cobre, além de diminuir o consumo e a utilização de matéria prima (PRADEEP, 2007).

De maneira geral, as nanopartículas metálicas são preparadas na presença de um agente de estabilização coloidal para o controle do tamanho de partícula e dispersão no sistema, onde a síntese pode acontecer, principalmente, via decomposição térmica, redução termo e sono-química, deposição solvotérmica, abrasão à laser, radiação induzida, técnicas de microemulsão, técnicas de agentes de revestimento e redução química do sal conjugado do metal (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013), utilizando atmosfera inerte e agentes antioxidantes para o controle da oxidação e aumento de sua estabilidade do material metálico em dispersão durante a redução química (USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013).

Neste trabalho foram sintetizadas diferentes nanoestruturas a base de cobre metálico com dois diferentes biopolímeros, a quitosana e a carboximetilcelulose (CMC), e um agente surfactante catiônico, o cloreto de cetilpiridínio (CCP). A caracterização das nanoestruturas foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis. e no infravermelho, difração de raios-x, dispersão dinâmica de luz (DLS), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Por fim, a comparação do efeito antimicrobiano foi testado contra as cepas patogênicas da mastite bovina, todas padronizadas pela *American Type Cell Culture*® (ATCC®).

## 2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver nanoestruturas a base de cobre metálico revestidas por moléculas orgânicas funcionalizadas para aplicação *in vitro* como novas formas de combater os patógenos da mastite bovina.

Como objetivos específicos, é visado:

- 1) Determinar os melhores parâmetros de processo para o desenvolvimento das nanoestruturas a base de cobre metálico revestidas por moléculas orgânicas funcionalizadas;
- 2) Realizar um levantamento bibliográfico dos microrganismos patógenos da mastite para comparação do efeito antimicrobiano das nanoestruturas a base de cobre metálico revestidas por moléculas orgânicas funcionalizadas contra um amplo espectro microbiológico;
- 3) Determinar a melhor metodologia representativa para a avaliação da atividade antimicrobiana contra os microrganismos patógenos da mastite para quantificar a concentração mínima inibitória (CIM) *in vitro* de nanoestruturas a base de cobre metálico revestidas por moléculas orgânicas funcionalizadas;
- 4) Identificar as semelhanças e diferenças entre as diferentes nanoestruturas a base de cobre metálico revestidas por moléculas orgânicas funcionalizadas que proporcionam os diferentes valores de CIM *in vitro* para cada microrganismo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao longo da história os microrganismos buscam fonte de alimentos e condições favoráveis para sobreviver nos diferentes tipos ambiente que existem, desenvolvendo e a multiplicando-se em prol de suas futuras linhagens (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005). Como são dependentes das condições de temperatura, pressão e a presença de nutrientes no meio, evolutivamente, alguns microrganismos se adaptaram em situações de parasitagem, onde podem viver retirando nutrientes de um outro organismo vivo, normalmente causando-lhe algum dano (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005).

Diante desta situação, os organismos vivos adquirem mecanismos de defesa contra os microrganismos danosos, utilizando moléculas com poder biocida seletivo (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005). Estas moléculas são utilizadas na medicina como antibióticos seletivos contra alguns determinados microrganismos, porém, em muitos casos, com pouco cuidado e sem seguir as orientações médicas. Neste cenário, microrganismos, como bactérias e fungos, adquirem resistência a antibióticos e preocupam a saúde humana e animal (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Com isso, novas rotas de ação antimicrobiana são necessárias para combater os microrganismos patógenos (DEPNER et al, 2015; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013).

O cobre, atualmente, possui diversas aplicações tecnológicas, em destaque a utilização contra *biofouling* e como agente antimicrobiano (DEPNER et al, 2015; DEPNER et al, 2016; GRASS, RENSING, SOLIOZ, 2011; <sup>1</sup>INSTITUTE COPPER ALLIANCE, 2015; VINCENT et al, 2018). Desta forma, com o uso da nanotecnologia, procura-se otimizar a utilização de matéria prima metálica de forma que uma propriedade físico-química seja aumentada, principalmente em uma interação de entre superfícies (PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006).

Nesta seção serão apresentadas as teorias utilizadas como base fundamental dos conceitos utilizados neste trabalho.

#### 3.1 NANOTECNOLOGIA

Nanociência é o estudo de partículas em nível atômico ou molecular com escala métrica abaixo de 100 nm. Nanotecnologia é a manipulação e formação de material nanoparticulado para uma aplicação pré-determinada. A obtenção deste material pode ser realizada por via seca ou úmida, metabólica, química ou por algum

processo físico para diminuição de tamanho (PRADEEP, 2007). Nanopartículas possuem, por exemplo, propriedades óticas, elétricas, catalíticas, magnéticas, atividade biológica, físicas, químicas, e entre outras, diferentes de suas propriedades em macroescala (<sup>1,2</sup>AZAM et al, 2012; USMAN et al, 2013).

Desta forma, com o uso da nanotecnologia, é possível produzir, manipular e caracterizar diferentes metais, e. g. o cobre, em nanoescala, permitindo o estudo de diferentes estruturas para aplicações específicas (PRADEEP, 2007).

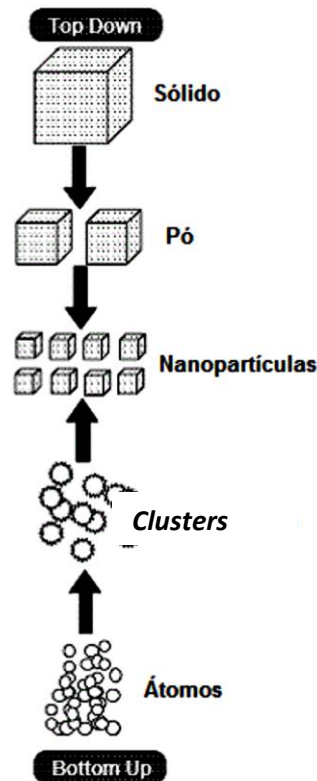
### 3.1.1 Síntese de nanoestruturas com base metálica

As nanopartículas metálicas são agregados de um material metálico em escala nanométrica, podendo ser esferas, bastões, fibras, filmes finos e etc., apresentando propriedades físico-químicas diferentes do que as apresentadas em macroescala (OTUBO, 2009). Alguns exemplos de alterações de propriedades são:

- a) A diminuição dos estados eletrônicos numa partícula metálica, sendo essa um intermediário ao modelo de bandas de sólidos estendidos e, também, aos níveis discretos de energia dos orbitais moleculares, provendo uma propriedade eletrônica característica ao seu tamanho e morfologia;
- b) O aumento da área superficial em relação ao seu volume confere propriedades físico-química características a escala nanométrica, como a catálise, repelência, atividade antimicrobiana, etc.

Há muitos métodos de sintetizar uma nanopartícula, delimitando-os em duas vertentes, a *top down* e a *bottom up*, esquematizados na Figura 1. Respectivamente, a primeira trata-se de processos majoritariamente físicos para a diminuição das partículas, como a moagem, têmpera e fotolitografia, decomposição térmica, irradiação, difusão, etc., sendo operações exaustivas e energéticas. Em contrapartida, a segunda envolve reações químicas para gerar o crescimento de partículas a partir de *clusters*, podendo acontecer, principalmente, por coprecipitação por redução química, fotoquímica ou induzida por radiação, processo sol-gel, reações de microemulsões com micelas, dendrímeros ou outro agente surfactante e processos hidrotérmicos e solvotérmicos (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; SERGEEV, 2006).

Figura 1 – Esquema dos métodos *top down* e *bottom up* na obtenção de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de CONSOLINI, 2015

Desta forma, o método de síntese de nanopartículas metálicas utilizada neste trabalho é descrito nas subseções a seguir.

### 3.1.2 Síntese de nanopartículas metálicas por coprecipitação

A coprecipitação pode ser induzida por redução química em meio aquoso ou não aquoso, por redução eletroquímica, por redução assistida por radiação e por decomposição de precursores metalorgânicos. Além disso, partículas de derivados metálicos podem ser obtidas com a precipitação de óxidos em solução aquosa ou não aquosa, com a coprecipitação de metais calcogenados e, por fim, coprecipitação assistida por micro-ondas ou ultrassom (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006).

Dentre todos os métodos citados para a obtenção de nanopartículas metálicas, o mais utilizado é a redução química, utilizado no estudo de caso deste trabalho, tratando-se de um processo simples e de baixo custo, promovendo um bom controle de tamanho de partículas e a distribuição do mesmo pela otimização

dos parâmetros experimentais, ou seja, modelagem da relação molar do agente estabilizador com o sal precursor do metal desejado e, também, da relação molar do agente redutor com o sal precursor do metal desejado (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006). Este método de obtenção de nanopartículas metálicas por redução química normalmente acontece em meio aquoso com um agente redutor solúvel neste solvente (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

A coprecipitação de nanopartículas metálicas apresenta as seguintes características (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004):

- a) O produtos, formados por condições de supersaturação, são espécies pouco solúveis formados por reações de precipitação;
- b) A nucleação é o principal fator de controle deste modelo de síntese, promovendo a formação de pequenas partículas;
- c) O controle do tamanho, da morfologia e das propriedades que o produto podem apresentar dependem de processos secundários, como o efeito da agregação de partículas e o do *Ostwald ripening*;
- d) As condições de supersaturação necessárias para induzir a precipitação são geralmente o resultado de um reação química.

Desta forma, a taxa de adição de reagentes e velocidade de agitação do sistemas devem ser consideradas para o controle do tamanho das partículas, bem como sua morfologia e distribuição de tamanho de partículas (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; SERGEEV, 2006).

De maneira geral, a coprecipitação pode ser descrita com a reação de formação de um eletrólito,  $A_xB_y$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004), como demonstra a Equação 1:



1

Considerando a reação demonstrada na Equação 1, a relação de equilíbrio entre o produto e seus reagentes é expressa pela constante de solubilidade do produto,  $K_{sp}$ , onde  $a_A$  e  $a_B$  são as atividades do cátion e do ânion, respectivamente,

em solução aquosa (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004), assim como descreve a Equação 2.

$$K_{sp} = (a_A)^x (a_B)^y \quad \text{Equação 2}$$

A precipitação pode ser induzida por vários métodos, além da simples reação de adição ou troca, como redução química, fotorredução, oxidação, hidrólise e manutenção dos parâmetros de solubilidade, principalmente com a alteração da temperatura e concentração do material (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; SERGEEV, 2006). Desta forma, diferente de um sistema binário, a coprecipitação torna-se muito mais complexa devido a presença de múltiplas espécies, as quais interagem entre si e precipitam simultaneamente (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

Assim como já descrito, o processo de nucleação e crescimento são determinantes no tamanho e morfologia das partículas no processo de reações de precipitação, onde numerosos pequenos cristais se formam e tendem a se agregar rapidamente para formarem partículas maiores e mais termodinamicamente estáveis (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

Desta forma são descritos os principais efeitos de controle na síntese de nanopartículas por coprecipitação nos subtópicos a seguir:

### 3.1.2.1 Nucleação

O controle do processo de precipitação passa, fundamentalmente, pelo grau de supersaturação,  $S$ , dado pela Equação 3, ou simplificada por  $C$ , a concentração do soluto em supersaturação, e  $C_{eq}$ , a concentração do soluto em equilíbrio (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$S = \frac{a_A a_B}{K_{sp}} = \frac{C}{C_{eq}} \quad \text{Equação 3}$$

Definindo a diferença entre  $C$  e  $C_{eq}$  como a força motriz da precipitação,  $\Delta C = C - C_{eq}$ , pode-se definir um raio crítico de equilíbrio do tamanho de partícula+,  $R^*$ , no

início da nucleação em um sistema supersaturado (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004), demonstrado pela Equação 4.

$$R^* = \frac{\alpha}{\Delta C} \quad \text{Equação 4}$$

O termo  $\alpha$  é uma constante do raio de equilíbrio crítico de um sistema supersaturado dado pela Equação 5, a seguir, onde  $\sigma_{SL}$  é a tensão superficial da interface sólido-líquido,  $v$  é o volume da partícula,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura e  $S$  é a supersaturação. Os cristais formados com  $R > R^*$  continuarão a crescer, enquanto os cristais com  $R < R^*$  irão dissolver (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$\alpha = \left( \frac{2\sigma_{SL}}{kT \ln S} \right) v C_{\infty} \quad \text{Equação 5}$$

Desta forma, a energia necessária para a formação de clusters,  $\Delta G^*$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004), é definida pela Equação 6:

$$\Delta G^* = \frac{4\pi\sigma_{SL}R^{*2}}{3} = \frac{16\pi\sigma_{SL}^3v^2}{3k^2T^2 \ln^2 S} \quad \text{Equação 6}$$

Portanto, para condições estacionárias, a taxa da nucleação homogênea,  $R_N$ , é dada pela Equação 7, onde  $N$  é o número de núcleos formados por unidade de tempo,  $t$ , por volume,  $V$ , e um fator pré-exponencial,  $A$ , o qual pode variar de 1025 a 1056 s<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>, dependendo do soluto (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$R_N = \left( \frac{dN}{dt} \right) \frac{1}{V} = A \exp \left[ \frac{-(\Delta G^*)}{kT} \right] \quad \text{Equação 7}$$

Por fim, unindo a Equação 6 e a Equação 7, tem-se a taxa de nucleação homogênea,  $R_N$ , como uma função exponencial dependente do grau de supersaturação,  $S$ , sendo esta insignificante até que o sistema alcance um grau de



supersaturação crítico,  $S^*$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004), demonstrado na Equação 8.

$$R_N = A \exp\left(\frac{-16\pi\sigma_S L^3 v^2}{3k^3 T^3 \ln^2 S}\right) \quad \text{Equação 8}$$

### 3.1.2.2 Crescimento de partícula

Além de ser tão complicado quanto o processo de nucleação, o crescimento das partículas é tão dependente da difusão do soluto, sendo este o limitante majoritário, quanto das reações químicas entre os componentes (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006). Desta forma, os fatores de maior interferência no crescimento de partículas são os gradientes de concentração e temperatura no sistema, variando a taxa de crescimento de partícula conforme novas espécies vão sendo adicionadas ao sistema, modificando as condições de contorno de cada núcleo formado na dispersão (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

Assim, a taxa de crescimento de partícula, por exemplo um núcleo de um soluto *bulk* sobre a superfície de um pequeno cristal do mesmo soluto, é dada pela Equação 9, onde  $r$  é o raio do pequeno cristal,  $t$  é o tempo,  $D$  é a difusividade do núcleo,  $\Omega$  é o volume molar e  $\delta$  é a espessura da camada onde ocorre a mudança de concentração do soluto *bulk*,  $C_b$ , para a concentração de soluto dos pequenos cristais,  $C_i$ , agregando-os a suas superfícies (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$\frac{dr}{dt} = D\Omega \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r}\right) (C_b - C_i) \quad \text{Equação 9}$$

A relação entre a concentração de núcleos do soluto *bulk* e o tamanho dos cristais do mesmo soluto,  $C_e$ , é estabelecida pela equação de Gibbs-Thomson, representada pela Equação 10, onde  $\gamma$  é a tensão superficial,  $R_G$  é constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura e  $C_\infty$  é a constante (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$C_e(r) \cong C_\infty \left( \frac{1+2\Omega\gamma}{R_G T R} \right) \quad \text{Equação 10}$$

Por fim, a Equação 11 dá a relação entre a taxa de crescimento do tamanho de partícula,  $G$ , e a relação de supersaturação do sistema,  $S$ , onde  $k_G$  é a constante da taxa de crescimento e  $g$  é a ordem de crescimento do tamanho de partícula (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$G = \frac{dL}{dt} = k_G S^g \quad \text{Equação 11}$$

### 3.1.2.3 Efeito Ostwald ripening

O efeito *Ostwald ripening* em solúé o fenômeno onde as partículas de menor tamanho são ressolubilizadas e redepositadas sobre a superfície de partículas de maior tamanho no processo de crescimento de partículas (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004). Primeiramente, foi observado a dissolução de pequenos cristais e partículas dispersas em um sistema coloidal e consequente re deposição em uma partícula de maior tamanho (OSTWALD, 1896). Em seguida, um modelo matemático deste fenômeno foi descrito, em 1961, por Lifshitz e Slyozov, e, independentemente, por Wagner, hoje conhecido como teoria LSW (LIFSHITZ, SLYOZOV, 1961 apud CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; WAGNER, 1961 apud CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

Os princípios da teoria LSW são resumidos nas etapas a seguir:

- a) Para um processo de difusão controlada, demonstrado pela Equação 12, o raio médio das partículas maior tamanho,  $\bar{r}$ , em função do tempo,  $t$ , onde  $K$  é a taxa em que ocorre o efeito *Ostwald ripening*, a qual é dada por  $4\alpha D/9$ , e  $D$  é a difusão dos pequenos cristais sobre o limite das partículas maiores, sendo o tamanho da partícula proporcional a raiz cúbica do tempo e dependente da supersaturação do sistema,  $\alpha$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$\bar{r}(t) = \sqrt[3]{Kt} \quad \text{Equação 12}$$

- b) Durante o estado de equilíbrio do efeito de *Ostwald ripening*, demonstrado pela Equação 13, a quantidade de núcleos formados,  $N$ , decai, onde  $Q_0$  é o total de partículas inicial na supersaturação, sendo que o número de núcleos decresce durante o efeito de *Ostwald ripening* conforme o passar tempo,  $t^1$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$N(t) = \frac{0,22Q_0}{\bar{R}(t)^3} = \frac{0,22}{2D\alpha t} \quad \text{Equação 13}$$

- c) A distribuição do tamanho de partículas,  $f(R,t)$ , é dada pela Equação 14, onde  $\rho \equiv R/\bar{R}(t)$  e  $\rho_0(\rho)$  é uma função da dimensão absoluta das partículas grandes,  $\rho$ , e independente do tempo (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

$$f(R, t) = \left[ \frac{N(t)}{\bar{R}(t)} \right] \rho_0(\rho(t)) \quad \text{Equação 14}$$

Desta forma, para produzir nanopartículas, a taxa de nucleação deve ser alta, controlando o crescimento de partícula, mantendo o material produzido na escala nanométrica. Por isso, devido à termodinâmica, a qual favorece a minimização da razão entre a área superficial e o volume, a aglomeração de partículas menores para a formação de um aglomerado é inevitável na ausência de um agente estabilizador, podendo ocorrer a qualquer momento durante a síntese (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006).

Existem algumas formas de realizar esta estabilização das nanopartículas, sendo duas delas:

- a) Repulsão estérica entre partículas causada por ligantes que recobrem a sua superfície, como surfactantes, polímeros e outros compostos orgânicos (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006);

- b) Repulsões eletrostáticas causadas por forças de Van Der Waals resultantes adsorção química a espécies carregadas sobre a superfície das partículas, podendo ser  $H^+$  ou  $OH^-$  (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006).

### 3.1.3 Química da produção de nanopartículas metálicas por coprecipitação

O processo de precipitação de metais em solução aquosa ou não aquosa depende, majoritariamente, da redução do cátion metálico, obtido de um sal conjugado, onde os agentes redutores mais utilizados são o gás hidrogênio ( $H_2$ ), o borohidreto solvatado ( $ABH_4$ ), sendo A um metal alcalino, o hidrato de hidrazina ( $N_2H_2.H_2O$ ) e dicloridrato de hidrazina ( $N_2H_2.2HCl$ ) (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

Desta forma, as respectivas reações de redução de um metal de transição (M) e oxidação de um agente redutor (X) (ATKINS, JONES, 2012) são descritas na Equação 15 e na Equação 16 a seguir:



15



16

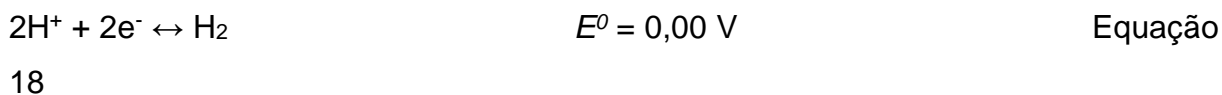
Considerando a equação de Nerst, descrita na Equação 17, dada pela variação da energia livre,  $\Delta G$ , o número de elétrons envolvidos na reação,  $n$ , a constante de Faraday,  $F$ , e a variação do potencial elétrico entre as espécies envolvidas,  $\Delta E$  (ATKINS, JONES, 2012).

$$\Delta G = -n.F.\Delta E \quad \text{Equação}$$

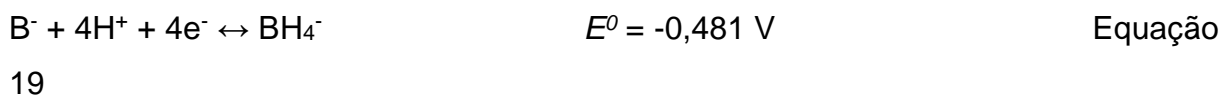
17

Para que a transferência de elétrons ocorra, a variação de energia livre,  $\Delta G$ , precisa ser termodinamicamente favorável. De forma a estabelecer uma convenção, é considerado o favorecimento das reações de óxido-redução a partir do potencial do eletrodo padrão,  $E^0$ , o qual corresponde a uma meia reação eletroquímica. Assim, por definição, os valores de  $E^0$  são declarados a partir do  $H_2$ , ou seja, dá-se o

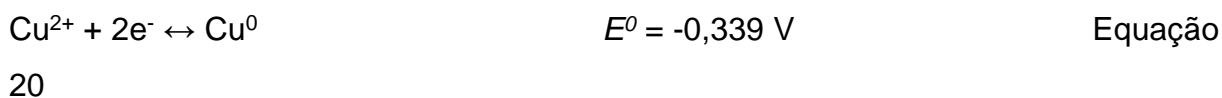
valor para a meia reação de óxido-redução do gás hidrogênio, em condições padrão de temperatura e pressão (*Standard Temperature and Pressure – STP*) (ATKINS, JONES, 2012), pela Equação 18:



A meia reação eletroquímica e o potencial de eletrodo padrão,  $E^0$ , do borohidreto são descrito na Equação 19. No entanto, os íons de borohidreto devem ser utilizados com critério, pois podem reduzir alguns cátions a boretos metálicos, principalmente em meio aquoso (ATKINS, JONES, 2012; CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).



Portanto, em teoria, qualquer metal que possua  $E^0$  mais positivo que  $-0,481 \text{ V}$  é termodinamicamente propício a ser reduzido em condições ambientes, onde exista excesso do agente redutor e controle de pH (ATKINS, JONES, 2012; CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004). Desta forma, tendo o íon cúprico,  $\text{Cu}^{2+}$ , utilizado neste trabalho, um  $E^0$  com valor de  $-0,339 \text{ V}$  tem-se uma reação de redução química termodinamicamente favorável (ATKINS, JONES, 2012), conforme descrito na Equação 20.



Assim, utilizando o inverso da meia reação descrita na Equação 19 e dobrando a meia reação descrita na Equação 20, tem-se a reação completa da redução química do íon cúprico a cobre fundamental (metálico), descrita pela Equação 21 (ATKINS, JONES, 2012).



No entanto, deve ser controlada a formação de partículas de diâmetros muito grandes, favorecendo a nucleação em relação ao crescimento das partículas. Para isso são utilizados agentes estabilizadores que se ligam as superfícies das partículas e conferem propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas as mesmas, impedindo o aumentar do seu diâmetro através do efeito de crescimento de partícula, repelindo umas às outras por efeito eletrostáticos (ATKINS, JONES, 2012). Os agentes estabilizadores podem ser de diferentes tipos, promovendo a estabilização das partículas além de participar da reação como agente redutor, como surfactantes contendo nitrogênio (N) ou enxofre (S), tióis, sais de nitratos e polímeros contendo grupos funcionais (ATKINS, JONES, 2012; CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004).

#### 3.1.4 Componentes do sistema de produção de partículas metálicas

De maneira geral, as nanopartículas metálicas podem ser preparadas dispersas na presença de polímeros, onde a síntese pode acontecer, principalmente, via decomposição térmica, redução termo e sono-química, deposição solvotérmica, ablação à laser, radiação induzida, técnicas de microemulsão, técnicas de agentes de revestimento e redução química do sal conjugado do metal (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013), utilizando atmosfera inerte de gás nitrogênio ( $N_2$ ) para o controle da oxidação do cobre durante a redução química (USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013) e, também um agente antioxidante para manutenção da condição reduzida da nanopartícula metálica (USMAN et al, 2012; USMAN et al, 2013).

Para a produção de nanoestruturas a base de cobre neste trabalho, utilizando uma rota de síntese química em meio aquoso, as nanopartículas de cobre metálico são formadas a partir de uma reação de redução química do sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) com borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ ), sendo, respectivamente, o sal precursor do metal e o agente redutor, obtendo as nanopartículas de cobre metálico pelo processo de precipitação química (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007). Um agente coloidal é utilizado para estabilizar as nanopartículas, formando estruturas do tipo *core-shell*, onde um ou mais núcleos metálicos são revestidos e estabilizados por moléculas poliméricas ou surfactantes circundantes, ou do tipo cápsula matricial, onde pequenos núcleos são formados

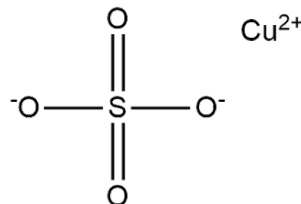
dispersos em uma matriz polimérica (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; PRADEEP, 2007; SERGEEV, 2006).

Para manter a estabilidade da estrutura em escala nanométrica, neste trabalho foram utilizados dois biopolímeros e um surfactante, sendo a carboximetilcelulose (CMC) e a quitosana, e o cloreto de cetilpiridínio (CCP), respectivamente, além da utilização do ácido ascórbico para diminuir a oxidação do material metálico. Todos os componentes do sistema serão descritos nas subseções a seguir.

#### 3.1.4.1 Sulfato de cobre

O sulfato de cobre, também conhecido como sulfato cúprico, é um composto químico inorgânico de fórmula  $\text{CuSO}_4$ , demonstrada pela Figura 2. Este sal inodoro, sensível ao ar e muito solúvel na água, existe em diferentes graus de hidratação, onde, em sua forma anidra, apresenta coloração cinza opaca, enquanto que, em sua forma penta hidratada, apresenta uma coloração azul brilhante (ATKINS, JONES, 2012; MERCK, 1960).

Figura 2 – Estrutura da molécula de sulfato de cobre.



Fonte: Adaptado de Atkins, Jones, 2012.

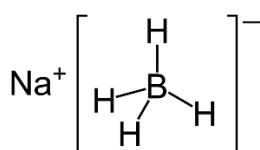
O sulfato pode ser utilizado na indústria química, indústria têxtil, na indústria de tintas, revestimentos e galvanoplastia, na indústria de baterias, na indústria farmacêutica, na indústria madeireira, indústria petrolífera, na indústria de borracha, na indústria de aços, entre outras aplicações (<sup>12</sup>INSTITUTE COPPER ALLIANCE, 2015).

Além disso, o sulfato de cobre possui aplicações na indústria agropecuária, podendo ser utilizado como um agente biocida contra fungos, bactérias e parasitas, como herbicida na agricultura e na aquicultura, sendo alvo de aplicação em diversos campos de aplicação para inibição ou diminuição da contaminação biológica (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993).

### 3.1.4.2 Borohidreto de sódio

O borohidreto de sódio, também conhecido como tetrahidroborato de sódio, é um composto químico inorgânico com fórmula  $\text{NaBH}_4$ , demonstrado pela Figura 3. Este sal de coloração branca opaca, normalmente encontrada como um pó, é solúvel em álcoois, alguns éteres e em água, mesmo que ocorra a sua hidrólise lentamente (BANFI et al, 2004).

Figura 3 – Estrutura da molécula de borohidreto de sódio.



Fonte: Adaptado de Atkins, Jones 2012.

Este agente redutor tem ampla aplicação, tanto em escala laboratorial quanto industrial, onde a sua principal utilização é na produção de ditionato de sódio, material utilizado no branqueamento da polpa de madeiras e na indústria de tingimento (ATKINS, JONES, 2012; BANFI et al, 2004). Além disso, é um bom redutor de aldeídos e acetonas a seus respectivos álcoois, sendo essa uma reação na produção de diversos antibióticos (BANFI et al, 2004). Por fim, vem sendo cogitado como fonte de hidrogênio a partir de sua oxidação na água em condições específicas (ATKINS, JONES, 2012; BANFI et al, 2004).

### 3.1.4.3 Carboximetilcelulose (CMC)

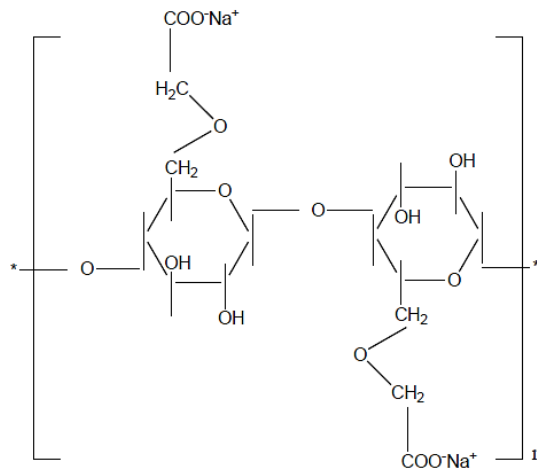
A celulose é o principal componente do esqueleto químico da madeira, sendo o biopolímero mais abundante que existe na natureza, sendo um polímero de glicoses ligadas por ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (ALBERTS et al, 2017; SOLOMONS, FRYHLE, 2002; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013). Ela pode ser utilizada em campos onde exige-se a biocompatibilidade entre os materiais, além de sua biodegradabilidade, e também pode ser utilizada como base de aplicação da nanoestrutura.

No entanto, a celulose é insolúvel em água, o que impossibilita a sua utilização como agente estabilizante durante a síntese (ZHONG et al, 2013). Para isso, é realizada a acidificação da celulose pela reação de Williamson, onde grupos



hidroxilas são parcialmente substituídos por grupos carboxilas, o que atribui a celulose modificada o nome de carboximetilcelulose (CMC), tendo a sua estrutura demonstrada pela Figura 4 – Estrutura da molécula biopolimérica da carboximetilcelulose. Figura 4, a qual é muito solúvel em água, tanto a frio quanto a quente, devido a facilidade da hidratação da molécula (SOLOMONS, FRYHLE, 2002).

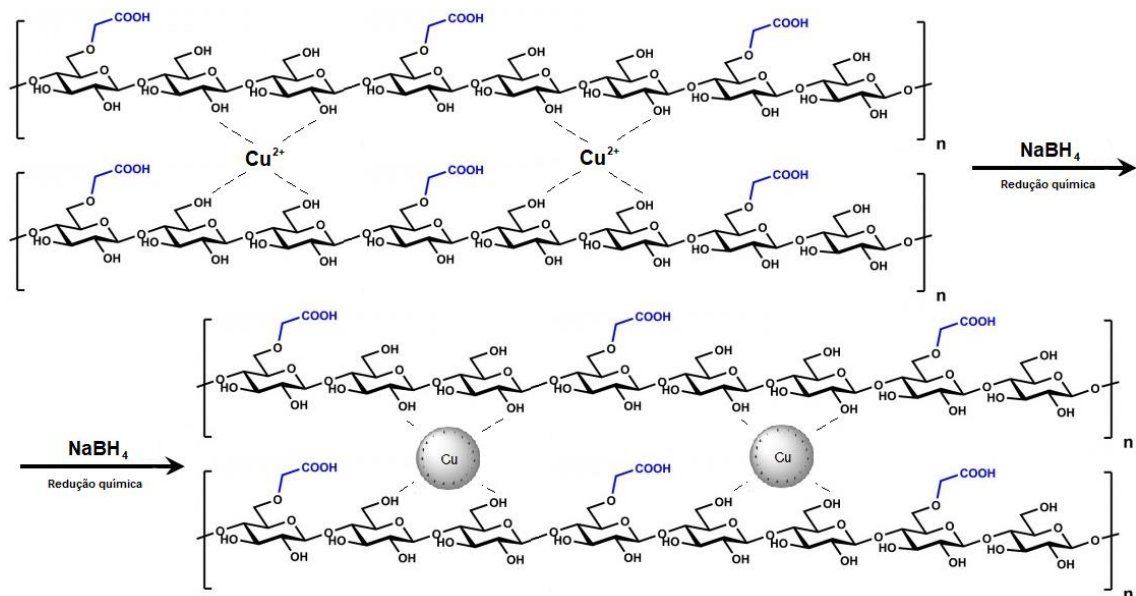
Figura 4 – Estrutura da molécula biopolimérica da carboximetilcelulose.



Fonte: Retirado de Rani et al, 2014.

A utilização do CMC como agente de revestimento promove a estruturação das nanopartículas de cobre em uma cápsula matricial pela interação das hidroxilas e carboxilas disponíveis das estruturas poliméricas no sistema, formando uma rede de estabilização dos núcleos por efeitos de repulsão das forças de Van der Waals (ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015), conforme demonstra a Figura 5. No entanto, a presença das hidroxilas próximas ao cobre pode promover a oxidação do metal, o que pode diminuir o seu efeito antimicrobiano (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; USMAN et al, 2012; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015).

Figura 5 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por CMC.



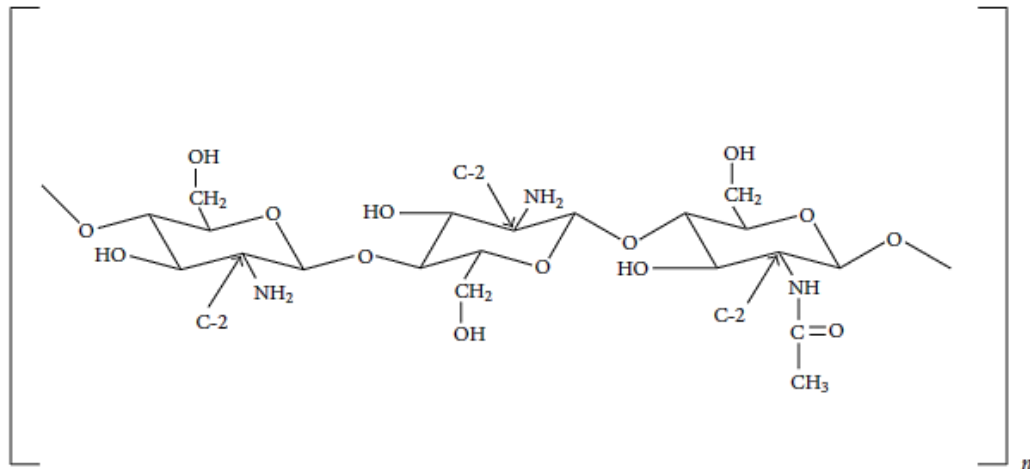
Fonte: Adaptado de USMAN et al, 2012.

#### 3.1.4.4 Quitosana

A quitina é um polissacarídeo de acetilglicosamina presente naturalmente em vários organismos, onde é o principal componente da parede celular de vários fungos, do exoesqueleto dos artrópodes, na rádula dos moluscos e no bico dos cefalópodes, sendo o segundo biopolímero mais abundante que existe na natureza (ALBERTS et al, 2017; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Analogamente a celulose, a quitina é insolúvel, desta forma é tratada quimicamente para aumentar a sua solubilidade, onde é realizada a desacetilação parcial do grupo amino ligado ao monômero sacarídeo do biopolímero por um processo de alcalinização sob altas temperaturas, formando a quitosana (SOLOMONS, FRYHLE, 2002). A quitosana é um biopolímero biocompatível, biodegradável e não tóxico, tendo a sua estrutura demonstrada na Figura 6, com várias aplicações nas indústrias farmacêuticas e biomédicas, transformando este polímero em um bom objeto de estudo nas pesquisas e aplicações da saúde humana e animal (USMAN et al, 2013).

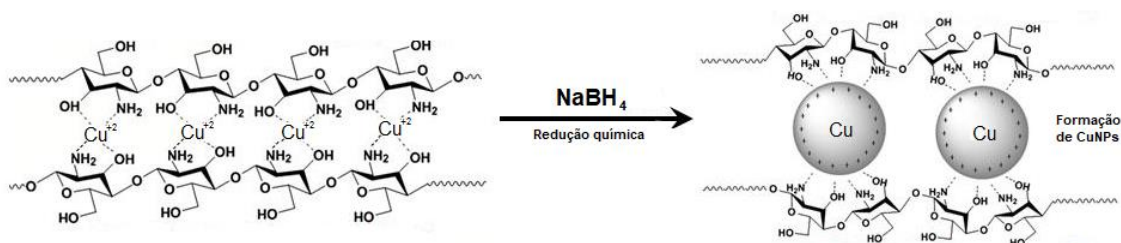
Figura 6 – Estrutura da molécula biopolimérica da quitosana.



Fonte: Retirado de CHATTOPADHYAY, INAMDAR, 2010.

A utilização da quitosana como agente de revestimento promove a estruturação das nanopartículas de cobre em uma cápsula matricial pela interação das hidroxilas e aminas disponíveis das estruturas poliméricas no sistema, formando uma rede de estabilização dos núcleos por efeitos de repulsão das forças de Van der Waals (ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015) conforme demonstra a Figura 7. No entanto, a presença das hidroxilas próximas ao cobre pode promover a oxidação do metal, o que pode diminuir o seu efeito antimicrobiano (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; USMAN et al, 2012; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015).

Figura 7 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por quitosana.



Fonte: Adaptado de USMAN et al, 2012.

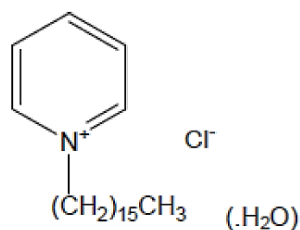
### 3.1.4.5 Cloreto de cetilpiridínio (CCP)

Os compostos amoníacos quaternários são substâncias catiônicas estáveis, solúveis em água e com atividade antimicrobiana, a qual está relacionada a carga

positiva em uma das extremidades da molécula, tendo características estruturais semelhantes ao cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ESTRELA et al, 2012). A propriedade catiônica da molécula permite que a mesma ancore aos compostos aniônicos da superfície bacteriana, corrompendo a integridade da membrana citoplasmática celular. Uma vez que a membrana foi danificada, é possível verificar algumas alterações ao sistema bacteriano avaliado, como a modificação da sua permeabilidade. A inativação das proteínas de membrana podem causar o desequilíbrio metabólico e, conseqüentemente, a desnaturação proteica. (ALBERTS et al, 2017; ESTRELA et al, 2012; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Desta forma, compostos detergentes com propriedades catiônicas são utilizados como agentes de superfície, otimizando sua aplicação com a atividade antimicrobiana, como no caso do cloreto de 1-hexadecilpiridônio, também conhecido como cloreto de cetilpiridínio (CCP), uma molécula composta por um anel heterocíclico com um amônio quaternário ligado a uma cadeia linear insaturada de dezesseis carbonos (ESTRELA et al, 2012), demonstrado pela Figura 8.

Figura 8 – Estrutura da molécula surfactante do cloreto cetilpiridínio.



Fonte: Retirado de SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY, 2015.

A utilização do CCP como agente de revestimento promove a estruturação das nanopartículas de cobre em uma estrutura *core-shell* pela interação das extremidade catiônica 0 disponíveis das estruturas poliméricas no sistema, formando uma rede de estabilização dos núcleos por efeitos de repulsão das forças de Van der Waals (ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015) conforme demonstra a Figura 9. No entanto, a presença dos íons cloretos solvatados próximos ao cobre pode promover a oxidação do metal, o que pode diminuir o seu efeito antimicrobiano (CUSHING, KOLESNICHENKO, O'CONNOR, 2004; USMAN et al, 2012; USMAN et al, 2013; ZHONG et al, 2013; ZHONG, 2015).

Figura 9 – Representação esquemática da formação de nanopartículas estabilizadas por CCP.

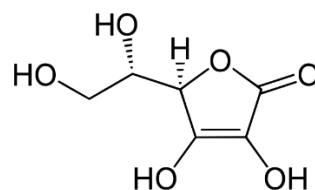


Fonte: Autoria própria, 2020.

#### 3.1.4.6 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um composto orgânico de fórmula  $C_6H_8O_6$ , demonstrado pela Figura 10. Este ácido é um sólido cristalino de coloração branca brilhante, inodoro, hidrossolúvel e pouco solúvel em solventes orgânicos, como álcoois (ATKINS, JONES, 2012; MARZZOCO, TORRES, 1999; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Figura 10 – Estrutura da molécula do ácido ascórbico.



Fonte: Retirado de Tortora, Funke, Case, 2012.

O ácido ascórbico é uma molécula de necessária em várias reações bioquímicas no metabolismo celular. A sua principal função é a hidroxilação do colágeno, a proteína fibrilar que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Além disso, é um poderoso antioxidante, utilizado na transformação de espécies reativas de oxigênio em formas inertes. Além disso, também é utilizado na síntese de algumas moléculas, como hormônios ou neurotransmissores (ALBERTS et al, 2017; MARZZOCO, TORRES, 1999; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

### 3.2 PROPRIEDADES DO COBRE

O cobre é um metal de coloração avermelhada, dúctil, maleável, de alta dureza, de alto ponto de fusão, caráter não-magnético e pouco suscetível a corrosão. É um forte condutor elétrico (tem baixa resistência a passagem de corrente elétrica em seu interior) e, também, um forte condutor térmico, sendo que ambas as propriedades são possíveis devido a existência de elétrons livres em suas ligações do tipo metálica (ATKINS, JONES, 2012; SIMON, 1992).

Algumas informações físicas e químicas estão na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1 – Propriedades gerais do Cobre (Cu).

Número atômico	29
Massa atômica	63,546 u
Raio atômico	$2,551 \times 10^{-10}$ m
Densidade a 25°C	$8,94 \times 10^3$ kg.m <sup>-3</sup>
Condutividade térmica	394 W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
Distribuição eletrônica	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Formas iônicas	Cu <sup>+</sup> ; Cu <sup>2+</sup>
Primeira energia de ionização	743,5 kJ.mol <sup>-1</sup>
Segunda energia de ionização	1946 kJ.mol <sup>-1</sup>
Estrutura Cristalina	CFC - Cúbica de face centrada

Fonte: adaptado de ATKINS, JONES, 2012; SIMON, 1992.

O cobre é um elemento químico altamente utilizado em áreas e aplicações estratégicas devido a suas mais variadas propriedades físico-químicas, dando um amplo campo de pesquisa e desenvolvimento de processos que beneficiem ou facilitem a sociedade, a indústria ou dos mais diversos campos de aplicação do metal (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2012).

#### 3.2.1 Aplicações tecnológicas do cobre

A diversidade de aplicações do cobre decorrem de suas propriedades físicas e químicas, condutividade elétrica, condutividade térmica, dureza, maleabilidade,

ductilidade e baixa taxa de oxidação (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2012).

Atualmente, com o conhecimento das reservas de cobre, o investimento nas aplicações tecnológicas vem sendo direcionado nas áreas:

- a) Produção de ligas metálicas (<sup>2,3,4</sup>INSTITUTE COPPER ALLIANCE, 2015);
- b) Instalações e motores elétricos (<sup>5,6,7,8,10,11</sup>INSTITUTE COPPER ALLIANCE, 2015);
- c) Prevenção do Biofouling (<sup>1</sup>INSTITUTE COPPER ALLIANCE, 2015);
- d) Aplicações antimicrobianas (DEPNER et al, 2015; DEPNER et al, 2016; GRASS, RENSING, SOLIOZ, 2011; VINCENT et al, 2018).

### 3.2.2 O cobre no sistema biológico

A capacidade de doar ou receber um elétron com facilidade é o que lhe compete as propriedades de condutividade, tanto elétrica quanto térmica, além das propriedades eletroquímicas empregadas nos sistemas biológicos, estando em sua forma oxidada,  $\text{Cu}^{2+}$ , ou em sua forma reduzida,  $\text{Cu}^+$  (DEPNER et al, 2015).

Atualmente, com a utilização desta características para o desenvolvimento de novas tecnologias, em escalas micro e nanométricas, trabalhos vêm sendo realizados, revestindo superfícies para conferir o efeito antimicrobiano a diferentes materiais (APPLEROT, et al, 2012; AZAM, et al, 2012; DEPNER, et al, 2015; ROY, et al, 2017; TAMAYO, et al, 2016; USMAN, et al, 2013; VINCENT, HARTEMANN, DEUSTCH, 2016; ZHONG, et al, 2013; ZHONG, et al, 2015).

Diversas áreas estratégicas demonstram a necessidade de novas maneiras de proteção contra a propagação de microrganismos resistentes, ou multirresistentes, a antibióticos (CRUZ et al, 2017), como os microrganismos patógenos da mastite bovina, a qual causa alto prejuízo a indústria leiteira (EMBRAPA, 2019).

A mastite bovina é uma doença que acarreta grandes perdas a indústria do leite, chegando a 17 % do leite produzido por um animal. Desta forma, para minimizar os danos ao gado bovino e a produção leiteira, é utilizado o tratamento com antibióticos, causando um prejuízo médio de 72,5 mil reais. Somando a perda por mortes e desvalorização de matrizes, de descarte e redução da produção leiteira, tem-se um valor de prejuízo aproximado de 280 mil reais (ACOSTA et al,

2016). Sendo a mastite uma doença multivetorial, existe a necessidade da produção de um agente antimicrobiano de amplo espectro de ação.

Os patógenos da mastite são de diferentes gêneros e espécies, variando de bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras (KIBEBEW, 2017), sendo:

- a) *Staphylococcus aureus*;
- b) *Streptococcus agalactiae*;
- c) *Escherichia coli*;
- d) *Pseudomonas aeruginosa*;
- e) *Candida albicans*.

Nas subseções a seguir serão descritas simplificada e as estruturas dos sistemas bacteriano e fúngico, bem como o metabolismo simplificado de cada microrganismo patógeno avaliado contra as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho.

### 3.2.2.1 Estrutura do sistema bacteriano

Bactérias são organismos simples e de estrutura unicelular. Por definição, são denominados procariontes, pois seu material genético não é envolto por uma membrana nuclear (ALBERTS et al, 2017; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). De acordo com a estrutura de sua parede celular, as bactérias podem ser classificadas entre gram-positivas e gram-negativas (ALBERTS et al, 2017; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A célula bacteriana é composta por estruturas que provêm sua estabilidade em determinados ambientes, permitem sua alimentação seletiva e sustentam a atividade bioquímica em seu interior, sendo as principais delas resumidas a seguir de acordo com Alberts e colaboradores (2017), Marzocco e Torres (2007), Tortora, Funke e Case (2012) e Trabulsi e Alterthum (2008):

- a) Membrana citoplasmática;
- b) Parede celular;
- c) Ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA);
- d) Citoplasma;
- e) Organelas.



Considerando estas estruturas bacterianas, os próximos itens descreverão os sistemas estudados neste trabalho.

#### 3.2.2.2 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos contagiosos causadores da mastite no gado leiteiro, e também um patógeno oportunista em humanos e outras espécies animais. Em bovinos, a *S. aureus* pode ser isolada do leite contaminado ou de pontos de infecção no corpo do animal. Acredita-se que o principal motivo da mastite seja a transmissão causada durante o processo de ordenha, podendo ocorrer, também, na manipulação do operador com o animal (MEKONNEN et al, 2018).

A *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva de metabolismo organotrófico majoritariamente aeróbio, podendo atuar de maneira anaeróbia facultativa, produzindo energia e poder redutor a partir da quebra da fonte de carbono, como a glicose, e por uma cadeia transporte de elétrons pela respiração aeróbia ou anaeróbia, ou também por fermentação na ausência de um aceptor final de elétrons extracelular, formando produtos como o ácido láctico, ácido acético, etanol e o formiato (LIEBEKE et al, 2011).

A patogenicidade da *S. aureus* varia de acordo com a seus fatores de virulência, o hospedeiro e o ambiente. Além disso, estudos comprovam que a existência de diferentes fenótipos e genótipos desta bactéria permite a sua melhor adaptação para sobreviver em ambientes hostis. Considerando a adesão celular como requisito crucial para o desenvolvimento da mastite, a doença pode ser causada pela *S. aureus* devido a abundância de fatores de virulência que permitem a contaminação, a colonização, a invasão do tecido, a toxonose e a defesa imunológica, evitando a interação de proteínas, enterotoxinas e polissacarídeos capsulares (ACOSTA et al, 2018).

#### 3.2.2.3 *Streptococcus agalactiae*

A *Streptococcus agalactiae* foi o principal microrganismo causador de mastite na era pré-antibiótico, mantendo-se como um importante causador desta doença em vários rebanhos, mesmo sendo uma bactéria de fácil eliminação. Estudos estimam

que a mastite causa perda anual do volume de leite produzido de até 10% devido a contaminação por *S. agalactiae* (KEEFE, 1997).

A *S. agalactiae* é uma bactéria gram-positiva de metabolismo organotrófico majoritariamente anaeróbio, podendo atuar de maneira aeróbia facultativa, produzindo energia e poder redutor através da quebra da fonte de carbono, como a glicose, formando produtos de fermentação, como o ácido lático, ácido acético, etanol e o formiato (MICKELSON, 1967; WILLENBORG, GOETHE, 2016).

A *S. agalactiae* tem a capacidade de aderir ao tecido mamário bovino, principalmente o tecido epitelial, obtendo condições ótimas de crescimento no micro ambiente encontrado no interior do úbere (KEEFE, 1997).

#### 3.2.2.4 *Escherichia coli*

Bactérias provenientes de coliformes fecais são uma frequente causa da mastite clínica, onde a contaminação é tem origem da *Escherichia coli* em 80% dos casos. A *E. coli* aparece na contaminação do úbere bovino, sendo um grave problema devido à sua prevalência e aos danos causado no tecido infectado, normalmente o úbere, podendo causar a diminuição ou a contaminação do leite produzido, ou até mesmo levar a morte do animal (ROUSSEL et al, 2017; SUOJALA, KAARTINEN, PYÖRÄLÄ, 2013).

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa de metabolismo organotrófico majoritariamente aeróbio, podendo atuar de maneira anaeróbia facultativa, produzindo energia e poder redutor através da quebra da fonte de carbono, como a glicose, e por uma cadeia transporte de elétrons pela respiração aeróbia ou anaeróbia, ou também por fermentação na ausência de um acceptor final de elétrons extracelular, formando produtos como o ácido lático, ácido acético, etanol e o formiato (SHIMIZU, 2012).

Os lipopolissacarídeos, componentes da parede de membrana das bactérias gram-negativas, são considerados o fator primário da virulência causada por estes microrganismos provenientes dos coliformes fecais bovinos, sendo responsáveis pelas reações patógenas causadoras da mastite pela *E. coli*. Durante a multiplicação e a morte celular, estes componentes de paredes são liberados no úbere, deixando sinais de inflamação no tecido infectado (SUOJALA, KAARTINEN, PYÖRÄLÄ, 2013).

### 3.2.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* pode ser encontrada na água, nas plantas, no solo ou na epiderme dos animais, incluindo os bovinos. Na natureza esta bactéria aparece na como um plâncton através da água, como biofilme ou como clusters de bactérias que compartilhem o mesmo fenótipo ou com propriedades químicas em comum (JENNY, KINGSBURY, 2018).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa de metabolismo organotrófico aeróbio, podendo atuar de maneira anaeróbia facultativa, não realizando rotas fermentativas, produzindo energia e poder redutor através da quebra da fonte de carbono, como a glicose, e por uma cadeia transporte de elétrons pela respiração aeróbia ou anaeróbia (JENNY, KINGSBURY, 2018; SCACCABAROZZI et al, 2015).

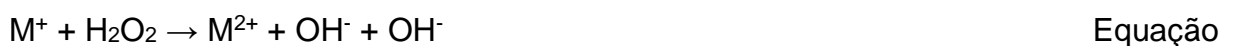
A *P. aeruginosa* pode causar infecções crônicas e agudas em diferentes espécies de mamíferos, inclusive os bovinos, devido a produção de vários fatores de virulência, como os flagelos, proteínas de adesão e proteínas extracelulares, ou metabólitos secundários com atividades proteolíticas e/ou citotóxicas, e. g. exotoxina A, elastase, piocianina e hemolisinas (SCACCABAROZZI et al, 2015).

### 3.2.2.6 *Metabolismo do cobre em bactérias*

O cobre é um micronutriente essencial como um cofator em muitas proteínas, participando de reações de óxido-redução e, em alguns casos, como estrutura de uma biomolécula (THURMAN, GERBA, 1989; ARGÜELLO et al, 2013). Como o metal pode participar de várias reações tóxicas as bactérias, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) pela reação de Fenton, demonstrada na Equação 22 e na Equação 23, e pelo ciclo reacional de Haber-Weiss, esquematizado com o conjunto da Equação 22, da Equação 23 e da Equação 24.



22



23



24

Segundo Aguiar e Ferraz (2007), o catalisador metálico, para o acontecimento de ambas as reações, pode ser o Fe ou o Cu, representados por M. O cobre promove uma reação três vezes mais rápida, em comparação com o Fe. No entanto, em ambiente aquoso necessita de agentes quelantes para sua estabilização na forma iônica  $\text{Cu}^+$ , a qual pode interferir na estabilização das ligações ferro-enxofre ([Fe-S]), impedindo o enovelamento correto das proteínas (HABER, WEISS, 1932; KEHRER, 2000; GAETKE, CHOW, 2003; ARGÜELLO et al, 2013).

Desta forma, o sistema bacteriano requer mecanismos de homeostase do cobre, que distribuam o cobre corretamente entre as cuproenzimas necessárias. Estes mecanismos regulam as quantidades do metal via transporte transmembranar com o auxílio de compartimentalização de íons, utilizando um agente quelante ou de uma biomolécula, sensível aos baixos níveis do metal, que envolva-o e estabilize-o frente as reações metabólicas (ARGÜELLO et al, 2012; ARGÜELLO et al, 2013).

A combinação de propriedades físico-químicas entre as enzimas e os íons de cobre promove a regulação do sistema bacteriano por metaloproteínas sensíveis a concentrações iônicas. A alta solubilidade do íon cúprico,  $\text{Cu}^{2+}$ , disponibiliza prontamente o cobre como fator óxido-redutor em meio biológico. Além disso, as características de alta polarização e geometria de coordenação determina a preferência da seleção do cobre a outros metais de transição (ARGÜELLO et al, 2012; ARGÜELLO et al, 2013). Ligações lineares e trigonais com bases fracas, como enxofre e nitrogênio (S e N), e ligações mais curtas com bases fortes, como o oxigênio (O), promovem mais estabilidade aos íons durante o transporte e a compartimentalização, apesar de necessitar de maior complexidade estrutural e especificidade dos sítios proteicos (BOAL, ROSENZWEIG, 2009; ARGÜELLO et al, 2012; ARGÜELLO et al, 2013).

Desta forma, a alta afinidade de ligação das enzimas de transporte aos íons cuprosos,  $\text{Cu}^+$ , bem como a falta de capacidade de chaperonas específicas retirá-los das enzimas ATPases, confere irreversibilidade ao transporte transmembranar. Portanto, o controle transcricional do sistema bacteriano é regulado pela modificação de concentração de enzimas transportadoras, facilitando a co-regulação de chaperonas e quelantes transportadores de metais (MA, JACOBSEN, GIEDROC, 2009).

O transporte transmembranar de  $\text{Cu}^+$  em sistema bacteriano acontece, majoritariamente, por proteínas ATPases do tipo P (RIDGE, et al, 2008; MONTES, et

al, 2012). Esta, sendo uma proteína politópica membranar, ou seja, acopla-se transversalmente a membrana celular, tem a responsabilidade de controlar os níveis de  $\text{Cu}^+$  citosólico pelo transporte unidirecional dos íons durante a hidrólise de ATP (RENSING, et al, 2000; ARGÜELLO et al, 2007; ARGÜELLO et al, 2013). O mecanismo de funcionamento enzimático da ATPase do tipo P é caracterizado pelo ciclo catalítico de Post-Albers, onde acontece a hidrólise do ATP e o transporte dos íons  $\text{Cu}^+$  (RAIMUNDA, et al, 2011; ARGÜELLO, et al, 2013), ou seja, essa transferência de substrato acontece com a troca de ligantes na interação proteína-proteína, onde os íons  $\text{Cu}^+$  dispersos no citoplasma alcançam os sítios das ATPases transmembranares após a entrega dos mesmos pelas chaperonas reguladoras sensitivas (GUERRERO, ARGÜELLO, 2008; GUERRERO, et al, 2009; RAIMUNDA, et al, 2011; ARGÜELLO, et al, 2013).

Menos eficiente, o sistema bicomponente homeostático de controle de  $\text{Cu}^+$  é regulado sob condições anaeróbias (OUTTEN, et al, 2001; RENSING, GRASS, 2003; YAMAMOTO, ISHIHAMA, 2005; GUDIPATY, et al, 2012; ARGÜELLO, et al, 2013). Trata-se de um canal membranar composto por um conjunto de quatro proteínas que controlam a quantidade de  $\text{Cu}^+$ . Três dessas proteínas ligam-se para estruturar um canal transmembranar. A quarta proteína desse sistema de transporte é responsável pela translocação dos íons  $\text{Cu}^+$  do meio para sítios específicos unidirecionalmente, sendo dependente do pH do meio, podendo alternar o fluxo de transporte em entrada ou saída de acordo com as condições de estresse (OUTTEN, et al, 2001; RENSING, GRASS, 2003; BAGAI, et al, 2007; SU, LONG, YU, 2010; ARGÜELLO, et al, 2013).

### 3.2.2.7 Toxicologia do cobre em bactérias

Sendo o cobre um microelemento essencial no metabolismo bacteriano (DEPNER, et al, 2015; VINCENT, et al, 2018), onde participa de reações proteicas como um cofator com alto potencial de redução, ou seja, aparecendo em suas formas iônicas  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , respectivamente, como um ácido fraco e um ácido forte (DUPONT, GRASS, RENSING, 2011; ATKINS, JONES, 2012).

Tratando de um sistema bacteriano aeróbico, a toxicidade é relacionada às propriedades redutoras do cobre, onde a facilidade de transferir elétrons do íon  $\text{Cu}^+$ , tornando-se  $\text{Cu}^{2+}$ , promove as reações de Fenton e Haber-Weiss, criando ROS responsáveis pela peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA

(GAETKE, CHOW, 2003; DUPONT, GRASS, RENSING, 2011; GRASS, RENSING, SOLIOZ, 2011; VINCENT, et al, 2016).

No entanto, em um sistema anaeróbio, o  $\text{Cu}^+$  compete com os íons ferrosos devido a sua alta afinidade com tiolatos, desestabilizando as ligações [Fe-S]. Desta forma, durante a biogênese é formado um ambiente ainda mais tóxico, comparado com as condições aeróbias (DUPONT, GRASS, RENSING, 2011).

Nestes metabolismos bacterianos, proteínas importantes como a enzima funcional na síntese de aminoácidos, a enzima com função específica de ligação de leucina na síntese proteica, a enzima funcional no ciclo do ácido tricarboxílico e a 6-fosfogluconato desidratase, enzima funcional na síntese da pentose fosfato e a síntese de pirimidina e aminoácidos de cadeias ramificadas, têm-se exemplos de rotas de danos letais causados pela interferência do  $\text{Cu}^+$  nas ligações [Fe-S] (MACOMBER, et al, 2009).

Entretanto, mesmo perante a estes efeitos biológicos em sistemas bacterianos anaeróbios, o mecanismo primário para efeito toxicológico da bactéria é o dano a membrana celular, pois o DNA bacteriano não apresenta maiores mutações quando exposto ao Fe (ESPIRITO SANTO, QUARANTA, GRASS, 2011). Além disso, o dano a membrana acontece por estresse oxidativo não enzimático. Consequentemente, ocorre a peroxidação lipídica, causando a quebra da parede e levando a morte celular (ESPÍRITO SANTO et al, 2010; HONG, et al, 2012; WARNES, CAVES, KEEVIL, 2012; MATHEWS et al, 2013).

#### 3.2.2.8 Estrutura do sistema fúngico

Os organismos eucarióticos compreendem as algas, os protozoários, os fungos e leveduras, as plantas e os animais. Diferente das bactérias, os fungos são microrganismos complexos de estrutura unicelular. Por definição, são chamados de eucariotos, pois seu material genético é envolto por uma membrana nuclear (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A célula fúngica é composta por estruturas que provêm sua estabilidade em determinados ambientes, permitem sua alimentação seletiva e sustentam a atividade bioquímica em seu interior, sendo as principais delas resumidas a seguir de acordo com Alberts e colaboradores (2017), Marzzoco e Torres (2007), Tortora, Funke e Case (2012) e Trabulsi e Alterthum (2008):

- a) Flagelos e cílios;
- b) Membrana citoplasmática;
- c) Parede celular;
- d) Ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA);
- e) Citoplasma;
- f) Ribossomos;
- g) Organelas.

#### 3.2.2.9 *Candida albicans*

Infecções cutâneas e de partes moles causadas por espécies de fungos, como as dermatofitoses e dermatomicoses, são bastante comuns. Aquelas causadas por espécies do gênero *Candida albicans* nas mamas das nutrizes tendem a ser manifestar como lesão eritematosa e pruriginosa no sulco inframamário, levando ao quadro conhecido por mastite. Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico normal, numa proporção de 47% na cavidade oral, 34% na região retal e 23% na cavidade vaginal, sem causar infecções aos seus hospedeiros, ainda que, por vezes, sejam detectadas em número elevado (OLIVEIRA et al, 2012).

A *C. albicans* é um fungo que tem a notável capacidade de crescer em distintas morfologias, como leveduras, hifas e pseudo-hifas, variando de acordo com as condições ambientais. Seu metabolismo é organotrófico aeróbio, produzindo energia e poder redutor através da quebra da fonte de carbono, como a glicose, e por uma cadeia transporte de elétrons pela respiração aeróbia (HAN, CANNON, VILLAS-BÔAS, 2011).

A capacidade de mudar rapidamente do crescimento de levedura para filamentosos em resposta a certas condições ambientais é considerada um fator de virulência crítico para esses fungos. A forma de levedura é importante para a disseminação através da corrente sanguínea e adere às superfícies endoteliais. As formas filamentosas, por outro lado, são mais adaptadas à invasão pelo tecido epitelial do hospedeiro, e também apresentam maior resistência à fagocitose devido à sua morfologia (HAN, CANNON, VILLAS-BÔAS, 2011).

### 3.2.2.9 Metabolismo do cobre em fungos

O estudo da homeostase fúngica do cobre foi caracterizada sobre o metabolismo da *S. cerevisiae*, o que facilitou a compreensão da aquisição e utilização do cobre por fungos (DING, et al, 2014). A parede celular fúngica é composta por um polissacarídeo denominado quitina, a qual reveste a célula, sustentando e protegendo a membrana plasmática. Esta membrana controla a entrada e a saída dos materiais para o interior da célula, e é composta por hidratos de carbono, lipídeos, proteínas e glicídeos. É impermeável ao cobre, ou seja, são necessários transportadores específicos capazes de atravessar a membrana (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Para isso, o  $\text{Cu}^{+2}$  do meio externo é reduzido a  $\text{Cu}^{+}$  por enzimas metaloredutases férricas e cúpricas, presentes na membrana plasmática, antes de ser absorvido pela célula. Assim, a quantidade de cobre extracelular vai determinar o tipo de transporte que ocorrerá para manter a homeostase (HASSETT, KOSMAN, 1995), variando entre:

- a) Homeostase de alta afinidade: Este sistema é composto por proteínas transportadoras da família receptores transportadores de cobre. Parte dessas proteínas são reguladas em resposta as altas concentrações de cobre no meio intracelular, localizadas na membrana plasmática, sendo responsáveis pela captura extracelular de cobre (PETRIS, 2004). Outra proteína transportadora está localizada no vacúolo, sendo responsável pelo armazenamento de cobre e ainda na importação do metal proveniente da membrana plasmática para o citoplasma celular, atuando na homeostase em situações de privação de sua concentração (REES, THIELE, 2004; REES, LEE, THIELE, 2008).
- b) Homeostase de baixa afinidade: Este sistema é composto por duas permeases. Quando o cobre encontra-se em altas concentrações no meio extracelular, o mesmo é importado para o meio intracelular pelas proteínas transportadoras. Uma vez captado, o cobre é transportado para compartimentos secretórios, mitocôndria ou para enzimas citosólicas, através de chaperonas específicas (KIM, NEVITT, THIELE, 2008). Existe uma chaperona citosólica que direciona o cobre para um transportador no complexo de Golgi. Por sua vez, uma enzima transloca o cobre para dentro



das vesículas, onde o metal é carregado para a mitocôndria em um complexo multicobre que contém a proteína ferroxidase (ARNESANO et al, 2001).

Além disso, uma ATPase tipo P, localizada no complexo do Golgi, está envolvida no metabolismo de cobre, sendo responsável pela sua exportação quando as células são expostas a altas concentrações deste metal, transportando-o, também, para as vesículas e/ou os compartimentos intracelulares, se necessário (LUTSENKO, PETRIS, 2004; STAFFORD et al, 2013).

#### 3.2.2.10 Toxicologia do cobre em fungos

Assim como nos sistemas bacterianos, o cobre é essencial no metabolismo fúngico em baixas concentrações, agindo como coenzimas na cadeia metabólica aeróbia, onde seu acúmulo em excesso, ou mesmo a liberação intracelular de seus íons têm alta toxicidade celular (QUARANTA et al, 2010).

Mecanismos de homeostase de cobre no metabolismo permitem a permanência de fungos em ambientes de concentração relativamente baixa do metal. No entanto, altas concentrações, ou deficiência dos mecanismos que competem resistência a estes microrganismos, promovem a morte celular, como demonstrado em *C. albicans* e *S. cerevisiae* (QUARANTA et al, 2010).

Os efeitos toxicológicos do cobre mostram que os primeiros danos foram localizados nas membranas, semelhante ao mecanismo bacteriano. Além disso, em ensaios de detecção de mutação mostram a completa ausência de dano ao DNA. O ensaio de coloração *Live/Dead* confirma esta hipótese, mostrando danos rápidos e extensos à membrana citoplasmática após exposição de fungos as superfícies de cobre (QUARANTA et al, 2010; VINCENT et al, 2016).

#### 3.2.3 O cobre como agente antimicrobiano

Diante da não seletividade do cobre como agente antimicrobiano contra diferentes sistemas bacterianos e fúngicos, a sua utilização contra microrganismos patógenos possui grande potencial tecnológico (USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2018; ZHONG, T., et al, 2013).

Nesta seção será descrito a importância da utilização do cobre como agente antimicrobiano contra os patógenos da mastite e a possibilidade da sua utilização em nanoescala.

### 3.2.3.1 Cobre antimicrobiano contra a mastite

Com as necessidades tecnológicas para reduzir custos no combate a mastite e evitar a formação de microrganismos resistentes a antibióticos, o cobre vem sendo estudado como agente antimicrobiano (DEPNER et al, 2015; DEPNER et al 2016; KARTHIK, GEETHA, 2013; USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2016; ZHONG et al, 2013).

Devido ao seu efeito de morte por contato, o cobre vem sendo utilizado como matéria prima de diversos equipamentos e utensílios, conferindo o seu efeito antimicrobiano em suas superfícies de contato (DEPNER et al, 2015; DEPNER et al 2016).

Na área veterinária, Depner (2017) realizou um estudo da utilização de grades de cobre para transporte de aves recém eclodidas, verificando e comparando a taxa de mortalidade do material com as caixas de polietileno já utilizadas, confirmando uma maior eficiência decorrente a essa utilização.

A mastite, doença comprometedora da eficiência da indústria leiteira e de outros setores da agropecuária, tem como principais organismos patógenos a *S. aureus* e a *S. agalactiae*, como exemplos de bactérias gram-positivas, a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*, como exemplos de bactérias gram-negativas, e a *C. albicans*, como exemplo de fungo (KIBEBEW, 2017). Neste trabalho o foco do estudo será contra estes microrganismos patogênicos.

### 3.2.3.2 Atividade antimicrobiana de nanopartículas de cobre

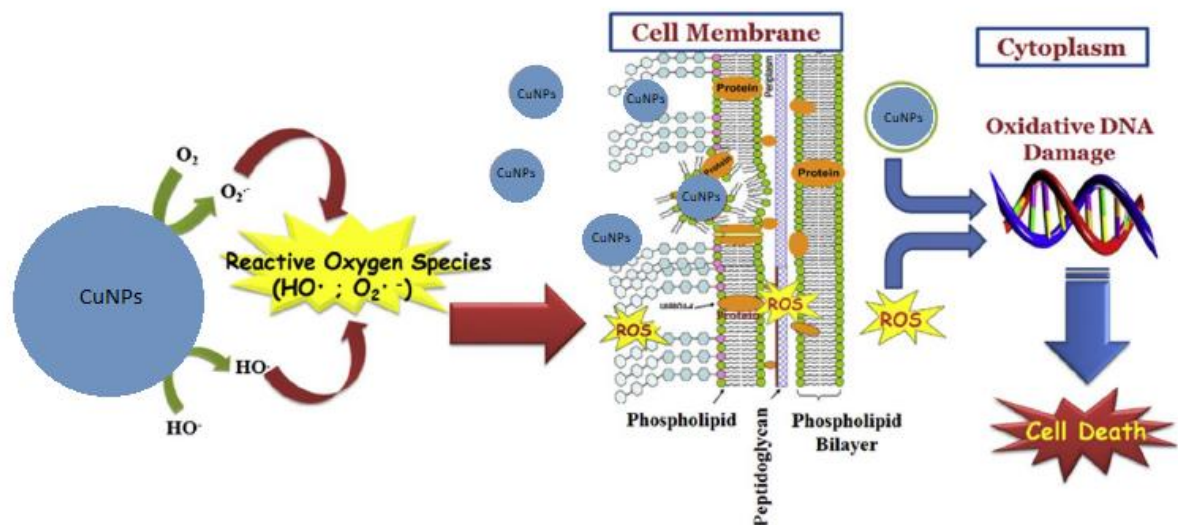
Para otimizar a ação antimicrobiana do cobre, tanto em potência como em economia, e, também, ampliar o espectro de aplicação deste material, é utilizada a nanotecnologia, onde os efeitos desta propriedade são aumentados enquanto a matéria prima é diminuída (PRADEEP, 2007; USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2018; ZHONG et al, 2013).

As nanopartículas de cobre interagem por efeitos de carga com a parede e a membrana celular, causando a sua permeabilização ou, até mesmo, a sua desestruturação pela peroxidação lipídica, onde são formados as ROS pelas reações de Fenton e o ciclo de Haber-Weiss, as quais danificam a célula e externalizam organelas, proteínas e outros componentes metabólicos essenciais (USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2018; ZHONG et al, 2013).

Em escala abaixo de 100 nm, o cobre nanoparticulado adentra a célula ultrapassando a barreira de membrana pelos processos de osmose, de fagocitose ou de transportes ativos e/ou passivos, a partir de canais proteicos específicos (ALBERTS et al, 2017; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; VINCENT et al, 2018).

Dentro do citoplasma, as nanopartículas de cobre formam ROS e danificam a célula internamente, desnaturando proteínas e enzimas por reações oxidativas e/ou por competição com as ligações [Fe-S], modificando sua morfologia ativa e inviabilizando sua atividade metabólica (USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2018; ZHONG et al, 2013). Além disso, as nanopartículas danificam o material genético, inviabilizando a reprodução de microrganismos resistentes ao seu efeito oxidativo (VINCENT et al, 2016). A Figura 11 demonstra os efeitos causados pela presença das nanopartículas no interior da célula.

Figura 11 – Demonstração do efeito antimicrobiano das nanopartículas de cobre contra a célula.



Fonte: Adaptado de APPLEROT et al, 2012.

Diversos estudos foram realizados na síntese de nanoestruturas de cobre metálico (AISSA et al, 2016; BUJNAKOVA et al, 2017; KHANNA et al, 2007; LIU et al, 2012; PONCE, KLABUNDE, 2004; SINGH et al, 2010; USMAN et al, 2012; WU, CHEN, 2004), no entendimento do efeito biocida (COIFFI et al, 2004; CRUZ et al, 2017; DUPONT, GRASS, RENSING, 2011; ESPIRITO SANTO, QUARANTA, GRASS, 2011; FATOBA et al, 2014; FAÚNDEZ et al, 2004; GAETKE, CHOW, 2003;

GRASS, RENSING, 2001; GRASS, RENSING, SOLIOZ, 2011; INGLE, DURANT, RAI, 2013; QUARANTA et al, 2010; VINCENT et al, 2017;) na avaliação do efeito de estruturas semelhantes (APPLEROT, et al, 2012; AZAM, et al, 2012; BOGDANOVIĆ et al, 2014; DEPNER, et al, 2015; ROY, et al, 2017; TAMAYO, ety al, 2016; USMAN, et al, 2013; VINCENT, HARTEMANN, DEUSTCH, 2016; ZHONG, et al, 2013; ZHONG, et al, 2015). Desta forma, as nanopartículas de cobre podem ser utilizadas como componentes de algum material e/ou utensílio, proporcionando o efeito antimicrobiano a superfície de contato com economia de matéria prima e aumento da característica biocida (USMAN et al, 2013; VINCENT et al, 2018; ZHONG et al, 2013), incorporando esta tecnologia em resinas, tintas, plásticos e/ou materiais têxteis.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A partir da prospecção de artigos, livros e outros documentos que propusessem soluções e/ou alternativas para o alcançar o objetivo deste trabalho. Desta forma, foram montadas a Tabela 2, a qual contém as informações do material de referência tido como base para o desenvolvimento da síntese e caracterização de nanoestruturas a base de cobre, a Tabela 3, a qual contém as informações do material de referência tido como base para o entendimento do efeito antimicrobiano das nanoestruturas a base de cobre, a Tabela 4, a qual contém as informações do material de referência tido como base para o entendimento do metabolismo e a toxicologia do cobre nos sistemas microbianos, e a Tabela 5, a qual contém as informações sobre a mastite e seus principais microrganismos patógenos. Utilizando as bases de dados *Scopus*® e a *PubMed*®, foram obtidos os principais trabalhos, descritos nas tabelas a seguir, a partir das seguintes palavras chave:

- 1) *Copper*;
- 2) *Sodium borohydride*;
- 3) *Chitosan*;
- 4) *Carboxymethyl cellulose*;
- 5) *Cetylpyridinium chloride*;
- 6) *Synthesis*;
- 7) *Characterization*;
- 8) *Nanoparticles*;
- 9) *Antimicrobial*;
- 10) *Mastitis*.

Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e a metodologia analítica utilizada na síntese e caracterização das nanoestruturas a base de cobre.

Autor	Título	Palavras chave	Ano
Aissa, M. B. et al.	Copper nanoparticles of well-controlled size and shape: a new advance in synthesis and self-organization.	-	2015
Applerot, G. et al.	Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: Revealing the route of induced oxidative stress.	CuO; Biomedical materials; Nanoparticles; Reactive oxygen species; Sonochemistry	2012
Bogdanović, U. et al.	Copper nanoparticles with high antimicrobial activity.	Antimicrobial activity; Copper nanoparticles; Optical properties	2014
Camacho-Flores, B. et al.	Copper: Synthesis techniques in nanoscale and powerful application as an antimicrobial agent.	-	2015
Cioffi, N. et al.	Synthesis, analytical characterization and bioactivity of Ag and Cu nanoparticles embedded in poly-vinyl-methyl-ketone films.	Bioactivity; Copper; Disinfectant; Nanoparticle; Silver; TEM; XPS	2005
Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., O'Connor, C. J.	Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles.	-	2004
Gianoussi, K., Avramidis, I., Dendrinou-Samara, C.	Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against <i>Phytophthora infestans</i> .	-	2013
Granata, G. et al.	Study of the synthesis of copper nanoparticles: the role of capping and kinetic towards control of particle size and stability.	Analysis of variance; Capping; Chemical reduction; Copper nanoparticles; Kinetic	2016
Khanna, P. et al.	Synthesis and characterization of copper nanoparticles.	Chemical reduction; Cu nanoparticles; Polymer; UV-Visible spectroscopy	2007
Kruk, T. et al.	Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles.	Antimicrobial properties; Chemical reduction; Copper; MIC; Nanoparticles	2015
Liu, Q. et al.	Preparation of Cu nanoparticles with NaBH <sub>4</sub> by aqueous reduction method.	Cu nanoparticles; Aqueous reduction method; Precursor; Reaction process	2012

Palza, H.	Antimicrobial polymers with metal nanoparticles.	Antimicrobial metals; Copper; Polymer nanocomposites; Silver	2015
Pradeep, T.	Nano: The Essentials.	-	2007
Sarkar, A., Mukherjee, T., Kapoor, S.	PVP-stabilized copper nanoparticles: A reusable catalyst for "click" reaction between terminal alkynes and azides in nonaqueous solvents.	-	2008
Sergeev, G. B.	Nanochemistry.	-	2006
Umer, A. et al.	A green method for the synthesis of copper nanoparticles using L-ascorbic acid.	Ascorbic acid; Copper nanoparticles; Copper salt; FTIR; XRD	2014
Usman, M. S. et al.	Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods.	Chitosan; Copper sulphate; Copper nanoparticle; Chemical reduction method	2012
Usman, M. S. et al.	Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles.	Antimicrobial activity; Chemical synthesis; Chitosan; Copper nanoparticles	2013
Ventra, M. D., Evoy, S., Heflin Jr, J. R.	Introduction to nanoscale science and technology.	-	2004
Wu, S., Chen, D.	Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions.	Aqueous solution; CTAB; Cu; Nanoparticles	2004
Zain, N. M., Stapley, A. G. F., Shama, G.	Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications.	<i>Bacillus subtilis</i> ; Bimetallic nanoparticles; Escherichia coli; Minimum bactericidal concentration; Minimum inhibitory concentration	2014
Zhong, T. et al.	Antimicrobial properties of the hybrid copper nanoparticles–carboxymethyl cellulose.	Antimicrobial cellulose; Carboxymethyl cellulose; Copper nanoparticles; Nanocomposites	2013
Zhong, T. et al.	Drying cellulose-based materials containing copper nanoparticles.	Carboxymethyl cellulose; Copper nanoparticles; Freeze-drying; Solvent exchange; Spray-drying; TEMPO nanofibrillated cellulose	2015

Fonte: Autoria própria, 2019

Tabela 3 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento do efeito antimicrobiano das nanoestruturas a base de cobre.

<b>Autor</b>	<b>Título</b>	<b>Palavras chave</b>	<b>Ano</b>
Chatterjee, A., Chakraborty, R., Basu, T.	Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles.	Dna degradation; Copper nanoparticle; Lipid peroxidation; Membrane depolarization; Protein oxidation; Reactive oxygen species	2014
Grass, G., Rensing, C., Solioz, M.	Metallic copper as an antimicrobial surface.	-	2011
Ingle, A., Duran, N., Rai, M.	Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review.	Antibacterial; Antimicrobials; Antimycotic; Antiviral; Copper nanoparticles; Toxicity	2014
Sanhueza, G. S., Rodríguez, D. F., Toledo, H. B.	Copper nanoparticles as potential antimicrobial agent in disinfecting root canals: a systematic review.	Antibacterial; Copper nanoparticles; Endodontics	2016
Espírito Santo, C. et al.	Bacterial killing by dry metallic copper surfaces.	Copper surface; Copper uptake; Escherichia coli; Deinococcus radiodurans; Metal toxicity; Membrane damage	2011
Vincent, M. et Al.	Contact killing and antimicrobial properties of copper.	Antimicrobial properties; Contact killing; Copper; Micro-organisms; Resistance	2018

Fonte: Autoria própria, 2019



Tabela 4 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento do metabolismo e da toxicologia do cobre em sistemas microbianos.

Autor	Título	Palavras chave	Ano
Argüello, J., Raimunda, D., Padilla- Benavides, T.	Mechanisms of copper homeostasis in bacteria.	-atpases; Copper; Homeostasis; Transmembrane transport; Meta; Cu; Homeostasis; Metallochaperones; Metalloenzymes; Transmembrane transport	2013
Dupont, C. L., Grass, G., Rensing, C.	Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - New insights and applications.	-	2011
Freitas, J. et al.	Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies.	Copper; Iron; Metabolism; Metal; Yeast	2003
Gaetke, L. M., Chow, C. K.	Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients.	Copper; Oxidative stress; Vitamin E; Ascorbic acid	2003
Guengerich, P. F.	Introduction to metals in biology 2018: Copper homeostasis and utilization in redox enzymes.	Copper; Copper transport; Metal homeostasis; Metal; Metalloprotein; Transport metal	2018
Linder, M. C.	Biochemistry of copper.	-	1991
Raimunda, D. et al.	The transport mechanism of bacterial Cu <sup>+</sup> -atpases: distinct efflux rates adapted to different function.	Cu <sup>+</sup> -atpases; Cu <sup>+</sup> transport; Cu <sup>+</sup> chaperone; Cu <sup>+</sup> coordination; Homeostasis	2011

Fonte: Autoria própria, 2019

Tabela 5 – Levantamento bibliográfico de trabalhos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica e o entendimento da mastite e identificação dos principais sistemas microbianos patogênicos.

Autor	Título	Palavras chave	Ano
Acosta, A. C. et al.	Mastites em ruminantes no Brasil	Mastitis; Etiology; Epidemiology; Antimicrobial resistance; Ruminants.	2016
Acosta, A. C. et al.	Frequency of <i>Staphylococcus aureus</i> virulence genes in milk of cows and goats with mastitis	<i>Staphylococcus aureus</i> ; Virulence genes; Milk; Cows; Goats; Mastitis; Molecular typing; Genotyping; Staphylococcal enterotoxin; Capsular polysaccharide; Cattle; Bacterioses.	2018
AYANO, A. A. et al.	Prevalence of subclinical mastitis in lactating cows in selected commercial dairy farms of Holeta district	California mastitis test; Bacteriological culture; Prevalence; Subclinical mastitis.	2013
Embrapa	Anuário leite	-	2018
Embrapa	Anuário leite	-	2019
Kibebew, K.	Bovine mastitis: a review of causes and epidemiological point of view	-	2017
Krömer, V., Leimbach, S.	Mastitis treatment — reduction in antibiotic usage in dairy cows.	-	2017
Suojala, L., Kaartinen, L., Pyörälä, S.	Treatment for bovine <i>Escherichia coli</i> mastitis - an evidence-based approach	-	2013

Fonte: Autoria própria, 2019

#### 4.2 LISTA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados diversos equipamentos e reagentes químicos para sintetizar e caracterizar as nanopartículas de cobre produzidas e, conseqüentemente, avaliar e quantificar o seu efeito antimicrobiano.

Nas subseções a seguir serão descritos os equipamentos e materiais utilizados em cada etapa do trabalho.

#### 4.2.2 Caracterização de nanoestruturas de cobre

Para a realização da caracterização de nanopartículas de cobre foram utilizados os equipamentos e materiais descritos a seguir.

##### 4.2.2.1 Lista de equipamentos utilizados na caracterização das nanopartículas de cobre

- a) Cubeta de vidro de caminho estreito, de dimensões 1 cm x 1 cm x 3 cm e volume de 3,00 mL da ANALÍTICA®;
- b) Deionizador de água Master WFI da GEHAKA®;
- c) Equipamento de difração de raios-X (XRD) XRD-6000 da SHIMADZU®;
- d) Espectrofotômetro infravermelho NICOLET iS50 FT-IR da THERMO SCIENTIFIC™;
- e) Espectrofotômetro UV-Vis. U-2000 da HITACHI®;
- f) Espectrofotômetro de correlação de fótons da NANOPLUS®;
- g) Estufa modelo 315 SE da FANEM®;
- h) *Grid* de cobre de porosidade igual a 300 mesh;
- i) Microscópio eletrônica de transmissão FEI G20 200 kV Tecnai®;
- j) Microscópio eletrônica de varredura EVO-MA10 da ZEISS®;
- k) Mini *Sputter Coater* POLARON EMITECH SC7620 da QUORUM™;
- l) Pipetadora de 40,00 µL da EPPENDORF®;
- m) Pipetadora de 1.000 µL da EPPENDORF®;
- n) Pipetadora de 5,00 mL da EPPENDORF®;
- o) Pipetadora de 10,00 mL da EPPENDORF®.

##### 4.2.2.2 Lista de materiais utilizados na caracterização das nanopartículas de cobre

- a) Filme de Formvar® da Sigma-Aldrich®.

#### 4.2.3 Avaliação antimicrobiana de nanoestruturas de cobre

Para a realização da caracterização de nanopartículas de cobre foram utilizados os equipamentos e materiais descritos a seguir.

##### 4.2.3.1 Lista de equipamentos utilizados na avaliação antimicrobiana das nanopartículas de cobre

- a) Agitador de tubos da QUIMIS®;

- b) Alça de Drigalski;
- c) Autoclave vertical AV Plus da PHOENIX LUFERCO®;
- d) Balança semianalítica PB8001-L da METTLER TOLEDO®;
- e) Cubeta de vidro de caminho estreito, de dimensões 1 cm x 1 cm x 3 cm e volume de 3,00 mL da ANALÍTICA®;
- f) Deionizador de água Master WFI da GEHAKA®;
- g) Espectrofotômetro UV-Vis. U-2000 da HITACHI®;
- h) Fluxo laminar classe II A1 da FILTERFLUX®;
- i) Frasco com tampa e anel retentor de gotas de 250 mL da SCHOTT®;
- j) Frasco com tampa e anel retentor de gotas de 500 mL da SCHOTT®;
- k) Frasco com tampa e anel retentor de gotas de 1000 mL da SCHOTT®;
- l) Frasco Erlenmeyer de vidro borossilicato de 125 mL da LABORGLASS®;
- m) Frasco Erlenmeyer de vidro borossilicato de 250 mL da LABORGLASS®;
- n) *Freezer* -80°C CL580-86V da COLDLAB®;
- o) Incubadora rotativa da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC®;
- p) Leitor de microplacas UVM 340 da ASYS®;
- q) Microplaca de 96 poços K30-5096P da KASVI®;
- r) Microscópio óptico MZ8 da LEICA®;
- s) Microtubos de 2,0 mL da EPPENDORF®;
- t) Pipetadora de 40,00 uL da EPPENDORF®;
- u) Pipetadora de 1.000 uL da EPPENDORF®;
- v) Pipetadora de 200,0 uL da EPPENDORF®;
- w) Pipetadora de 5,00 mL da EPPENDORF®;
- x) Placas de petri de 90x15 mm lisa esterilizada por radiação ionizante;
- y) Ponteiras de 10,0 mL de polietileno da EPPENDORF®;
- z) Ponteiras de 1000 uL de polietileno da EPPENDORF®;
- aa) Ponteiras de 200,0 uL de polietileno da EPPENDORF®;
- bb) Ponteiras de 5,00 mL de polietileno da EPPENDORF®;
- cc) Proveta 25,0 mL da NALGON®;
- dd) Proveta 50 mL da NALGON®;
- ee) Tubos de ensaio de vidro borossilicato de 2x10 cm da LABORGLASS®.

#### 4.2.3.2 Lista de materiais utilizados na avaliação antimicrobiana das nanopartículas de cobre

- a) DIFCO™ Caldo Mueller-Hinton – Lote 8170915 da BD BACTEC™;
- b) DIFCO™ Ágar Mueller-Hinton – Lote 9015774 da BD BACTEC™;
- c) BACTO™ Peptona bacteriológica – Lote 9274645 da BD BACTEC™;
- d) Extrato de carne – Lote LP0029 da OXOID™;
- e) Extrato de levedura – Lote 102514201 da KASVI™;
- f) Cloreto de sódio 99,9% – Lote 48.299-1 da ANIDROL®;
- g) Carboximetilcelulose – Lote 71H0397 da SIGMA-ALDRICH®;
- h) Glicerol 99,5% – Lote 453752 da CARLO ERBA®;

## 6 CONCLUSÃO

Com este trabalho, conclui-se que as nanoestruturas a base de cobre desenvolvidas possuem atividade antimicrobiana efetiva contra os microrganismos patógenos da mastite, sendo o seu agente de revestimento de quitosana, de cloreto de cetilpiridínio (CCP) ou de carboximetilcelulose (CMC).

Para a produção destas estruturas, os parâmetros de processo de síntese por redução química são importantes para competir maior estabilidade ao sistema disperso, ainda dependentes do tipo de agente de revestimento, seja de um dos polímeros de polissacarídeos, quitosana ou CMC, ou do surfactante catiônico, o CCP.

O grau de estabilidade das nanoestruturas a base de cobre não está vinculada ao efeito biocida, pois as estruturas com quitosana e CCP, as quais possuem estabilidade química mais frágil, detêm um maior efeito antimicrobiano, ou seja, as suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) são menores.

Os diferentes microrganismos patógenos da mastite estudados, sendo a *Echerichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*, representantes das bactérias Gram-negativas, a *Staphylococcus aureus*, representante das bactérias Gram-positivas, e a *Candida albicans*, representantes dos fungos, possuem metabolismos diferentes. Desta forma, a garantia da reprodutibilidade dos testes de acordo com a padronização da quantidade de unidades formadoras de colônias por unidade de volume (UFC/mL) foi importante para a confiabilidade dos resultados contra um amplo espectro de microrganismos.

As nanoestruturas a base de cobre com CMC não possuem aplicação efetiva, apesar da sua maior estabilidade, pois é necessário utilizar uma alta concentração de cobre, uma CIM de 317,5 µg/mL, para conferir o efeito antimicrobiano desejado. Diferentemente das nanoestruturas a base de cobre com quitosana e CCP, as quais possuem uma CIM de 79,4 µg/mL para serem efetivas contra qualquer um dos microrganismos estudados. Desta forma, pode-se afirmar que as nanoestruturas possuem atividade antimicrobiana não seletiva e de amplo espectro.

## **SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS**

Sendo as nanoestruturas a base de cobre com diferentes agente de revestimento, sendo a quitosana e o cloreto de cetilpiridínio (CCP) efetivas contra os microrganismos patógenos da mastite, os quais estão vinculadas a várias outras doenças e ambientes, fica como principal sugestão o estudo da incorporação das nanoestruturas em materiais estratégicos para conferir o efeito biocida a uma superfície, como tintas, polímeros, tecidos, resinas, adesivos e entre outros materiais.

Além disso, fica como segunda sugestão a avaliação antimicrobiana contra outros microrganismos de interesse, como bactérias resistentes e outras não estudadas, outros fungos, vírus e parasitas, verificando qual a amplitude de aplicação destas nanoestruturas desenvolvidas.

Por fim, fica a sugestão de transferência de tecnologia para o desenvolvimento da síntese de nanoestruturas, como em reatores de fluxo contínuo e de canais micrométricos, possibilitando a diminuição do consumo de matéria prima, controle do tamanho de partícula e diminuição do tamanho da planta de produção.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.
- ACOSTA, A. C. et al. Frequency of Staphylococcus aureus virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 2029-2036, 2018.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.. MECANISMO E APLICAÇÕES DA REAÇÃO DE FENTON ASSISTIDA POR COMPOSTOS FENÓLICOS REDUTORES DE FERRO. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.
- AISSA, M. A. B. et al. Copper nanoparticles of well-controlled size and shape: a new advance in synthesis and self-organization. **Nanoscale**, v. 7, n. 7, p. 3189-3195, 2015.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Ed. 6. Porto Alegre: Bookman, 2017.
- AYANO, A. A. et al. Prevalence of subclinical mastitis in lactating cows in selected commercial dairy farms of Holeta district. **Journal Of Veterinary Medicine And Animal Health**, v. 5, n. 3, p. 67-72, 2013.
- APPLEROT, G. et al. Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. **Small**, v. 8, n. 21, p. 3326-3337, 2012.
- ARGÜELLO, J. M.; EREN, E.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. **Biometals**, v. 20, n. 3-4, p. 233-248, 2007.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. Metal Transport across Biomembranes: Emerging Models for a Distinct Chemistry. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 287, n. 17, p. 13510-13517, 2012.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-14, 2013.
- ARNESANO, F. et al. Characterization of the Binding Interface between the Copper Chaperone Atx1 and the First Cytosolic Domain of Ccc2 ATPase. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41365-41376, 2001.



ATKINS, P., JONES, L.. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

<sup>1</sup>AZAM, A. et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 7, p. 6003-6009, 2012.

<sup>2</sup>AZAM, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 7, p. 3527-3535, 2012.

BAGAI, I. et al. Substrate-linked Conformational Change in the Periplasmic Component of a Cu(I)/Ag(I) Efflux System. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35695-35702, 2007.

BANFI, L. et al. Sodium borohydride in **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis**, John Wiley & Sons, Ltd., New York, 2001.

BOAL, A. K.; ROSENZWEIG, A. C. Structural Biology of Copper Trafficking. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4760-4779, 2009.

BOGDANOVIĆ, U. et al. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 128, p. 75-78, 2014.

BUJNAKOVA, Z., et al. Preparation, properties and anticancer effects of mixed As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>/ZnS nanoparticles capped by poloxamer 407. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 541-551, 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Volume 2. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. **ANUÁRIO LEITE**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018.

BRASIL. **ANUÁRIO LEITE**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2019.

CAMACHO-FLORES, B. A. et al. Copper: Synthesis Techniques in Nanoscale and Powerful Application as an Antimicrobial Agent. **Journal Of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

CARVALHO, N. L., BEURON, D. C., SANTOS, M. V.. **Impactos econômicos da mastite**. 2012. Disponível em:

<<http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/impactos-economicos-da-mastite>>.

Acesso em: 13 set. 2019.

CHATTERJEE, A. K.; CHAKRABORTY, R.; BASU, T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 25, n. 13, p. 1-12, 2014.

- CIOFFI, N. et al. Synthesis, analytical characterization and bioactivity of Ag and Cu nanoparticles embedded in poly-vinyl-methyl-ketone films. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 8, p. 1912-1918, 2005.
- CRUZ, R. et al. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de un gel para manos con nanomoléculas de cobre. **Revista Argentina de Dermatología**, v. 98, n. 1, p.1-10, 2017.
- CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3893-3946, 2004.
- DAS, R.; ALI, M. E.; HAMID, S. B. A. Current applications of x-ray powder diffraction: a review. **Reviews On Advanced Materials Science**, v. 38, n. 1, p. 95-109, 2014.
- DEPNER, R. F. R. et al. O cobre como superfície de contato antimicrobiana e sua potencial aplicação na medicina veterinária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 4, p. 532-543, 2015.
- DEPNER, R. F. R. et al. Action of Antimicrobial Copper on Bacteria and Fungi Isolated from Commercial Poultry Hatcheries. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 2, p. 95-97, 2016.
- DEPNER, Ronise Faria Rohde. **Atividade antimicrobiana do cobre aplicado em bandejas de eclosão de incubatórios avícolas**. 2017. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Sanidade e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- DING, G. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. **Journal Of Animal Science And Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.
- DUPONT, C. L.; GRASS, G.; RENSING, C.. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance — new insights and applications. **Metallomics**, v. 3, n. 11, p. 1109-1118, 2011.
- ESPÍRITO SANTO, C. et al. Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 794-802, 2010.
- ESPÍRITO SANTO, C.; QUARANTA, D.; GRASS, G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. **Microbiologyopen**, v. 1, n. 1, p. 46-52, 2011.

- ESTRELA, C. et al. A Preliminary Study of the Antibacterial Potential of Cetylpyridinium Chloride in Root Canals Infected by *E. faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 645-653, 2012.
- FATOBA, O. S., et al. The Study of the Antimicrobial Properties of Selected Engineering Materials' Surfaces. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**, v. 2, p. 78-87, 2014.
- FAÚNDEZ, G., et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **BMC Microbiology**, v. 4, p. 1-7, 2004.
- FEYNMAN, R. P. **Discurso para a American Physical Society "Plenty of Room at the Bottom"**. Pasadena, dec. 1959. Disponível em <<http://www.phy.pku.edu.cn/~qhcao/resources/class/QM/Feynman%27s-Talk.pdf>>. Acesso em 19/08/2018.
- FIORINI, E. J. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica, 2000.
- FREITAS, J. et al. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. **Biometals**, v. 16, p. 185-197, 2003.
- GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003.
- GIANNOUSI, K.; AVRAMIDIS, I.; DENDRINOUS-SAMARA, C.. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. **Rsc Advances**, v. 3, n. 44, p. 21743-21752, 2013.
- GONZALEZ-GUERRERO, M.; ARGUELLO, J. M. Mechanism of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: Soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 16, p. 5992-5997, 2008.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; HONG, D.; ARGÜELLO, J. M. Chaperone-mediated Cu<sup>+</sup> Delivery to Cu<sup>+</sup> Transport ATPases. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20804-20811, 2009.
- GRANATA, G. et al. Study of the synthesis of copper nanoparticles: the role of capping and kinetic towards control of particle size and stability. **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 5, p. 1-12, 2016.

- GRASS, G., RENSING, C.. CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, p. 902-908, 2001.
- GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1541-1547, 2010.
- GUDIPATY, S. A. et al. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. **FEMS Microbiology Letters**, v. 330, n. 1, p. 30-37, 2012.
- GUENGERICH, F. P. Introduction to Metals in Biology 2018: Copper homeostasis and utilization in redox enzymes. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 293, n. 13, p. 4603-4605, 2018.
- GYAWALI, R. et al. Antimicrobial Activity of Copper Alone and in Combination with Lactic Acid against *Escherichia coli* O157: H7 in Laboratory Medium and on the Surface of Lettuce and Tomatoes. **Journal Of Pathogens**, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- HABER, V. F.; WEISS, J.. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. **Naturwissenschaften**, v. 23, n. 16, p. 948-950, 1932.
- HAN, T. L.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics And Biology**, v. 48, n. 8, p. 747-763, 2011.
- HASSETT, R.; KOSMAN, D. J. Evidence for Cu(II) Reduction as a Component of Copper Uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 270, n. 1, p. 128-134, 1995.
- HÉBERT, C. D.. **NTP Technical Report on Toxicity Studies of Cupric Sulfate**. United States Department of Health and Human Services. NIH Publication 93-3352, p. 124, 1993.
- HERMIDA-MONTERO, L. A. et al. Aqueous-phase synthesis of nanoparticles of copper/copper oxides and their antifungal effect against *Fusarium oxysporum*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, p. 1-9, 2019.
- HONG, R. et al. Membrane Lipid Peroxidation in Copper Alloy-Mediated Contact Killing of *Escherichia coli*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1776-1784, 2012.
- INGLE, A. P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1001-1009, 2013.

IR Spectrum Table & Chart. **IR Spectrum Table by Frequency Range**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>>. Acesso em: 30 de julho de 2020.

JENNY, M.; KINGSBURY, J. Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Biology And Medical Research**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2018.

KARTHIK, A. D.; GEETHA, K. Synthesis of Copper Precursor, Copper and its oxide Nanoparticles by Green Chemical Reduction Method and its Antimicrobial Activity. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 5, p. 16-21, 2013.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A Review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 1, p.429-437, 1997.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.

KHANNA, P. K. et al. Synthesis and characterization of copper nanoparticles. **Materials Letters**, v. 61, n. 25, p. 4711-4714, 2007.

KIBEBEW, K.. Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. **Journal Of Biology, Agriculture And Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2017.

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 176-185, 2008.

KRAVETS, V. G. et al. Plasmonic Surface Lattice Resonances: A Review of Properties and Applications. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 12, p. 5912-5951, 2018.

KRÖMER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 52, p. 21-29, 2017.

KRUK, T. et al. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 17-22, 2015.

LI, Y.; BARRON, A. R. Dynamic Light Scattering. **Openstax-CNX**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2014.

LIEBEKE, M. et al. A metabolomics and proteomics study of the adaptation of *Staphylococcus aureus* to glucose starvation. **Molecular Biosystems**, v. 7, n. 4, p. 1241-1253, 2011.

LINDER, M. C.; GOODE, C. A. **Biochemistry of Copper**. New York: Springer Science, 1991.

LIU, Q. M. et al. Preparation of Cu nanoparticles with NaBH<sub>4</sub> by aqueous reduction method. **Transactions Of Nonferrous Metals Society Of China**, v. 22, n. 1, p. 117-123, 2012.

- LUTSENKO, S.; PETRIS, M. J. Function and Regulation of the Mammalian Copper-transporting ATPases: Insights from Biochemical and Cell Biological Approaches. **Journal Of Membrane Biology**, v. 191, n. 1, p. 1-12, 2003.
- MA, Z.; JACOBSEN, F. E.; GIEDROC, D. P. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4644-4681, 2009.
- MACOMBER, L., IMLAY, J. A.. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **PNAS**, v. 106, n. 20, p. 8344-8349, 2009.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica. 2ª edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1999.
- MATHEWS, S. et al. Contact Killing of Bacteria on Copper Is Suppressed if Bacterial-Metal Contact Is Prevented and Is Induced on Iron by Copper Ions. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2605-2611, 2013.
- MEKONNEN, S. A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of North-Western Ethiopia. **Bmc Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2018.
- MICKELSON, M. N. Aerobic Metabolism of *Streptococcus agalactiae*. **Journal Of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 184-191, 1967.
- MOGES, N. et al. Antimicrobial Susceptibility of Mastitis Pathogens from Smallholder Dairy Herds in and Around Gondar, Ethiopia. **Journal Of Animals And Veterinary Advances**, v. 10, n. 12, p. 1616-1622, 2011.
- MÖRTERS, P.; PERES, Y. **Brownian Motion**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- OLIVEIRA, G. S. et al. Contaminação fúngica no leite humano e em sítios anatômicos de lactantes e lactentes. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 71, n. 3, p. 450-455, 2012.
- OSTWALD, W. Studien über die bildung und umwandlung fester körper. **Zeitschrift für physikalische chemie**, v. 22, p. 289-330, 1897.
- OTUBO, L.. **Química de nanoestruturas: Funcionalização de nanopartículas metálicas e nanotubos de carbono**. 2009. 186 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Laboratório de Química do Estado Sólido, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- OUTTEN, F. W. et al. The IndependentcueandcusSystems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30670-30677, 2001.

- PALZA, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 2099-2116, 2015.
- PASTORIZA-SANTOS, I. et al. Aerobic Synthesis of Cu Nanoplates with Intense Plasmon Resonances. **Small**, v. 5, n. 4, p. 440-443, 2009.
- PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123-131, 2000.
- PETRIS, M. J. The SLC31 (Ctr) copper transporter family. **Journal Of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 752-755, 2004.
- PONCE, A. A., KLABUNDE, K. J.. Chemical and catalytic activity of copper nanoparticles prepared via metal vapor synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 225, p. 1-6, 2004.
- PRADEEP, T., **Nano: The Essentials**. McGraw-Hill, Chennai, 2007.
- QUARANTA, D. et al. Mechanisms of Contact-Mediated Killing of Yeast Cells on Dry Metallic Copper Surfaces. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 416-426, 2010.
- RAIMUNDA, D. et al. The transport mechanism of bacterial Cu<sup>+</sup>-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. **Biometals**, v. 24, n. 3, p. 467-475, 2011.
- RANI, M. et al. Biopolymer Electrolyte Based on Derivatives of Cellulose from Kenaf Bast Fiber. **Polymers**, v. 6, n. 9, p. 2371-2385, 2014.
- REES, E. M.; LEE, J.; THIELE, D. J. Mobilization of Intracellular Copper Stores by the Ctr2 Vacuolar Copper Transporter. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54221-54229, 2004.
- REES, E. M.; THIELE, D. J. Identification of a Vacuole-associated Metalloreductase and Its Role in Ctr2-mediated Intracellular Copper Mobilization. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21629-21638, 2007.
- RENSING, C. et al. CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. **PNAS**, v. 97, n. 2, p. 652-656, 2000.
- RENSING, C.; GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 197-213, 2003.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: Macmillan Press, 1992.
- ROUSSEL, P. et al. *Escherichia coli* mastitis strains: *In vitro* phenotypes and severity of infection *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1-20, 2017.

ROY, R., et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, p. 522-554, 2017.

SÁNCHEZ-SANHUEZA, G.; FUENTES-RODRÍGUEZ, D.; BELLO-TOLEDO, H. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals. A Systematic Review. **International Journal Odontostomatology**, v. 10, n. 3, p. 547-554, 2016.

SANTOS, J. et al. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098-1111, 2016.

SARKAR, A.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. PVP-Stabilized Copper Nanoparticles: A Reusable Catalyst for "Click" Reaction between Terminal Alkynes and Azides in Nonaqueous Solvents. **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 9, p. 3334-3340, 2008.

SCACCABAROZZI, L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in Dairy Goats: Genotypic and Phenotypic Comparison of Intramammary and Environmental Isolates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-23, 2015.

SERGEEV, G. B. **Nanochemistry**. Oxford: Elsevier, 2006.

SHIMIZU, K. Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1-47, 2013.

SIMON, N. J., DREXLER, E. S., REED, R. P. **Properties of Copper and Copper Alloys at Cryogenic Temperatures**. New York: National Institute of Standard and Technology, 1992.

SINGH, A., et al. Copper coated silica nanoparticles for odor removal. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 15837-15884, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Análisis instrumental**. 5. ed. Madrid: Mcgraw-Hill / Interamericana de España, 2001.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica I**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LCT, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica II**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LCT, 2012.

SU, C. C.; LONG, F.; YU, E. W. The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle. **Protein Science**, v. 20, n. 1, p. 6-18, 2010.

SUOJALA, L.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S.. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 521-531, 2013.



- TAMAYO, L., et al. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 1391-1409, 2016.
- TAY, A. L. H. et al. Silver nanoparticles enhance potency of cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. **Regional Meeting and Co-Annual Scientific Meeting of IADR Divisions**. IADR Asia/Pacific Region (APR), 2013.
- THURMAN, R. B.; GERBA, C. P.; BITTON, G. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. **Critical Reviews In Environmental Control**, v. 18, n. 4, p. 295-315, 1989.
- TOMA, H. E. **O Mundo Nanométrico A Dimensão do Novo Século**. São Paulo: Oficina de Textos, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TOSIN, G. **Microscopia eletrônica de transmissão**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2000.
- TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., **Microbiologia**, 4<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- UMER, A. et al. A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid. **Revista Matéria**, v. 19, n. 3, p. 197-203, 2014.
- USMAN, M. et al. Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14928-14936, 2012.
- USMAN, M. et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4467-4479, 2013.
- VENTRA, M. D., EVOY, S., HEFLIN Jr, J. R. **Introduction to Nanoscale Science and Technology**. New York: Springer, 2004.
- VINCENT, M.; HARTEMANN, P.; ENGELS-DEUTSCH, M. Antimicrobial applications of copper. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 585-591, 2016.
- VINCENT, M. et al. Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 124, n. 5, p. 1032-1046, 2017.
- WARNES, S. L.; CAVES, V.; KEEVIL, C. W. Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that

observed for Gram-positive bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1730-1743, 2011.

WILLENBORG, J.; GOETHE, R. Metabolic traits of pathogenic streptococci. **FEBS Letters**, v. 590, n. 21, p. 3905-3919, 2016.

WU, S. H.; CHEN, D. H. Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 273, n. 1, p. 165-169, 2004.

YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 215-227, 2005.

ZAIN, N. M.; STAPLEY, A. G. F.; SHAMA, G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 195-202, 2014.

ZHONG, T. et al. Antimicrobial Properties of the Hybrid Copper Nanoparticles–Carboxymethyl Cellulose. **Wood And Fiber Science**, v. 45, n. 2, p. 215-222, 2013.

ZHONG, T. et al. Drying cellulose-based materials containing copper nanoparticles. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2665-2681, 2015.