

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
BIOPROCESSOS



TARCISIO NASCIMENTO CORREA

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS DE ORIGEM BACTERIANA FUNCIONALIZADAS COM
ANFOTERICINA B

RIO DE JANEIRO

2019

Tarcísio Nascimento Correa

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS DE ORIGEM BACTERIANA FUNCIONALIZADAS COM
ANFOTERICINA B

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu

Rio de Janeiro

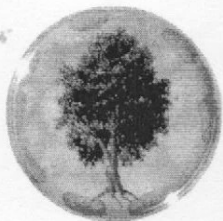
2019

CIP - Catalogação na Publicação

C824o Correa, Tarcisio Nascimento
 Otimização do processo de produção de
nanopartículas magnéticas de origem bacteriana
funcionalizadas com anfotericina B / Tarcisio
Nascimento Correa. -- Rio de Janeiro, 2019.
 80 f.

 Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da
Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Vegetal, 2019.


 1. nanopartículas magnéticas bacterianas. 2.
batelada alimentada. 3. cultivo contínuo. 4.
funcionalização de magnetossomos. 5. anfotericina B.
I. Abreu, Fernanda de Ávila, orient. II. Título.



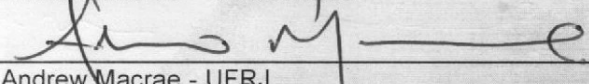
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal

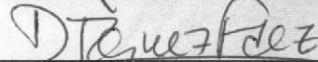
ATA DO EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TARCÍSIO NASCIMENTO CORREA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL).



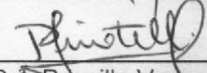
Dr. Andrew Macrae – Coordenador



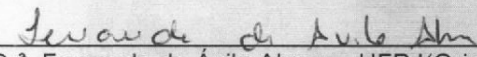
Dr. Andrew Macrae - UFRJ



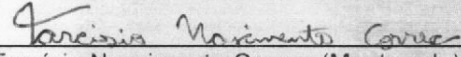
Dr. Daniel Ernesto Rodriguez Fernández – UFRJ



Dr.ª Priscilla Vanessa Finotelli – UFRJ



Dr.ª Fernande de Ávila Abreu – UFRJ(Orientadora)



Tarcísio Nascimento Correa (Mestrando)

LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:

Ciente,

Ciente,

Presidente da Banca

Aluno(a)

*Dedico este trabalho a meu avô, João Luiz
Nascimento que partiu para a eternidade
durante o período do Mestrado e que me
ensinou a viver de maneira doce e a ser
grato por cada conquista*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Fernanda de Ávila Abreu, por ouvir o que eu havia a dizer e por dar todas as forças necessárias à concretização desta ideia que parecia fora do escopo de tudo aquilo com o que já havia trabalhado. Obrigado, também, por todas as responsabilidades atribuídas a mim.

Ao Programa de Pós-Graduação Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, pela oportunidade de cursar o Mestrado nesta área com que tanto me identifico.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por disponibilizar o espaço e a estrutura para esta pesquisa e por incentivar a minha qualificação profissional.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia, pelas amizades que se formaram a partir do excelente convívio, pelo apoio mútuo no dia-a-dia da pesquisa e por aturarem as minhas bagunças.

À Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins, pelo uso de toda infraestrutura relacionada à parte de microscopia. Aproveito para agradecer especialmente ao tecnólogo Jefferson Cypriano pelo apoio na parte experimental e, principalmente, pela grande amizade.

Ao professor Mateus Godoy, do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana, pela contribuição no planejamento dos experimentos e pela execução das análises por cromatografia líquida e espectroscopia de ultravioleta-visível.

Ao professor Flávio Garcia, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pelo conhecimento transmitido sobre nanomagnetismo e pela execução das medidas de magnetização e pelo uso do equipamento de hipertermia.

Ao meu namorado, Leonardo, pelo seu amor, pelas saudades sentidas e por me fazer perceber que eu sou capaz e merecedor desta e de muitas outras conquistas que certamente virão.

À minha família, em especial aos meus pais, Márcia e Joacyr, minha irmã, Julia, meu afilhado, Arthur, e ao mascote Fred, pelos bons momentos e, principalmente, por me tirar da agitação do dia-a-dia.

Às agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq pelo suporte financeiro.

*“Se eu me encrecasse sem querer, não ousaria
esperar passivamente para me salvarem”*

Octavia E. Butler

RESUMO

Correa, Tarcísio Nascimento. Otimização do processo de produção de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana funcionalizadas com anfotericina B. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

Bactérias magnetotáticas (MTB) são a principal fonte biotecnológica de nanopartículas magnéticas. As nanopartículas magnéticas de origem bacteriana ou magnetossomos (BMs) são compostos de um núcleo mineral de magnetita ou greigita envolvido por membrana biológica. Essas estruturas possuem forma definida, distribuição de tamanho estreita (30-120 nm) e propriedades magnéticas específicas, que favorecem sua aplicação como ferramentas biotecnológicas. Além disso, a membrana dos BMs atua como um sítio de funcionalização por possuir diversas proteínas associadas, onde diferentes moléculas podem ser ligadas. As aplicações dos BMs incluem até o momento o carregamento e liberação de fármacos, hipertermia induzida magneticamente, separação de células e biomoléculas e imobilização de enzimas. Apesar de sua aplicabilidade, a produção de BMs depende do cultivo de MTB, que resulta em baixos rendimentos de magnetossomos. Assim, estratégias para o cultivo em larga escala de MTB precisam ser melhoradas. Aqui, descrevemos a otimização do cultivo em biorreator da espécie *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1, que produz BMs prismáticos de magnetita de aproximadamente 60 nm. Primeiramente, foi estabelecida uma batelada alimentada com suplementação da fonte de ferro e estratégia de injeção de N₂O em pulsos de 24 h. Após 120 h de cultivo, a produção de magnetita atingiu 24,5 mg.L⁻¹. A produtividade máxima (16,8 mg.L⁻¹.d⁻¹) foi atingida entre 48 e 72 h. A produtividade e o número médio de magnetossomos por célula diminuíram a partir de 72 h. Diante disso, foi estabelecido o cultivo contínuo na modalidade quimiostato com injeção intermitente de óxido nítrico foi estabelecido. O cultivo contínuo foi capaz de manter a cultura com produção e produtividade de magnetita de 27,1 mg.L⁻¹ e 22,7 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente, em 120 h, mantendo valores próximos até 168 h. Esta condição foi atingida pois foram evitadas a perda de síntese de magnetita e redução no número de magnetossomos por célula, como havia ocorrido no cultivo em batelada alimentada. Os BMs purificados foram funcionalizados com anfotericina B utilizando poli-L-lisina e/ou glutaraldeído em concentrações diferentes. A maior eficiência de captura e carregamento do fármaco, 52,7 ± 5,1% e 25,3 ± 1,9 µg / 100 µg, respectivamente, foram obtidos utilizando somente poli-L-lisina a 0,01%. Quando a suspensão de nanopartículas foi submetida a um campo magnético

alternado, a liberação de anfotericina B aumentou aproximadamente quatro vezes quando comparada à liberação em condições-padrão. Deste modo, o cultivo de MTB produz nanopartículas magnéticas com características físico-químicas que permitem seu uso em formulações farmacêuticas. A funcionalização com anfotericina B produz nanoformulações estáveis e com liberação controlável do fármaco, possibilitando o seu potencial de aplicação no tratamento de doenças fúngicas e parasitárias.

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas bacterianas, batelada alimentada, cultivo contínuo, funcionalização de magnetossomos, anfotericina B.

ABSTRACT

Correa, Tarcísio Nascimento. Otimização do processo de produção de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana funcionalizadas com anfotericina B. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

Magnetotactic bacteria (MTB) are the main biotechnological source of magnetic nanoparticles. Magnetic nanoparticles of bacterial origin or magnetosomes (BMs) are composed of a magnetite or greigite mineral core surrounded by a biological membrane. These structures have a defined shape, narrow size distribution (30-120 nm) and specific magnetic properties, which favour their application as biotechnological tools. In addition, the BMs membrane acts as a functionalization site because it has several associated proteins, where different molecules can be linked. Applications of BMs to date include drug delivery, magnetically induced hyperthermia, cell and biomolecules separation, and immobilization of enzymes. Despite its applicability, the production of BMs depends on the cultivation of MTB, which results in low yields of magnetosomes. Thus, strategies for large-scale cultivation of MTB need to be improved. Here, we describe the optimization of the bioreactor cultivation of *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1, which produces magnetite prismatic BMs of approximately 60 nm. Firstly, a fed batch with supplementation of iron source and N₂O injection in 24-h pulses was established. After 120 h of cultivation, the production of magnetite reached 24.5 mg.L⁻¹. The maximum productivity (16.8 mg.L⁻¹.d⁻¹) was reached between 48 and 72 h. However, the productivity and mean number of magnetosomes per cell decreased after 72 h. Therefore, continuous culture in the chemostat with intermittent injection of nitrous oxide was established. The continuous culture was able to maintain the culture with production and productivity of magnetite of 27.1 mg.L⁻¹ and 22.7 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectively, at 120 h. Those values were kept approximately constant until 168 h. This condition was reached because loss of magnetite synthesis and reduction in the number of magnetosomes per cell, which occurred in fed batch, were avoided. The purified BMs were functionalized with amphotericin B using poly-L-lysine and / or glutaraldehyde at different concentrations. The highest capture and loading efficiency of the drug, 52.7 ± 5.1%, and 25.3 ± 1.9 µg / 100 µg, respectively, were obtained using only 0.01% poly-L-lysine. When the nanoparticle suspension was subjected to an alternating magnetic field, the release of amphotericin B increased approximately four-fold as compared to the release under standard conditions. Thus, the cultivation of MTB produces magnetic nanoparticles with physical-

chemical characteristics that enable their use in pharmaceutical formulations. The functionalization with amphotericin B produces stable nanoformulations and with controllable release of the drug, making possible its application potential in the treatment of fungal and parasitic diseases.

Key words: bacterial magnetic nanoparticles, fed batch, continuous culture, functionalization of magnetosomes, amphotericin B.

Lista de figuras

- Figura 1. Diversidade morfológica de MTB: microscopia óptica em contraste interferencial diferencial de espirilos (A) e cocos (B); imagens de microscopia eletrônica de varredura de um procarionto multicelular magnetotático (C) e de transmissão em alta resolução de um vibrião magnetotático (D). Note a presença da cadeia de magnetossomos indicada por M e do flagelo indicado por F. Imagens retiradas do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia. 18
- Figura 2. Diversidade morfológica dos BMs produzidos por diferentes MTB: (A) prismático alongado, (B) cubooctaédricos e (C) anisotrópicos em "ponta de lança". Em B, nota-se a presença da membrana, indicada pela seta. Imagens retiradas do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia..... 19
- Figura 3. Representação esquemática das etapas de formação dos BMs com proteínas que controlam cada etapa. Adaptado de MURAT *et al.*, 2010. 20
- Figura 4. Esquema de funcionalização química de BMs isolados com fármacos através das abordagens covalente e eletrostática..... 26
- Figura 5. Resumo das aplicações de BMs funcionalizados quimicamente com moléculas terapêuticas..... 28
- Figura 6. Cinética de crescimento de *Mv. blakemorei* e produção de BMs em batelada alimentada em biorreator de 5 litros. (A) Crescimento celular expresso em logaritmo natural da densidade celular ($\ln X$), número de BMs por célula e concentração global de magnetita. (B) concentração (%) de Fe^{2+} , nitrogênio amínico, succinato e N_2O no meio. As concentrações de Fe^{2+} e N_2O foram ajustadas para seus níveis iniciais através de injeções do respectivo componente em intervalos de 24 h..... 40
- Figura 7. Imagem de MET de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T crescido em batelada alimentada com Fe^{2+} e suplementação de N_2O nos tempos de 48 h (A) e 120 h (B), mostrando a diminuição no número de BMs por célula ao final do cultivo (as setas indicam a cadeia de BMs)..... 41
- Figura 8. Coeficientes de transferência de massa (kLa) para o N_2O (solubilização) e O_2 (deslocamento) e tempo decorrido para a saturação de N_2O e depleção de O_2 42
- Figura 9. Cinética de crescimento de *Mv. blakemorei* e produção de BMs em cultivo contínuo (quimiostato) em biorreator de 5 litros. (A) Crescimento celular expresso em logaritmo natural da densidade celular ($\ln X$), número de BMs por célula e concentração global de magnetita. (B) concentração (%) de Fe^{2+} , nitrogênio amínico e succinato. 43
- Figura 10. Imagem de MET de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T crescido em cultivo contínuo nos tempos de 48 h (A) e 120 h (B), mostrando a manutenção no número de BMs por célula ao longo do cultivo (As setas indicam a cadeia de BMs)..... 44
- Figura 11. Percentual de AmB ligada e carregamento do fármaco nos diferentes tratamentos testados. Os testes ANOVA mostraram diferença estatisticamente significativa nos valores de eficiência de ligação e carregamento ($p < 0,0001$, ****). 46
- Figura 12. Imagens de MET de BMs livres (A) e seus conjugados: BM-AmB (B), BM-GA-AmB (C), BM-PLL-GA-AmB (D) e BM-PLL-AmB (E). Observe o aumento da espessura da membrana para diferentes preparações. Espessura média da membrana ($n \geq 60$) dos diferentes conjugados (F). Os testes ANOVA mostraram diferença estatisticamente significativa nos valores de espessura ($p < 0,0001$, ****). 47
- Figura 13. Potencial zeta de BMs e dos conjugados. Os símbolos representam cada medida individual do potencial em milivolts (mV). BM (●), BM-AmB (■), BM-GA-AmB (▲), BM-PLL-GA-AmB (▼) e BM-PLL-AmB (◆)..... 48
- Figura 14. Espectros de FTIR de BMs, AmB e conjugados mostrando picos usados para a identificação de funcionalização..... 49

Figura 15. Espectro de UV-Vis de preparações selecionadas (BM-PLL-AmB, BM-PLL-GA-AmB) indicando os três picos de absorção característicos da AmB. Note a ausência desses picos na amostra contendo apenas BMs.	50
Figura 16. Representação estrutural dos BMs (A), AmB (B) e seus conjugados: BM-GA-AmB (C), BM-PLL-GA-AmB (D) e BM-PLL-GA (E).	51
Figura 17. Curva de magnetização de BMs de <i>Mv. blakemorei</i> liofilizados. No inserto, nota-se a histerese exibida pelas nanopartículas.	52
Figura 18. Variação de temperatura em suspensões de BMs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T em duas diferentes concentrações (1,2 e 4,8 mg.mL ⁻¹) ao longo de 50 min.	53
Figura 19. Perfil de liberação cumulativa de AmB a partir das formulações BM-PLL-GA-AmB e BM-PLL-AmB sob condições-padrão (37°C) e sob aplicação de um AMF.	54
Figura 20. Estabilidade de nanoformulações em termos de quantidade de AmB que permanece ligada a nanopartículas após 3 ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento.	54
Figura 21. Nanopartículas magnéticas artificiais produzidas por diferentes métodos: nanopartículas de magnetita produzidas por coprecipitação simples (A) e na presença de poliarginina (B) (Baumgartner <i>et al.</i> , 2014); nanocubos de magnetita produzidos por decomposição térmica (C) (Shen <i>et al.</i> , 2014); nanopartículas de greigita similares a BMs produzidas por decomposição térmica (D) (Feng <i>et al.</i> , 2013).	62

Lista de tabelas

Tabela 1. Sumário dos cultivos em larga escala de MTB descritos na literatura e seus respectivos valores de produção e produtividade.	22
Tabela 2. Valores máximos de produção e produtividade em magnetita e percentagem de células não-magnéticas em batelada alimentada nos tempos de 72 e 120 h.	41
Tabela 3. Valores máximos de produção e produtividade em magnetita e percentagem de células não-magnéticas em cultivo contínuo nos tempos de 72 e 120 h.	44
Tabela 4. Sumário da análise de custo comparando métodos químicos e biotecnológicos para a produção de nanopartículas magnéticas.	45
Tabela 5. Preços e valores de solubilidade de gases usados em cultivos de MTB.	57

Lista de abreviaturas

AmB	anfotericina B
AMF	campo magnético alternado (<i>alternating magnetic field</i>)
ANOVA	análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
ASW	água do mar artificial (<i>artificial seawater</i>)
BM	magnetossomos bacterianos, do inglês <i>bacterial magnetossomes</i>
EMT-6	tumor mamário experimental (<i>Experimental Mammary Tumour-6</i>)
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared</i>)
GA	glutaraldeído
GM1	monosialotetrahexosilgangliosídeo
GM3	monosialodihexosilgangliosídeo
HL60	linhagem de leucemia humana 60 (<i>human leukaemia lineage 60</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
<i>mam</i>	<i>magnetosome membrane</i>
MET	microscopia eletrônica de transmissão
<i>mms</i>	<i>magnetic-particle-membrane specific</i>
MTB	bactérias magnetotáticas, do inglês <i>magnetotactic bacteria</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
PEG 4000	polietileno glicol de massa molecular 4000
PLL	poli-L-lisina
RPM	rotações por minuto
U2OS	linhagem de osteocarcinoma humano
UV-Vis	espectroscopia no ultravioleta-visível
YTS-1	linhagem de carcinoma de bexiga humano

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Nanobiotecnologia	16
1.2. Bactérias magnetotáticas	16
1.3. Magnetossomos	18
1.4. Cultivo em larga escala de MTB	21
1.5. Nanopartículas magnéticas e aplicações dos BMs	25
1.6. Justificativa	28
2. Objetivos	30
3. Metodologia	31
3.1. Cultura bacteriana	31
3.2. Cultivo em biorreator	32
3.2.1. Batelada alimentada	32
3.2.2. Cultivo contínuo (quimiostato)	32
3.3. Análise de crescimento	33
3.4. Determinação do consumo de nutrientes	33
3.5. Transferência de massa	33
3.6. Isolamento dos BMs	34
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	34
3.8. Determinação das medidas dos BMs	35
3.9. Quantificação de magnetita produzida	35
3.10. Análise de custo	36
3.11. Preparação de nanopartículas funcionalizadas	36
3.12. Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	37
3.13. Espectrometria no ultravioleta-visível (UV-Vis)	37
3.14. Potencial zeta	37
3.15. Hipertermia magnética	38
3.16. Perfil de liberação do fármaco	38
3.17. Estabilidade durante congelamento-descongelamento	39
4. Resultados	39
4.1. Batelada alimentada	39
4.2. Transferência de massa	42
4.3. Cultivo contínuo	42
4.4. Análise de custo	44
4.5. Funcionalização de nanopartículas	45
5. Discussão	55
5.1. Batelada alimentada	55

5.2.	Transferência de massa	57
5.3.	Cultivo contínuo.....	58
5.4.	Análise de custos.....	60
5.5.	Nanoformulações	64
6.	Conclusão	67
7.	Referências	69

1. Introdução

1.1. Nanobiotecnologia

A nanotecnologia e a biotecnologia se desenvolveram expressivamente nas últimas décadas. Ao mesmo tempo, a interface entre essas duas grandes áreas da tecnologia tem se expandido, gerando conhecimentos básicos e aplicados sobre a síntese biológica de nanomateriais e a utilização de ferramentas nanotecnológicas para fins biomédicos (Nikiforov e Filinova, 2009). Neste sentido, nanopartículas magnéticas evidenciam grandemente esta interface. A obtenção destes nanomateriais podem ocorrer através de métodos biotecnológicos e suas aplicações abrangem a biocatálise, a tecnologia farmacêutica e a medicina diagnóstica (Kudr *et al.*, 2017; Lloyd, Byrne e Coker, 2011; Vargas *et al.*, 2018).

Diante disso, os métodos de síntese de nanopartículas magnéticas foram revisados e otimizados para melhorar a qualidade das nanopartículas produzidas (Reddy *et al.*, 2012). Diferentes métodos químicos são descritos, sendo a decomposição térmica e a coprecipitação os mais empregados (Reddy *et al.*, 2012). Alternativamente, métodos de química verde como precipitação com extratos de plantas e biomineralização por microrganismos têm sido explorados como uma alternativa mais limpa para a síntese química clássica (Shahwan *et al.*, 2011; Truskewycz, Shukla e Ball, 2018). Durante a síntese de nanopartículas magnéticas por microrganismos apenas são consumidos componentes biocompatíveis necessários ao crescimento microbiano e biomineralização (Shahwan *et al.*, 2011; Truskewycz, Shukla e Ball, 2018).

1.2. Bactérias magnetotáticas

A principal fonte de nanopartículas magnéticas microbianas são as bactérias magnetotáticas (MTB, do inglês *magnetotactic bacteria* – Lloyd *et al.*, 2011). Estes microrganismos foram descobertos na Itália em 1958 quando Salvatore Bellini observava por microscopia ótica amostras de água da cidade de Pávia (Bellini, 2009). As MTB compreendem um grupo diverso de procariotos aquáticos Gram-negativos com a capacidade de se orientar ao longo das linhas de um campo magnético (Bazylinski e Frankel, 2004). A orientação magnética passiva da bactéria e a natação ativa através de propulsão flagelar são conjuntamente definidas como magnetotaxia (Frankel e Bazylinski, 2009). A magnetotaxia confere caráter de locomoção unidirecional por ambientes quimicamente estratificados na

coluna d'água e/ou sedimentos. MTB nadam ativamente em busca da interface óxica-anóxica na qual a força próton-motiva é máxima (Bazylinski e Frankel, 2004). A maioria das MTB é descrita como microaerófilas e anaeróbias estritas ou facultativas (Bazylinski e Frankel, 2004).

A combinação de estudos morfológicos e filogenéticos tem ajudado a compreender a complexa diversidade encontrada nas comunidades de MTB (Lin *et al.*, 2014). Observações de amostras ambientais através de microscopia óptica e eletrônica já caracterizaram morfologias dos tipos cocos, espirilos, vibriões, bacilos e multicelulares (Lefèvre e Bazylinski, 2013; Figura 1). Análises filogenéticas já confirmaram a existência de representantes procarióticos magnetotáticos nos filos Proteobacteria (classes Alpha-, Beta-, Gamma- e Deltaproteobacteria), Nitrospirae e Omnitrophica (Abreu *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). Além da diversidade morfológica e taxonômica, a distribuição destes organismos é global, sendo encontrados em ambientes aquáticos, como mares, lagoas, estuários e sedimentos marinhos (Lin *et al.*, 2014). A ocorrência de MTB em ambientes extremos é comum e já foram reportados representantes magnetotáticos de caráteres termófilo, psicrofilo, alcalófilo, acidófilo e halófilo (Abreu *et al.*, 2016; Bazylinski e Lefèvre, 2013).

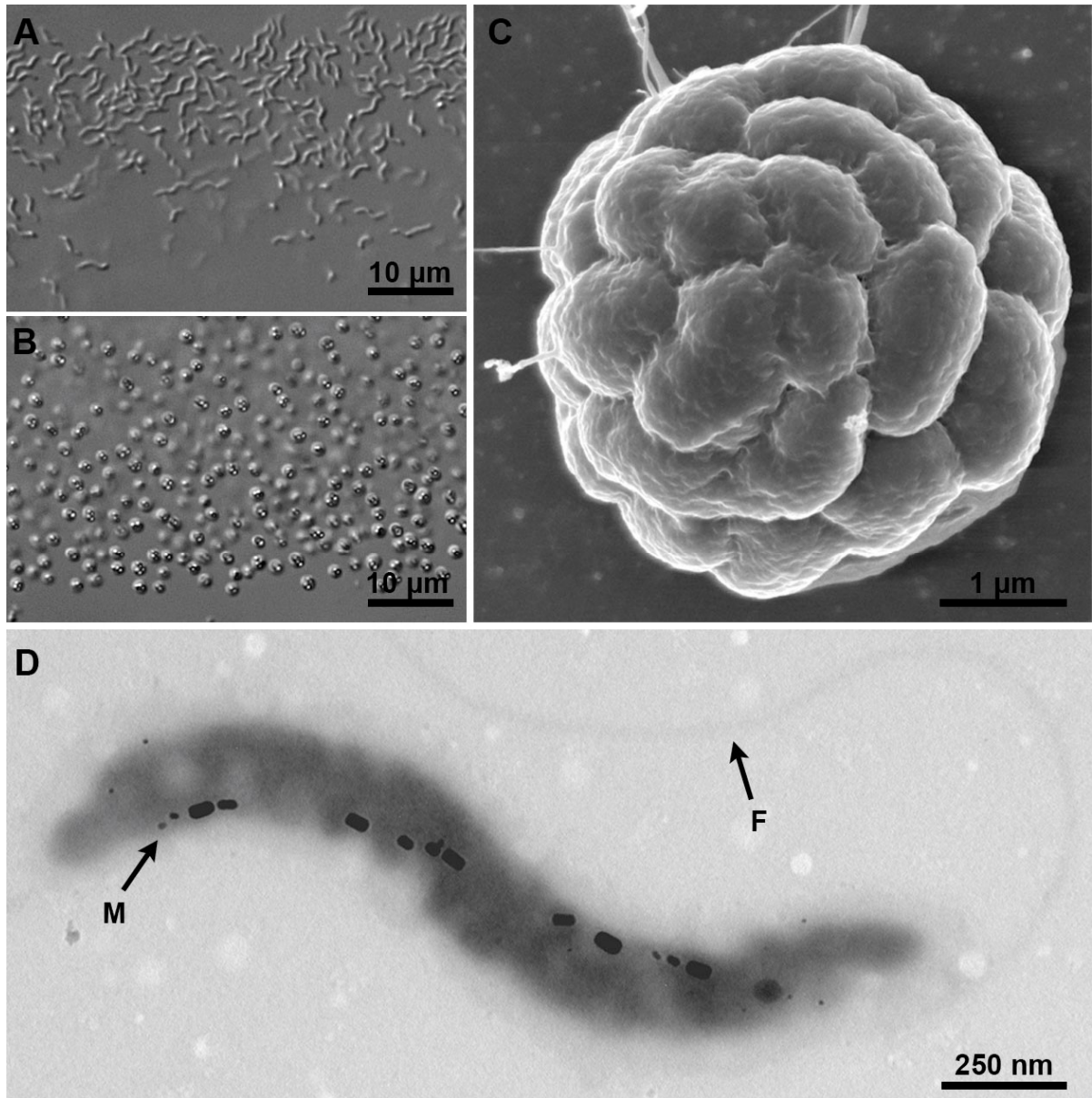


Figura 1. Diversidade morfológica de MTB: microscopia óptica em contraste interferencial diferencial de espirilos (A) e cocos (B); imagens de microscopia eletrônica de varredura de um procarioto multicelular magnetotático (C) e de transmissão em alta resolução de um vibrião magnetotático (D). Note a presença da cadeia de magnetossomos indicada por M e do flagelo indicado por F. Imagens retiradas do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

1.3. Magnetossomos

As nanopartículas magnéticas produzidas pelas MTB são denominadas magnetossomos (BMs, do inglês *bacterial magnetosomes*) e encontram-se organizadas em uma ou mais cadeias no citoplasma bacteriano. Esta disposição espacial dos BMs confere à célula um momento de dipolo magnético e, conseqüentemente, a capacidade de responder ao campo geomagnético ou campo magnético aplicado (Blakemore e Maratea, 1979). Os BMs

são compostos por um cristal magnético constituído por mineral de ferro (magnetita - Fe_3O_4 - ou greigita - Fe_3S_4), envolto por uma membrana fosfolipídica (Bazylinski e Frankel, 2004). A morfologia dos cristais de BMs tende a ser única em uma espécie particular, sendo as três principais morfologias de cristais de magnetita encontradas são cuboetaédrica, prismática alongada e anisotrópica em forma de “ponta de lança” (Lower e Bazylinski, 2013; Figura 2). A membrana magnetossomal ainda contém proteínas associadas, que controlam o processo de biomineralização (Arakaki *et al.*, 2016; Grünberg *et al.*, 2004).

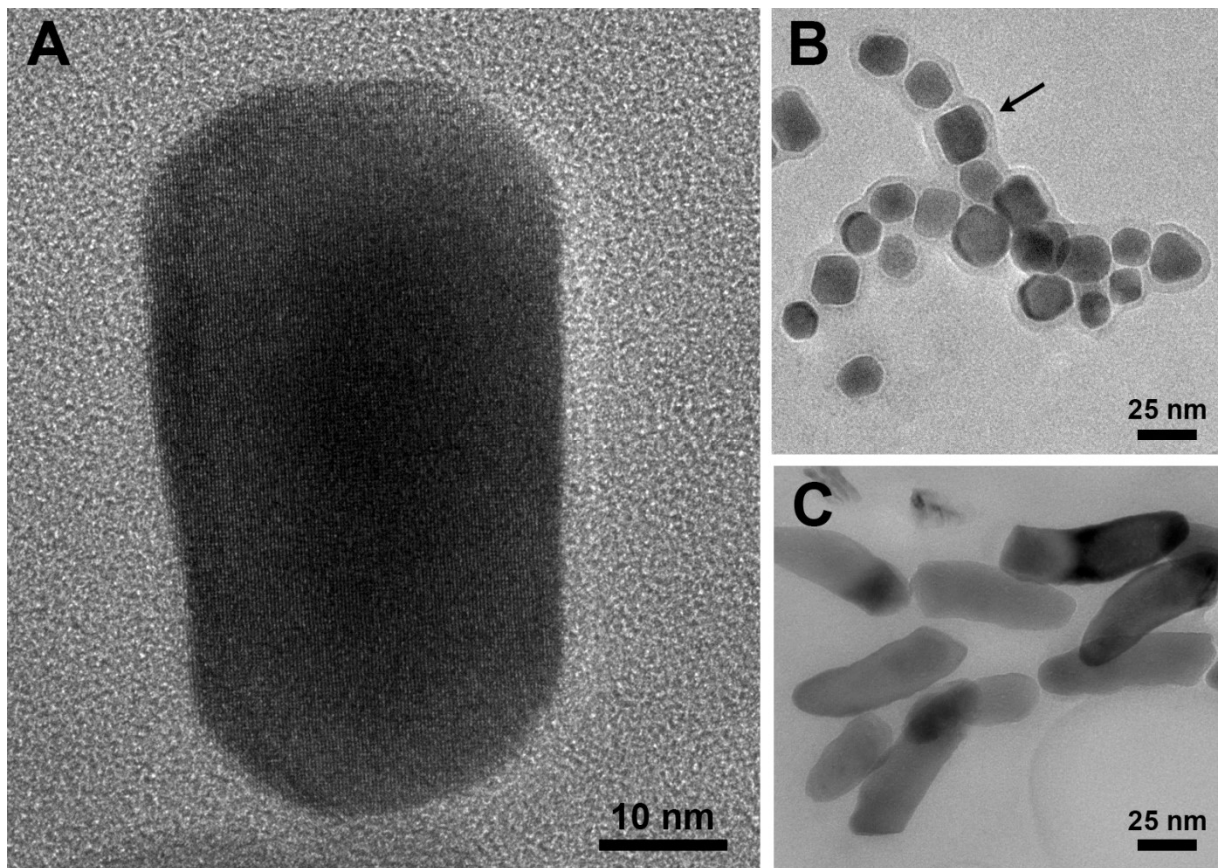


Figura 2. Diversidade morfológica dos BMs produzidos por diferentes MTB: (A) prismático alongado, (B) cuboetaédricos e (C) anisotrópicos em "ponta de lança". Em B, nota-se a presença da membrana, indicada pela seta. Imagens retiradas do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

O processo de síntese dos BMs é altamente controlado por uma complexa maquinaria proteica, codificada por genes específicos. No gênero *Magnetospirillum*, estes genes estão agrupados em uma região específica do genoma de aproximadamente 100 kb denominada ilha de magnetossomos (MAI, do inglês, *magnetosome island* – Barber-Zucker e Zarivach, 2017; Uebe e Schüler, 2016). A MAI contém um conjunto de aproximadamente 30 genes *mam* (denominação proveniente da expressão em inglês *magnetosome membrane*) e *mms*

(denominação proveniente da expressão em inglês *magnetic-particle-membrane specific*) (Uebe e Schüler, 2016). Foi demonstrado que, no gênero *Magnetospirillum*, os genes da MAI estão organizados em cinco operons: *feoABI*, *mms6*, *mamGFDC*, *mamXY* e *mamAB* (Uebe e Schüler, 2016). A formação dos BMs tem sido extensivamente estudada em *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 e *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1. Esses estudos serviram de base para modelos que permitem a divisão da síntese de BMs em quatro etapas (Figura 3): (i) invaginação da membrana interna da célula bacteriana; (ii) recrutamento de proteínas específicas da biomineralização para a região de invaginação da membrana; (iii) transporte dos íons ferro (Fe^{2+} e/ou Fe^{3+}) para o lúmen da vesícula e biomineralização da magnetita e (iv) alinhamento dos BMs em cadeia (Barber-Zucker e Zarivach, 2017). Apesar de frequentemente agrupadas dessa forma, as etapas de formação dos BMs não ocorrem necessariamente em ordem e podem acontecer simultaneamente (Cornejo *et al.*, 2016).

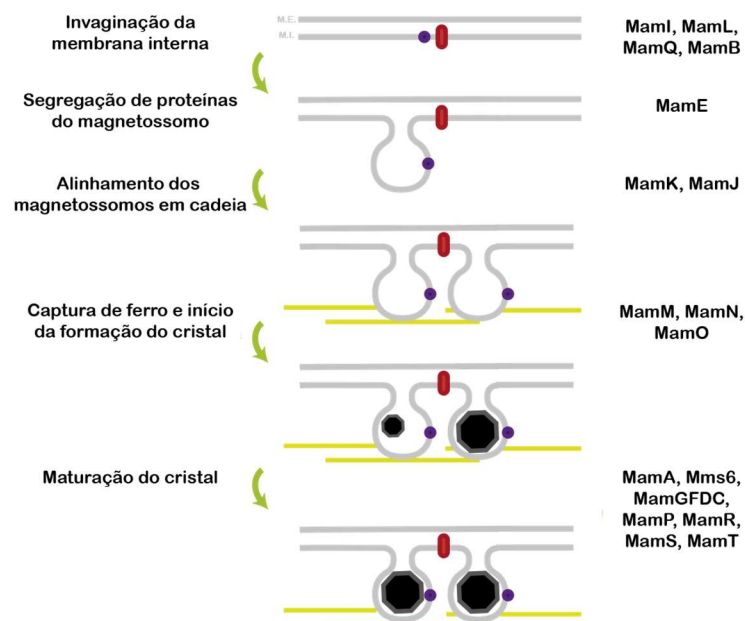


Figura 3. Representação esquemática das etapas de formação dos BMs com proteínas que controlam cada etapa. Adaptado de Murat *et al.*, 2010.

O controle genético do processo de formação dos BMs permite que essas estruturas tenham propriedades superiores às encontradas em partículas de ferro sintetizadas por métodos químicos (Alphandéry, 2014; Vargas *et al.*, 2018). Resumidamente, os BMs são explorados devido às suas características:

- **Físicas:** A nucleação do cristal de magnetita em contato com a membrana permite a estabilização de sua estrutura e direciona a direção de seu crescimento (Abreu *et al.*, 2013; Baumgartner *et al.*, 2014). Como resultado, a morfologia dos cristais de BMs tende a ser única e sua faixa de tamanho é estreita em uma espécie particular de MTB (Pósfai *et al.*, 2013). O comprimento dos BMs, que varia tipicamente de 30 a 120 nm, confere um caráter de domínio magnético único para os cristais de magnetita e greigita.
- **Químicas:** A maioria das espécies produz um único tipo de mineral nos seus BMs (Pósfai *et al.*, 2013). A entrada de ferro para o interior da vesícula do BM por meio de transportadores e a regulação do pH e das condições redox durante biomineralização leva a formação de cristais com altíssima pureza (Barber-Zucker e Zarivach, 2017). Além disso, na porção externa da membrana são encontrados grupos funcionais que servem como pontos para modificação química dos BMs (Alphandéry, 2014).
- **Físico-químicas e biológicas:** A presença da membrana constituída principalmente e lipídeos polares carregados negativamente confere estabilidade coloidal a suspensões de BMs em meio aquoso (Alphandéry, 2014). Adicionalmente, uma vez que essa membrana provém de invaginações da membrana interna da célula, os BMs isolados são livres de endotoxinas e não-imunogênicos (Alphandéry *et al.*, 2017; Yoshino *et al.*, 2008).

No entanto, devido ao crescimento lento de MTB e baixo rendimento de BMs durante o cultivo, a obtenção de grandes quantidades dessas nanopartículas é um desafio e sua aplicação em biotecnologia é dificultada (Vargas *et al.*, 2018).

1.4. Cultivo em larga escala de MTB

Para produzir grandes quantidades de BMs e tornar sua aplicação viável, são necessárias culturas de grande volume de MTB. Diversos estudos descreveram o cultivo em massa destas bactérias em biorreatores usando diferentes estratégias para alcançar a máxima produção e produtividade de magnetita (Heyen e Schuler, 2003; Liu *et al.*, 2010; Sun, Duan, *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Essas estratégias incluíram modificações no meio e condições físicas e químicas da cultura (Araújo *et al.*, 2015). O cultivo de MTB em biorreatores foi conduzido em batelada (Heyen e Schuler, 2003), batelada alimentada (Fernández-Castané *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2010; Sun, Duan, *et al.*, 2008) e modo

semicontínuo (Zhang *et al.*, 2011 – Tabela 1). A maioria dos estudos relata o crescimento de bactérias pertencentes ao gênero *Magnetospirillum* e apenas um trabalho utilizou *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T (Silva *et al.*, 2013).

Tabela 1. Sumário dos cultivos em larga escala de MTB descritos na literatura e seus respectivos valores de produção e produtividade.

Espécie / cepa	Condução do cultivo	Produção* (mg.L⁻¹)	Produtividade* (mg.L⁻¹.d⁻¹)	Referência
<i>Ms. magneticum</i> / AMB-1	B.A	9	3,7	Yang <i>et al.</i> , 2001
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.S	7,9	6,3	Heyen e Schuler, 2003
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	58,4	--	Liu <i>et al.</i> , 2008
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	41,7	16,7	Sun, Zhao, <i>et al.</i> , 2008
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	83,2	55,49	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	356,5	178,26	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	SC	168,3	83,5	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Mv. blakemorei</i> / MV-1 ^T	B.S	22,4	5,6	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Mv. blakemorei</i> / MV-1 ^T	B.A	26	3,2	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Ms. sp.</i> / ME-1	B.A	120	58,7	Ke <i>et al.</i> , 2018
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	139	47,0	Fernández-Castané <i>et al.</i> , 2018

(*) produção e produtividade de magnetita. B.A = batelada alimentada; B.S. = batelada simples; SC = cultivo semicontínuo.

Heyen e Schuler (2003) demonstraram que altas concentrações de oxigênio (O₂) são mais favoráveis ao crescimento de MTB ao passo que seu cultivo em anaerobiose é melhor para formação e alto rendimento de cristais. Em uma batelada para o crescimento de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, a concentração de O₂ foi diminuída de 20 para 2 mbar durante a fase exponencial de crescimento de MSR-1 em meio rico em ferro. Após 4 h decorridas da diminuição do O₂, a produção de magnetita começou a ser detectada nas células, aumentando

até atingir a fase estacionária (Heyen e Schuler, 2003). Por isso, vários trabalhos se preocuparam em manter concentrações de O₂ mínimas para o crescimento de modo a não prejudicar a síntese, e a favorecer simultaneamente os dois fenômenos biológicos (Heyen e Schuler, 2003; Liu *et al.*, 2010; Sun, Duan, *et al.*, 2008). Neste sentido, uma das estratégias disponível em diferentes biorreatores (Macauley-Patrick e Finn, 2008) e usadas no crescimento de MTB consiste em aumentar a agitação das pás quando a concentração de O₂ diminui abaixo de um determinado limiar. Isto faz com que a concentração deste gás aumente devido à maior transferência gás-líquido provocada pela agitação mais intensa (Waites *et al.*, 2001). Entretanto, este aumento ocorre de modo gradativo e, uma vez atingida a concentração ideal de O₂, a agitação diminui, evitando-se condições de aerobiose.

Durante o cultivo da cepa MSR-1 em batelada alimentada, Sun e colaboradores (2008) permitiram que a concentração inicial de O₂ fosse diminuída pelo consumo durante o crescimento em fase exponencial (Sun, Zhao, *et al.*, 2008). A suplementação de lactato foi utilizada para manter a concentração alta da fonte de carbono. Após o crescimento inicial, a concentração de O₂ diminui devido ao seu consumo. O modo cascata foi empregado repetitivamente de modo a manter a concentração de O₂ em um nível ideal para produção de BMs e crescimento celular.

Outra estratégia frequentemente usada em MTB é a batelada com alimentação acoplada ao controle de pH (Fernández-Castané *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Esta estratégia consiste na suplementação dos nutrientes consumidos através de um meio de alimentação contendo altas concentrações de ácido láctico (fonte de carbono) e, conseqüentemente, pH ácido. À medida em que o crescimento bacteriano ocorre, os nutrientes são consumidos e o pH aumenta. O biorreator, então, acrescenta automaticamente o meio de alimentação como resposta ao pH aumentado na tentativa de neutralizá-lo. Conseqüentemente, o pH é ajustado simultaneamente à suplementação da fonte de carbono e outros nutrientes. O primeiro trabalho descrevendo esta estratégia (Liu *et al.*, 2010) empregou tal controle pois, através do cultivo da cepa MSR-1 em biorreator de 7,5 L, foi observado que concentrações altas de lactato inibiam o crescimento celular. Então, a suplementação de um meio de controle de pH contendo as fontes de carbono, nitrogênio e ferro manteve as concentrações de lactato de sódio e outros nutrientes baixas durante o cultivo. Esta estratégia foi utilizada no posterior cultivo em um fermentador de 42 L que resultou em uma alta densidade de células e crescimento rápido da cepa MSR-1.

O meio de manutenção de pH desenvolvido por Liu e colaboradores (2010) serviu de base para as estratégias de batelada alimentada propostas em outros trabalhos (Fernández-Castané *et al.*, 2018; Ke *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2011). Fernández-Castané e colaboradores (2018) compararam diferentes concentrações de ácido láctico (fonte de carbono) e nitrato de sódio (aceptor final de elétrons) no meio de alimentação. Os resultados da otimização do processo sugeriram que a maior concentração de nitrato testada (25 g.L⁻¹) na alimentação levou à maior produção de biomassa. Entretanto, a concentração de ácido láctico nesse meio foi diretamente proporcional à produção de BMs embora o crescimento celular fosse inversamente proporcional. O meio de alimentação apresentava pH próximo a 3 devido às altas concentrações de ácido láctico testadas (50-200 g.L⁻¹) e foi acrescentado de acordo com a necessidade de ajuste de pH. Esta suplementação discreta de ácido láctico levou a um balanço entre o aumento da produção de BMs e o crescimento celular. Como resultado, foi alcançada uma produção de 4,2 g.L⁻¹ de biomassa seca e 139 mg.L⁻¹ de magnetita em 71 h de cultivo.

Os maiores valores de produção (356,5 mg.L⁻¹) e produtividade (178,26 mg.L⁻¹.d⁻¹) de BMs até a presente data foi obtido por Zhang e colaboradores (2011). O cultivo da cepa MSR-1 foi realizado em biorreator no qual as fontes de carbono e nitrogênio foram substituídas para reduzir o potencial osmótico do meio, fator que tende a inibir o crescimento celular. O lactato e NH₄⁺ foram escolhidos para suplementar o cultivo de forma a manter as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio no meio entre 0,17 e 1,26 g.L⁻¹ e 0,07 e 0,23 g.L⁻¹, respectivamente. Além disso, foi utilizada uma estratégia de cultivo semicontínuo em dois estágios. No primeiro, as células foram cultivadas em biorreator de 7,5 L até o final da fase log por 30h. Então, 0,5 L deste meio foi adicionado a 4,5 L de meio novo, realizando o segundo estágio do cultivo

Silva e colaboradores (2013) otimizaram o cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, levando o cultivo em larga escala para além do gênero *Magnetospirillum*. A alfaproteobactéria magnetotática *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T foi isolada de uma amostra sedimento proveniente da baía de Massachusetts (EUA). Esta espécie produz cristais de magnetita de morfologia prismática organizados em cadeia única com dimensões médias de 53 ± 11 nm em comprimento e 35 ± 8 nm em largura (Sparks *et al.*, 1990). No cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, vários compostos podem ser usados como doadores de elétrons e fonte de carbono, sendo capazes de crescer em microaerofilia e anaerobiose utilizando óxidos de nitrogênio. Entretanto, as células produzem maior número médio de BMs quando são

criadas em anaerobiose com N_2O como aceptor final de elétrons. No trabalho de Silva e colaboradores (2013), foram utilizadas ferramentas de planejamento experimental para otimizar a produção de cristais prismáticos de magnetita por MV-1^T cultivada em meio líquido descrito por Bazylinski (2013) com óxido nitroso (N_2O) como aceptor final de elétrons e sulfato ferroso ($FeSO_4$) como a fonte de ferro II (Fe^{2+}). Através do planejamento experimental, foi determinada uma composição ótima para o meio de cultivo da cepa MV-1^T. A produção máxima de magnetita no meio otimizado em biorreator de 5 litros foi de 22,4 $mg.L^{-1}$ em 96 h, resultando numa produtividade de 5,6 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, aproximadamente 3 vezes maior do que no meio inicial. A otimização do cultivo de *Mv. blakemorei* em biorreator é interessante pois seus BMs prismáticos apresentam uma superfície disponível maior que a dos BMs cuboctaédricos do gênero *Magnetospirillum* (Bazylinski *et al.*, 2013), o que pode ser vantajoso para a funcionalização e aplicação (Silva *et al.*, 2013).

1.5. Nanopartículas magnéticas e aplicações dos BMs

Uma vez atingida a produção em larga escala com alta produtividade, baixo custo e características físico-químicas controladas, torna-se viável a aplicação de nanopartículas magnéticas em ciências farmacêuticas e biomédicas (Kwon *et al.*, 2018; Schwartz-Duval e Shapiro, 2014). Devido à responsividade a campos magnéticos externos, estas nanopartículas podem ser usadas como uma ferramenta versátil no transporte de fármacos (Kudr *et al.*, 2017). Neste sentido, tanto campos magnéticos permanentes como alternados são utilizados para o controle da ação de nanoformulações magnéticas (Mura, Nicolas e Couvreur, 2013). Na presença de um campo magnético permanente, as nanopartículas podem ser direcionadas para o sítio de infecção ou formação neoplásica, levando a um acúmulo e retenção do fármaco nestes locais (Kudr *et al.*, 2017). Este direcionamento evita efeitos adversos secundários causados por absorção sistêmica de fármacos de alta toxicidade (Kudr *et al.*, 2017). A aplicação de um campo magnético alternado (AMF, do inglês *alternating magnetic field*) induz o aumento de temperatura (hipertermia) das nanopartículas magnéticas (Nikiforov e Filinova, 2009). A hipertermia pode ser utilizada por si para a destruição de células neoplásicas e parasitárias sem afetar células de tecidos saudáveis (Berry *et al.*, 2019; Nikiforov e Filinova, 2009). Quando aplicado sobre nanoformulações magnéticas, o AMF a liberação de moléculas de fármaco de modo controlado devido ao aumento da agitação das nanopartículas (Mura, Nicolas e Couvreur, 2013).

A inserção de moléculas de fármacos à superfície de nanopartículas magnéticas é realizada por conjugação química de formas covalente e não-covalente (Ulbrich *et al.*, 2016). Grupamentos amino (-NH₂), presentes na estrutura de proteínas de membrana, são abundantes na superfície dos BMs. Estes grupamentos são reativos com moléculas de ligação cruzada (aldeídos, genipina, etc.) e formam ligações covalentes com moléculas de fármacos (Vargas *et al.*, 2018; Figura 4). Além disso, os BMs possuem superfície carregada negativamente (Alphandéry, 2014). Deste modo, estas nanopartículas podem ser recobertas com poliaminoácidos carregados positivamente que, por sua vez, podem incorporar moléculas de fármaco através de interação eletrostática (Sun *et al.*, 2011; Figura 4).

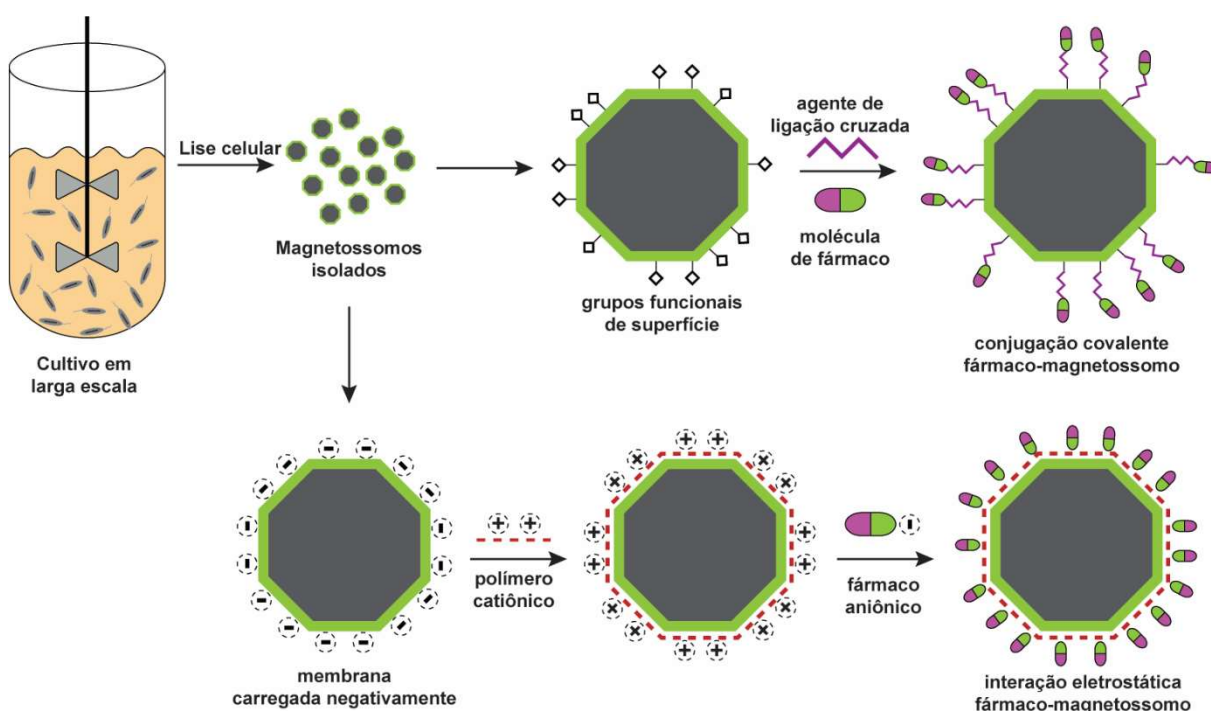


Figura 4. Esquema de funcionalização química de BMs isolados com fármacos através das abordagens covalente e eletrostática.

Uma das primeiras nanoformulações preparadas com BMs foi um complexo formado com o fármaco antitumoral doxorrubicina. Os BMs foram isolados de *Ms. gryphyswaldense* cepa MSR-1 e foi utilizado glutaraldeído (GA) como agente de ligação cruzada (Sun, Duan, *et al.*, 2008). Neste complexo, 1,0 mg de BM foi ligado a 0,87 mg de doxorrubicina. A ligação entre a superfície do BM e a doxorrubicina foi estável e a liberação do fármaco a partir do complexo foi muito lenta. Oitenta por cento do fármaco permaneceu ligado ao complexo após 48 h de incubação. Este resultado indica que este complexo não é degradado na circulação sistêmica e a maior parte da doxorrubicina não é liberada significativamente antes de atingir seu tecido alvo. A atividade antitumoral do complexo BM-doxorrubicina foi confirmada

contra as linhagens celulares HL60 e EMT-6 de câncer da mama de camundongo. Posteriormente, foi desenvolvido um complexo formado pela co-imobilização de doxorubicina com o plasmídeo antineoplásico phsP70-Plk1-shrNa (Cheng *et al.*, 2016). O complexo foi utilizado no tratamento *in vitro* de células U2OS (osteocarcinoma humano) na presença de um AMF. A combinação dos tratamentos gênico, farmacológico e por hipertermia resultou em uma taxa de apoptose de 79,3% nas células testadas.

Em outro estudo de liberação de fármacos antitumorais (Deng *et al.*, 2013), fez-se uso de genipina e ácido poli-láctico-glutâmico como reagentes de ligação cruzada para imobilização de citarabina. Diferentes condições de preparação foram testadas e a maior eficiência de ligação (por exemplo, quanto do fármaco se ligou efetivamente ao BM) foi de 64,1%, enquanto a carga de fármaco atingiu 38,9%. Quando sua atividade antitumoral foi testada, a eficiência inibitória exibida pelo complexo de BM-fármaco foi semelhante àquela do fármaco livre. No entanto, o complexo magnético mostrou um perfil de liberação do fármaco a longo prazo; 40 dias de incubação foram necessários para uma liberação de 90% do complexo. Esta propriedade de estabilidade implica que menos administrações seriam utilizadas em um potencial tratamento antitumoral.

Em outro trabalho (Guan *et al.*, 2015), BMs foram aplicados para imobilização dos gangliosídeos monosialotetrahexosilgangliosídeo (GM₁) e monosialodihexosilgangliosídeo (GM₃). Os BMs foram funcionalizados por tratamento ultrassônico moderado e a carga de gangliosídeos foi de 11,7 µg para GM₁ e 11,6 µg para GM₃. A imobilização do GM₁ na superfície do BMs aumentou a captação do gangliosídeo pelas células YTS-1. A imobilização de GM₃ aumentou a inibição da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico em células de carcinoma epidérmico humano. Ambos os efeitos foram maiores quando o campo magnético foi aplicado nos experimentos.

As funcionalizações dos BMs com moléculas terapêuticas, bem como suas aplicações, estão resumidas na figura 5. Outras aplicações dos BMs como nanopartículas funcionais incluem: diagnóstico por imagem por ressonância magnética nuclear (Mériaux *et al.*, 2015); tratamento não-farmacológico de tumores por hipertermia (Alphandéry *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012); detecção e isolamento de patógenos alimentares (Li *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014); separação magnética de células sanguíneas (Maeda *et al.*, 2008; Takahashi, Yoshino e Matsunaga, 2010; Yoshino *et al.*, 2008) e biocatálise (Honda, Tanaka e Yoshino, 2015; Matsunaga e Kamiya, 1987). Entretanto, para os dois últimos grupos de aplicações, faz-se

necessária a expressão de anticorpos e enzimas exógenas na superfície do BM através de um sistema de engenharia genética desenvolvido para o gênero *Magnetospirillum* (Borg *et al.*, 2014; Yoshino e Matsunaga, 2006). Através deste sistema, peptídeos funcionais são expressos de forma recombinante ancorados a proteína transmembrana MamC.

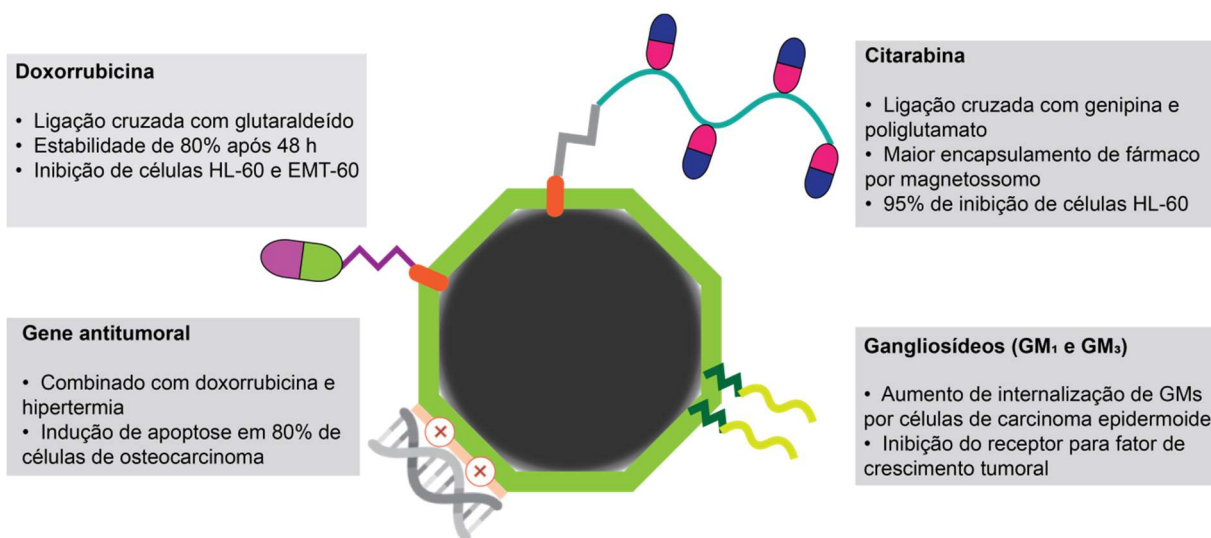


Figura 5. Resumo das aplicações de BMs funcionalizados quimicamente com moléculas terapêuticas.

1.6. Justificativa

Um dos fatores que limita a utilização dos BMs como ferramentas biotecnológicas é sua baixa produção nos cultivos em larga escala de MTB. Um dos obstáculos desse cultivo é a ocorrência de mutantes não magnéticos espontâneos, frequentemente encontrados na fase de crescimento estacionária de espécies do gênero *Magnetospirillum* (Schübbe *et al.*, 2003). O mesmo fenômeno foi reportado em cultura líquida de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Dubbels *et al.*, 2004). A incapacidade de produzir BMs nessas células é devida a deleções em diferentes sítios da MAI (Ullrich *et al.*, 2005). Durante o crescimento em biorreator, uma estratégia promissora seria evitar a fase estacionária, a fim de prevenir a perda da capacidade de síntese de BMs pelas células. Para manter as células crescendo em um estado constante correspondente ao crescimento exponencial, é necessário o uso do crescimento contínuo. A cultura contínua deve ser capaz de manter o crescimento a uma determinada taxa indefinidamente (por exemplo, próxima à taxa máxima de crescimento) à medida em que o meio fresco estéril é inserido no reator e o meio gasto com metabólitos e células é removido (Hoskisson e Hobbs, 2005). A capacidade da bactéria *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em crescer

em anaerobiose utilizando apenas o N₂O é vantajosa para a otimização do cultivo. O uso deste gás como único aceptor final de elétrons dispensa o uso de estratégias complexas necessárias para garantir o crescimento celular em microaerofilia e a produção de BMs em anaerobiose, como ocorre com cepas do gênero *Magnetospirillum*.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos fármacos tem sido limitado pelo seu alto custo, longo processo de pesquisa e um baixo número de novos medicamentos têm sido aprovados (Nunes-Alves, 2015). Neste sentido, a aplicação de nanomateriais como agente de carreamento de fármacos tem se mostrado promissora, pois aumenta a eficácia terapêutica e a segurança de fármacos já existentes (Estanqueiro *et al.*, 2015). A maioria das pesquisas sobre aplicação de nanopartículas em saúde é focada na terapia do câncer. Entretanto, é provado que progressos em tratamentos de infecções fúngicas (Niemirowicz *et al.*, 2016; Saldanha *et al.*, 2016) e parasitárias (Berry *et al.*, 2019) também podem ser feitos através da aplicação de nanopartículas magnéticas. A anfotericina B (AmB) é um antibiótico natural do tipo polieno e foi descoberta em 1955 quando foi purificada do caldo fermentativo do fungo *Streptomyces nodosus*, originalmente isolado do sedimento do rio Orinoco, na Venezuela (Linke, Mechlinski e Schaffner, 1974). Os mecanismos de ação antibiótica da AmB, estudado em modelos de leveduras, são: (i) ligação do fármaco ao ergosterol, um esteroide fundamental em diversos processos celulares, e (ii) permeabilização da membrana através da formação de canais na membrana do patógeno (Gray *et al.*, 2012). A formulação lipossomal da AmB representa uma segunda linha de tratamento farmacológico contra leishmanioses viscerais e cutâneas (Tamiru *et al.*, 2016; Wijnant *et al.*, 2018). Além disso, apresenta alta eficácia quando utilizada em combinações antifúngicas em casos meningite criptocócica em pacientes HIV-positivos (Molloy *et al.*, 2018; Williamson *et al.*, 2016). Entretanto, em alguns pacientes, a terapia com AmB deve ser descontinuada devido a sua elevada toxicidade. As manifestações clínicas mais comuns são: náusea, febre, vômitos, calafrios, hiper- ou hipotensão arterial e hipóxia (Laniado-Laborín e Cabrales-Vargas, 2009). A primeira formulação de AmB (Fungizone®) foi aprovada em 1958. Devido à toxicidade e a problemas de solubilidade em meio aquoso em pH fisiológico, foram desenvolvidas novas formulações lipossomais (AmBisome®, Abelcet® e Amphocil®) (Torrado, Espada e Ballesteros, 2008). Neste sentido, o uso de BMs para a imobilização da AmB também poderia atenuar os seus efeitos colaterais e, adicionalmente, a presença de uma membrana biológica poderia melhorar a biocompatibilidade e a dispersibilidade do fármaco em condições fisiológicas. Além disso, como discutido anteriormente, os BMs da espécie *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T podem

apresentar uma maior superfície disponível para imobilização de fármacos em relação aos BMs do gênero *Magnetospirillum*, já utilizados em estudos anteriores de funcionalização (Bazylnski *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

2. Objetivos

No presente trabalho, é proposto:

a. otimização da produção de magnetossomos em larga escala através do cultivo da espécie *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em cultura contínua (quimiostato) com injeção de N₂O, na qual as condições da fase logarítmica são mantidas constantes, incluindo a alta concentração de nutrientes. Além disso, foi feita uma análise de custo do processo desenvolvido em comparação a métodos da literatura.

b. desenvolvimento de protocolo para a imobilização da AmB na superfície de magnetossomos, avaliando a eficiência dessa imobilização, bem como a caracterização da nanoformulação desenvolvida quanto ao seu potencial de utilização associada à hipertermia magnética e estabilidade frente ao congelamento-descongelamento.

No que diz respeito ao crescimento da bactéria em quimiostato, os objetivos específicos são:

a. cultivar *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em batelada alimentada com Fe²⁺ e N₂O, avaliando o crescimento, produção de magnetossomos, bem como o perfil de consumo destes dois componentes do meio;

b. medir as taxas de transferência gás-líquido de entrada de N₂O no meio e saída de O₂ no cultivo em batelada alimentada;

c. realizar o cultivo em cultura contínua no modo de quimiostato, utilizando uma estratégia otimizada de injeção de N₂O, também monitorando o perfil de crescimento, produção e produtividade de magnetossomos, bem como as concentrações de nutrientes durante esta modalidade de crescimento;

d. realizar uma análise preliminar do custo de cultivo em cultivo contínuo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, comparando os custos de produção de magnetita com os da produção por *Ms. gryphiswaldense* e por diferentes protocolos de síntese química.

Em relação à imobilização do fármaco ao magnetossomos, os objetivos específicos são:

a. avaliar, por meio de espectrofotometria, a eficiência de imobilização de anfotericina B aos magnetossomos purificados a partir da cultura de de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T utilizando diferentes concentrações de GA e poli-L-lisina (PLL);

b. caracterizar as nanopartículas conjugadas com anfotericina B por meio de microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopias de infravermelho e ultravioleta e avaliação de potencial zeta;

c. avaliar o aumento de temperatura das nanopartículas quando submetidas a um AMF para investigar a aplicabilidade destas em hipertermia;

d. avaliar a estabilidade e liberação do fármaco das nanopartículas em condições padrão e quando submetidas a um AMF;

e. avaliar a estabilidade e liberação do fármaco das nanopartículas durante ciclos de congelamento-descongelamento.

3. Metodologia

3.1. Cultura bacteriana

Células de *Mv. blakemorei* MV-1^T foram gentilmente cedidas pelo professor Dennis Bazylinski (Faculdade de Ciências da Vida - Universidade de Nevada em Las Vegas, EUA). As células eram estocadas N₂ líquido na forma de alíquotas de 2 mL contendo meio de cultivo padrão (Bazylinski *et al.*, 2013) e glicerol a 20%. As células foram cultivadas em anaerobiose em meio otimizado anteriormente descrito pelo nosso grupo (Anexo 1; Silva *et al.*, 2013) em frascos de 50 mL por 48 h a 28 °C antes de serem usados em experimentos de fermentação.

3.2. Cultivo em biorreator

3.2.1. Batelada alimentada

Volumes correspondentes a uma concentração final de 10^8 células.mL⁻¹, calculada a partir da densidade celular do inóculo e do volume de meio no biorreator, foram inoculados em um biorreator de bancada de 5 L (volume de trabalho de 2 L) (Minifors, Infors HT - Basileia, Suíça) contendo meio de crescimento fresco. Os parâmetros de cultura foram estabelecidos como se segue: pH 7,0 (ajustado com 1,0 N NaOH ou HCl), velocidade de agitação de 100 RPM, 28°C e O₂ não detectável. A condição anaeróbica foi alcançada pela purga de nitrogênio (N₂) estéril em meio fresco até a leitura do sensor de O₂ chegar a zero. Em seguida, o meio foi purgado com N₂O por 15 min. Primeiramente, os cultivos foram realizados em batelada alimentada, gerando dados para o cultivo contínuo. Em batelada alimentada, suplementações de Fe²⁺, na forma de FeSO₄ 10 mM, e N₂O, a 0,5 L.min⁻¹ por 30 min, foram feitas a cada 24 h, com início na fase exponencial, para que suas concentrações iniciais fossem restabelecidas. Aproximadamente 1 mL de amostra do meio foi coletado a cada 24 h para análise de densidade óptica e quantificação de N₂O, Fe²⁺, nitrogênio amínico, carbono e BMs.

3.2.2. Cultivo contínuo (quimiostato)

O cultivo contínuo começou como uma batelada simples até o final da fase exponencial. Então, a alimentação do meio fresco se iniciou, simultaneamente à retirada do meio contendo crescimento. As vazões de entrada e saída de meio tiveram o mesmo valor, que foi determinado a partir da taxa de crescimento na fase exponencial. Neste experimento, a taxa de diluição, calculada como na equação I, foi igual a 70% da taxa de crescimento. O FeSO₄ foi adicionado ao meio de alimentação na concentração de 100 µM, enquanto o N₂O foi injetado conforme o regime calculado a partir dos experimentos de transferência de massa.

$$D = \frac{F}{V}$$

Equação I. (D) taxa de diluição; (F) vazão volumétrica (mL.h⁻¹); (V) volume total de meio (mL)

3.3. Análise de crescimento

A densidade celular foi medida por densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, PR). Considerou-se o valor de $1,09 \times 10^{10}$ células \cdot mL⁻¹ como equivalente à densidade óptica de 1,0 com base no trabalho de Silva e colaboradores (2013). Para o cultivo em batelada, a taxa de crescimento específico (μ) foi calculada usando a equação II e é expressa em h⁻¹.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Equação II. (μ) taxa de crescimento; (X_2 e X_1) Densidade celular nos instantes 1 e 2; ($t_2 - t_1$) Intervalo entre os instantes 1 e 2.

3.4. Determinação do consumo de nutrientes

O consumo de succinato de sódio foi medido usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC - Agilent 1260, Santa Clara, EUA) com uma coluna cromatográfica (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hércules, EUA) de 300 mm por 7,8 mm acoplada a um detector de índice de refração. A análise de Fe²⁺ foi realizada utilizando um kit (Kit Analisa 438 - Belo Horizonte, MG) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação pelo kit é baseada na reação cromogênica do Fe²⁺ com a ferrozina (Viollier *et al.*, 2000). Para a análise de nitrogênio amínico, foi utilizado o método colorimétrico da ninidrina (Lie, 1973). A quantidade de N₂O dissolvido foi analisada por potenciometria utilizando um eletrodo específico (Unisense, Aarhus, Dinamarca) acoplado a um amplificador de sinal (PA2000 - Unisense, Aarhus, Dinamarca).

3.5. Transferência de massa

A determinação da transferência de massa de N₂O e O₂ foi realizada através de medidas da concentração destes gases (Waites *et al.*, 2001). Em um primeiro passo, um volume de água do mar artificial (ASW, anexo 1) saturada com O₂ (previamente purgada com ar comprimido) foi diluído com ASW isenta de gases (previamente fervida e resfriada sob vácuo) para se obter 2000 mL de uma solução a aproximadamente 10% de saturação de O₂. Esta solução foi transferida para o vaso do biorreator e purgada com N₂O com vazão de 0,5

L.min⁻¹ e sob as taxas de agitação de 100, 200 e 300 RPM. Foram registrados a concentração inicial de O₂ e o tempo decorrido para atingir a leitura zero pelo sensor. Além disso, também foram medidos a concentração de saturação de N₂O (instante no qual não foi detectado aumento da leitura pelo sensor) e o tempo necessário para atingi-la. Estes dados foram usados para calcular o coeficiente de transferência de massa de N₂O e O₂ seguindo a equação III.

$$-K_L a = \frac{\ln(C^* - C_L)}{t}$$

Equação III. Transferência de massa de N₂O (entrada) e O₂ (saída). (C* - C_L) refere-se à variação da concentração de cada gás no experimento. t é o tempo em min.

3.6. Isolamento dos BMs

Ao fim do período de crescimento em biorreator, as células foram coletadas por centrifugação a 6100 × g a 4 °C por 15 min. Os *pellets* de células foram lavados e ressuspensos em 15 mL de tampão Hepes (20 mM, pH 6,8). Em seguida, as células foram submetidas à lise por desrupção ultrassônica em sonicador de ponteiros (VCX 500, Sonics, Newtown, EUA) na amplitude de 40%, frequência 20 kHz, em 60 ciclos de 30 s com intervalos de 30 s. Os BMs foram concentrados magneticamente por um ímã de neodímio-boro fixado na parte externa do tubo por 12 h a 4 °C. Os cristais foram transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 mL e ressuspensos em tampão Hepes (10 mM, pH 6,8) com NaCl (200 mM). Em seguida, os cristais foram lavados com o mesmo tampão em banho de ultrassom (Branson 2200, Emerson, Rochester, EUA) por 4 ciclos de 30 min, com concentração magnética e troca do tampão a cada ciclo.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Células e BMs purificados foram adicionados sobre grades de cobre revestidas com filme-suporte de polivinilformal e carbono, sendo secas ao ar para observação em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Morgagni, Hillsboro, EUA) operando a 80 kV em um aumento direto de 36.000 e 89.000 vezes para cada caso, respectivamente. O número médio de BMs por célula foi determinado pelo número médio de BMs em 30 células para

cada ponto de amostragem. A concentração de magnetita em cada tempo foi determinada pela medida das dimensões dos BMs, que foram então usadas para calcular seu volume.

3.8. Determinação das medidas dos BMs

As medidas de comprimento e largura dos BMs utilizados nesse estudo foram realizadas utilizando o programa iTEM (Olympus, Tóquio, Japão). O comprimento (C) e a largura (L) dos cristais foram obtidos a partir das medidas de diâmetro máximo e diâmetro mínimo, respectivamente. O volume foi definido como o produto entre o comprimento e o quadrado da largura ($C \times L^2$). A densidade da magnetita ($5,17 \text{ g.cm}^{-3}$) foi usada para obter a massa obtida a partir do volume calculado. Avaliações da espessura da membrana que envolve os BMs antes e após funcionalização foram realizadas utilizando o programa iTEM. Os gráficos e as análises estatísticas dos dados foram realizados com o auxílio do programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

3.9. Quantificação de magnetita produzida

A massa de BMs extraídos foi quantificada pelo método descrito por Yoshino e colaboradores (2008) que consiste na medida da densidade óptica da suspensão de BMs no comprimento de onda de 660 nm. Este método tem a finalidade de quantificar a massa de magnetita a ser utilizada na funcionalização dos BMs.

A produção de magnetita (P) foi definida como a razão da massa de magnetita (calculada no item anterior) produzida no processo pelo volume de meio em biorreator (Equação IV-I). Na batelada alimentada, a produtividade (p) foi o produto da taxa de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) pela concentração de magnetita obtida no cultivo (Equação IV-II). Para a conversão do valor de p para mg.L^{-1} por dia (d), o valor obtido na equação anterior é multiplicado pelo fator de conversão 24 (Equação IV-III). No processo contínuo, foi utilizada a taxa de diluição (D) em lugar da $\mu_{\text{máx}}$.

$$I.P = [Fe_3O_4] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$$

$$[Fe_3O_4] = \frac{m_{Fe_3O_4}}{V}$$

$$II.p = [Fe_3O_4] \times \mu_{m\acute{a}x} \text{ (mg.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$$

$$III.p = [Fe_3O_4] \times \mu_{m\acute{a}x} \times 24 \text{ (mg.L}^{-1}\text{.d}^{-1}\text{)}$$

Equação IV. Produção (I) e produtividade de magnetita (II e III).

3.10. Análise de custo

Os preços dos reagentes para síntese química e cultivo em biorreator foram pesquisados no catálogo online da Sigma-Aldrich © (www.sigmaaldrich.com). Os preços dos gases foram consultados na página da empresa BOC-Linde Plc (www.boconline.co.uk/shop). Os preços listados são de fevereiro de 2019 e são mostrados em dólares americanos (US\$).

3.11. Preparação de nanopartículas funcionalizadas

A funcionalização dos BMs isolados com AmB foi realizada por um método adaptado (Sun, Duan, *et al.*, 2008). Resumidamente, 100 µg de BMs foram adicionados a 100 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). O GA foi adicionado para ligação cruzada em diferentes concentrações finais (0,2, 3,5 e 12,5% v/v). A AmB solubilizada em DMSO foi então adicionada para alcançar uma concentração final de 125 µg.mL⁻¹. O sistema foi submetido a 5 ciclos de 10 min de sonicação a 60 W em banho de ultrassom (Branson 2200), com intervalos de 10 min sob resfriamento com banho de gelo. O mesmo procedimento foi realizado com BMs pré-tratados com PLL em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 ‰). Ao final, os BMs funcionalizados foram separados pela ação de um campo magnético externo e o sobrenadante foi removido e usado para estimativa da eficiência de captura de AmB por absorvância (Legrand *et al.*, 1997) a 410 nm em espectrofotômetro equipado com ultravioleta (UV 330G, Gehaka, São Paulo, SP). O carregamento de fármaco também foi calculado a partir da razão quantidade de fármaco capturado e a massa de magnetita adicionada à reação de funcionalização. Alíquotas das preparações também foram submetidas à observação em MET, conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicata e a eficiência de captura exibida por cada sistema foi comparada estatisticamente através da

análise de variância (ANOVA, do inglês, *analysis of variance*), a um grau de confiança , utilizando o programa Prism 5.0 (GraphPad Software). As nanopartículas funcionalizadas foram secas a vácuo, congeladas e armazenadas a -20°C até serem usadas em análises futuras.

3.12. Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Amostras liofilizadas de aproximadamente 1 mg foram colocadas em contato direto com o cristal de diamante de reflexão total atenuada de um Espectrômetro IRPrestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japão). As preparações foram analisadas na faixa de número de onda de 3000 a 500 cm^{-1} e foram realizadas 80 varreduras com uma resolução de 1 cm^{-1} .

3.13. Espectrometria no ultravioleta-visível (UV-Vis)

As preparações que apresentaram os maiores carregamentos de fármacos foram analisadas de acordo com o Teste de Identidade constante na Farmacopeia Internacional (OMS, 2018) adaptado para as nanoformulações magnéticas. De forma resumida, amostras liofilizadas de aproximadamente 100 μg foram tratadas com metanol para a extração da membrana e moléculas ligadas. As preparações foram analisadas em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão) na faixa de comprimento de onda de 300 a 450 nm. Um controle com AmB livre foi realizado de acordo com o método farmacopeico sem adaptações (OMS, 2018).

3.14. Potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas ressuspensas em água ultrapura ($30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi medido em um analisador Zeta (ZetaPlus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, EUA). Foram realizadas 10 medições em cada amostra e os valores individuais foram utilizados para calcular a média e o desvio padrão.

3.15. Medida de magnetização

A propriedade de magnetização dos BMs foi investigada em temperatura ambiente utilizando um magnetômetro de vibração SQUID (MPMS3, Quantum Design, San Diego, EUA). Uma amostra de 13,9 mg de BMs liofilizados foram transferidas em uma cápsula de gelatina para a inserção no porta-amostras do magnetômetro. As medidas foram executadas a 300 K.

3.16. Hipertermia magnética

Foi investigada a capacidade de aquecimento dos BMs em resposta à aplicação de um AMF. A análise foi realizada em um sistema de aquecimento por indução magnética (DM2-s53, Nanoscale Biomagnetics, Zaragoza, Espanha) equipado com uma sonda de temperatura de fibra óptica e isolamento térmico a vácuo. As suspensões de BMs em tampão fosfato salino (PBS) com pH 7,4 foram transferidas para um *vial* de vidro (1 mL) em concentrações de 0,5, 1 e 5 mg.mL⁻¹. Primeiramente, deixou-se o sistema atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente 25 °C) e, em seguida, o AMF foi aplicado a uma frequência de 307 kHz e intensidade de campo magnético de 200 Oe por 60 min.

3.17. Perfil de liberação do fármaco

Três tipos de conjugados foram testados quanto ao perfil liberado da AmB segundo o método de Legrand e colaboradores (1997). Basicamente, os complexos BMs-anfotericina obtidos com tratamento com GA, PLL, GA com PLL e os obtidos sem quaisquer reagentes de ligação foram dispersos em PBS e incubados a 37 °C sob agitação a 60 RPM. Em intervalos de 12 h, os BMs foram concentrados magneticamente e uma amostra de sobrenadante foi coletada para determinação da AmB em espectrofotômetro a 410 nm. Depois disso, os BMs foram redistribuídos e foi restaurado o volume de PBS. Para avaliar a liberação de AmB das nanopartículas submetidas ao AMF, o mesmo procedimento foi realizado por 1 h com as duas preparações de maior carregamento nas condições de hipertermia descritas no item anterior, excetuando-se o a incubação e a agitação.

3.18. Estabilidade durante congelamento-descongelamento

Uma alíquota de 100 µg das duas preparações de maior carregamento foram dispersas em PBS e armazenadas a -20 °C por 16 h. Ao final deste tempo, as suspensões foram descongeladas a temperatura ambiente e, sob concentração magnética dos BMs, uma amostra de sobrenadante foi coletada para determinação da AmB em espectrofotômetro a 410 nm. Depois disso, o volume de PBS foi restaurado e as alíquotas foram submetidas a outros 3 ciclos de congelamento-descongelamento.

4. Resultados

4.1. Batelada alimentada

Foi observado crescimento até 96 h, com a maior taxa específica de crescimento observada entre 24 h e 48 h ($\mu_{\max} = 0,05 \text{ h}^{-1}$; Figura 6A). No entanto, o número médio de BMs por célula apresentou o seu valor máximo em 72 h, diminuindo a partir deste tempo (Figuras 6A e 7; Tabela 2). A produção de magnetita, cujo máximo valor foi atingido em 72 h ($P = 24,5 \text{ mg.L}^{-1}$), diminuiu nos intervalos posteriores devido à diminuição na produção de BMs por célula (Figuras 6A e 7; Tabela 2). A produtividade máxima de magnetita foi obtida entre 48 e 72 h ($p = 1,23 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ou $73,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

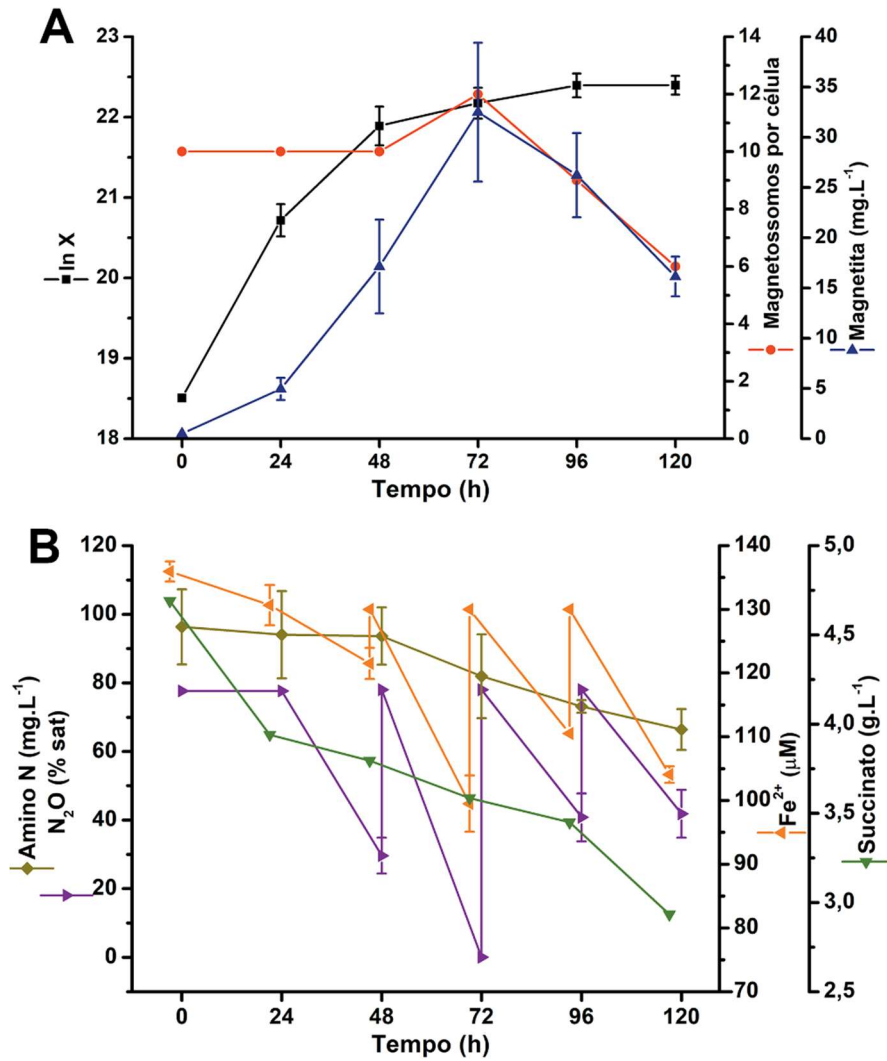


Figura 6. Cinética de crescimento de *Mv. blakemorei* e produção de BMs em batelada alimentada em biorreator de 5 litros. (A) Crescimento celular expresso em logaritmo natural da densidade celular ($\ln X$), número de BMs por célula e concentração global de magnetita. (B) Concentração (%) de Fe^{2+} , nitrogênio amínico, succinato e N_2O no meio. As concentrações de Fe^{2+} e N_2O foram ajustadas para seus níveis iniciais através de injeções do respectivo componente em intervalos de 24 h.

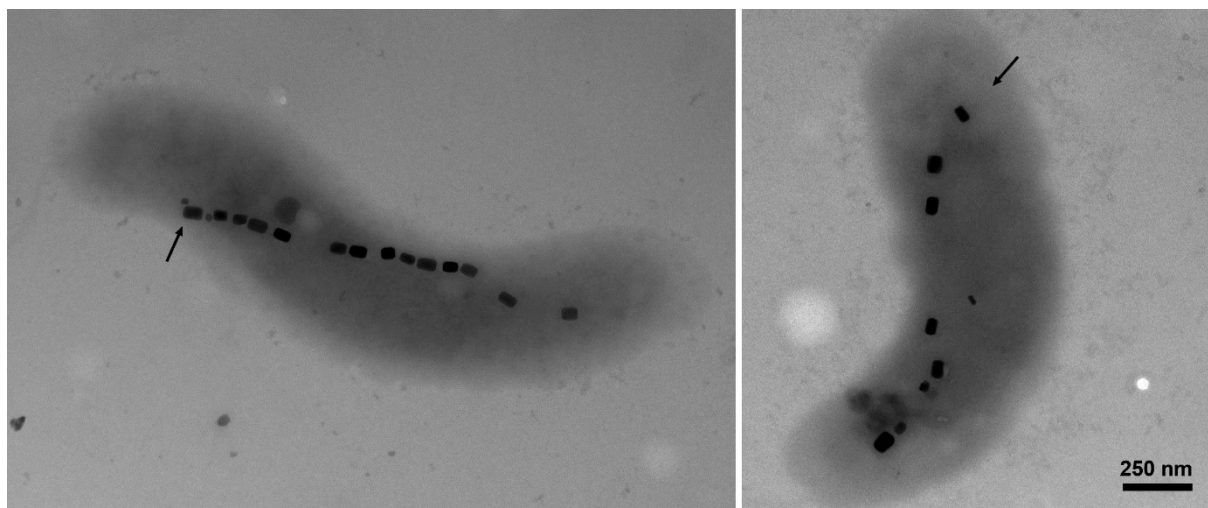


Figura 7. Imagem de MET de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T crescido em batelada alimentada com Fe²⁺ e suplementação de N₂O nos tempos de 48 h (A) e 120 h (B), mostrando a diminuição no número de BMs por célula ao final do cultivo (as setas indicam a cadeia de BMs).

Tabela 2. Valores máximos de produção e produtividade em magnetita e percentagem de células não-magnéticas em batelada alimentada nos tempos de 72 e 120 h.

Tempo	ln X	magnetossomos por célula	células não-magnéticas	produção*	produtividade*
(h)			(%)	(mg.L⁻¹)	(mg.L⁻¹.d⁻¹)
72	22,2 ± 0,2	12,0	15	32,5	39,7
120	22,4 ± 0,1	6,0	45	16,1	12,6

*produção e produtividade em magnetita.

Quanto ao consumo de nutrientes do meio de cultura durante crescimento, o succinato de sódio é consumido durante todo o crescimento e a sua concentração às 120 h foi de 62 % daquela no momento da inoculação (Figura 6B). O consumo de N₂O e Fe²⁺ foi mais intenso entre 48 e 72 h. Neste último tempo, o número médio de BMs por célula foi o maior (11 por célula). No total foram necessários, 3 pulsos de N₂O e Fe²⁺ (Figura 6B). A proporção de células não magnéticas em 72 h e 120 h está descrita na tabela 2.

4.2. Transferência de massa

Sob uma agitação de 100 RPM e um fluxo de $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, a saturação de N_2O levou 35 min para se completar, começando de uma concentração zero de N_2O e $\sim 20\%$ de O_2 (Figura 8). Porém, com 200 RPM, a saturação levou 20 min. A agitação de 300 RPM diminuiu ligeiramente para 18 min o tempo para esta concentração (Figura 8). Os parâmetros $-kLa$ para o N_2O e kLa para o O_2 foram calculados a partir das variações nas concentrações dos respectivos gases e são mostrados na figura 8.

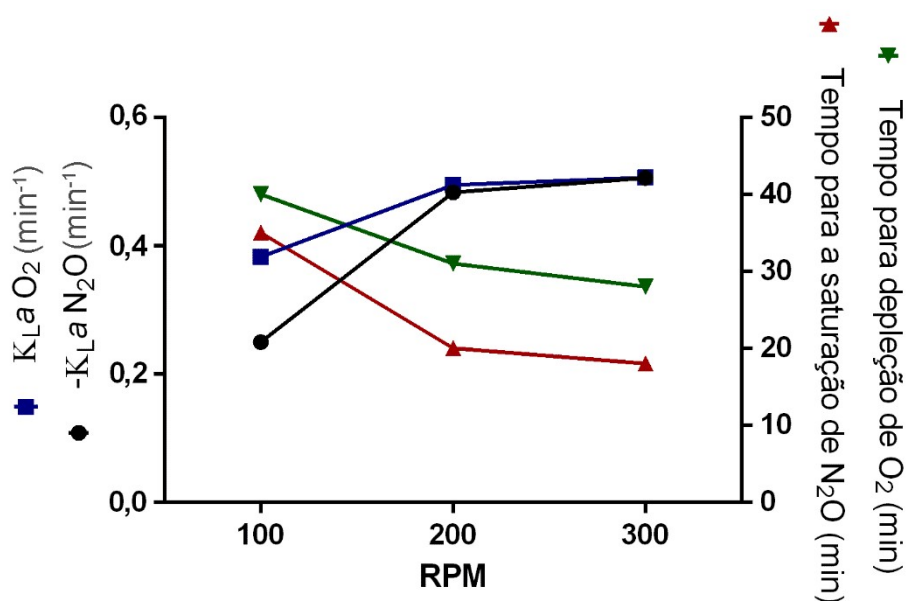


Figura 8. Coeficientes de transferência de massa (kLa) para o N_2O (solubilização) e O_2 (deslocamento) e tempo decorrido para a saturação de N_2O e depleção de O_2 .

4.3. Cultivo contínuo

Entre o início do cultivo e o ponto de 72 h, o cultivo ocorreu como uma batelada simples e a densidade celular e a produção de magnetita atingiram valores ligeiramente inferiores aos da batelada alimentada (Figura 9A). Em 72 h, foram iniciadas a entrada de meio fresco e a saída de meio esgotado a uma taxa de diluição de $0,035 \text{ h}^{-1}$. No intervalo entre 72 e 96 h, acontece um pequeno aumento na densidade celular (Figura 9A). Então, um leve decréscimo (96 a 120 h) neste parâmetro seguido de uma estabilização com pequenas variações foi observado. As concentrações de Fe^{2+} e succinato também são estabilizadas entre 72 e 120 h, enquanto que a do nitrogênio amínico estabiliza após 120 h. As concentrações de nutrientes permanecem, então, relativamente constantes até o final do cultivo (Figura 9B). A

proporção de células não magnéticas foi relativamente homogênea ao longo do cultivo (Figura 9A e 10; Tabela 3). O total de magnetita produzida neste processo foi de 104,2 mg, considerando o tempo de cultivo e o volume de meio.

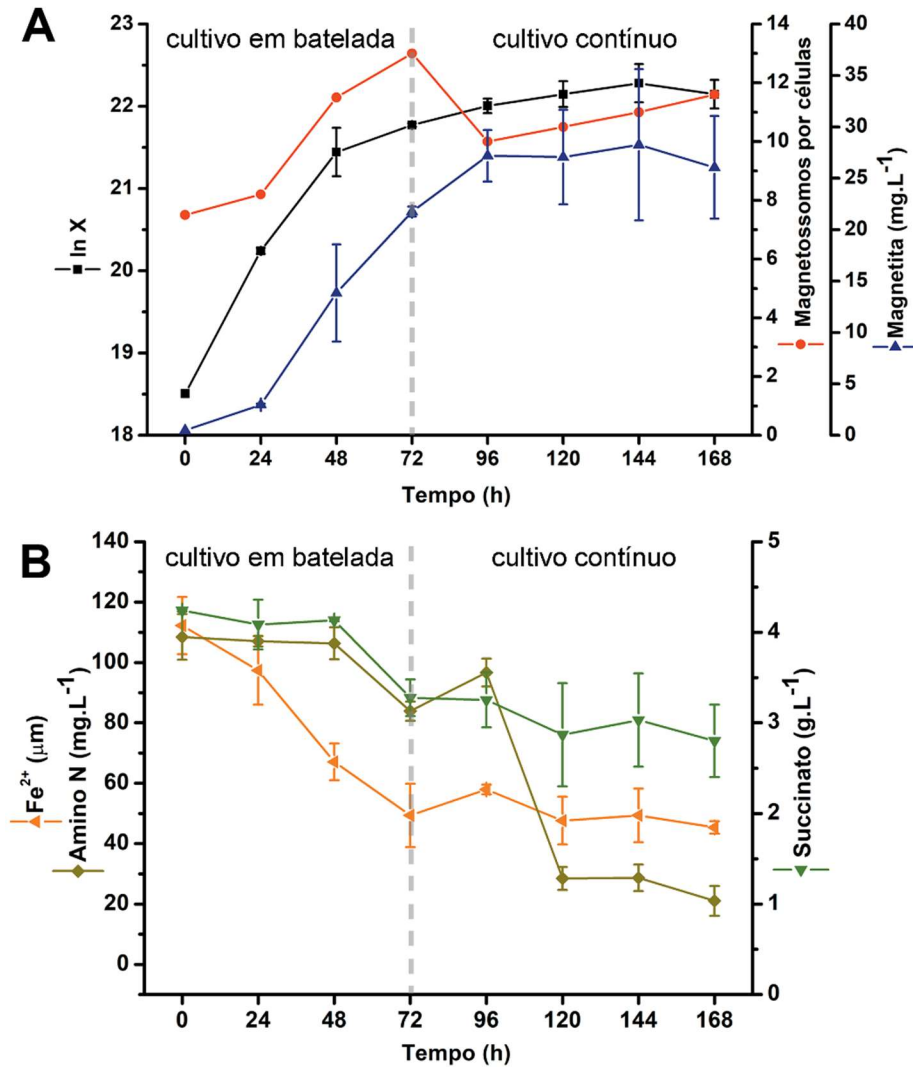


Figura 9. Cinética de crescimento de *Mv. blakemorei* e produção de BMs em cultivo contínuo (quimiostato) em biorreator de 5 litros. (A) Crescimento celular expresso em logaritmo natural da densidade celular ($\ln X$), número de BMs por célula e concentração global de magnetita. (B) Concentração (%) de Fe^{2+} , nitrogênio amínico e succinato.

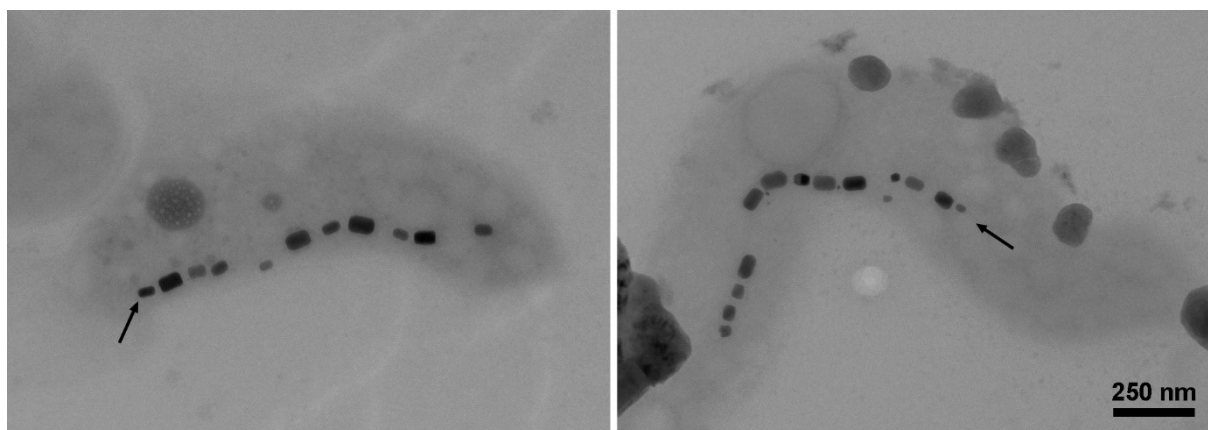


Figura 10. Imagem de MET de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T crescido em cultivo contínuo nos tempos de 48 h (A) e 120 h (B), mostrando a manutenção no número de BMs por célula ao longo do cultivo (as setas indicam a cadeia de BMs).

Tabela 3. Valores máximos de produção e produtividade em magnetita e percentagem de células não-magnéticas em cultivo contínuo nos tempos de 72 e 120 h.

Tempo	ln X	magnetossomos por célula	células não- magnéticas	produção*	produtividade*
(h)			(%)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
72	21,8 ± 0,02	13,0	15	21,8	23,7
120	22,1 ± 0,2	10,5	13	27,1	22,7

*produção e produtividade em magnetita.

4.4. Análise de custo

A análise de custo está resumida na tabela 4 e mostra que o método de coprecipitação produz as nanopartículas de menor custo de produção US\$ 0,68/g. Os métodos de síntese de nanopartícula de magnetita por decomposição térmica (US\$ 30,92/g) e através do cultivo de *Ms. gryphiswaldense* por cultivo semicontínuo (US\$ 16,86/g) possuem preços intermediários. Os custos mais elevados foram encontrados para a síntese de nanopartículas de greigita similares a BMs (US\$ 101,23/g) e para BMs prismáticos através do cultivo do *Mv. blakemorei* (US\$ 169,26/g; presente trabalho). Entretanto, o custo para revestimento de nanopartículas magnéticas com o fosfolípido fosfatidilcolina é maior que todos os métodos

de síntese avaliados, com exceção da coprecipitação com adição de poli-arginina (US\$ 1.800/g). Nos métodos de Yoshino e colaboradores (2008) e Zhang e colaboradores (2012), os valores para o revestimento com 400 mg de fosfatidilcolina foi de US\$ 250 e 873, respectivamente, por g de magnetita.

Tabela 4. Sumário da análise de custo comparando métodos químicos e biotecnológicos para a produção de nanopartículas magnéticas.

Nanopartícula	Método	Composição	Comprimento (nm)	Referência	Custo para produção (US\$/g)
Nanocubos	Coprecipitação	Fe ₃ O ₄	50-100	Shen <i>et al.</i> , 2014	0,68
Nanocubos	Decomposição térmica	Fe ₃ O ₄	79	Kim <i>et al.</i> , 2009	30,92
Similares a magnetossomos	Coprecipitação	Fe ₃ O ₄	~35	Baumgartner <i>et al.</i> , 2014	1.800,00
Similares a magnetossomos	Decomposição térmica	Fe ₃ S ₄ + PEG/ β -CD	80-100	Feng <i>et al.</i> , 2013	101,23
Magnetossomos cubooctaédricos	Semicontínua	Fe ₃ O ₄ + biomembrana	~33	Zhang <i>et al.</i> , 2011	16,86
Magnetossomos prismáticos	Batelada alimentada	Fe ₃ O ₄ + biomembrana	~60	Presente trabalho	141,14
Magnetossomos prismáticos	Quimiostato	Fe ₃ O ₄ + biomembrana	~60	Presente trabalho	169,26

4.5. Funcionalização de nanopartículas

A maior eficiência de ligação de AmB à nanopartícula magnética foi atingida quando se empregou PLL como agente de ligação na ausência de GA (BM-PLL-AmB), sendo igual a $52,7 \pm 5,1\%$ (Figura 11A). O carregamento de AmB na nanopartícula obtida nesse tratamento foi de $25,3 \pm 1,9 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ (Figura 11B). A quantidade de AmB nos tratamentos testados foram significativamente diferentes ($p < 0,005$).

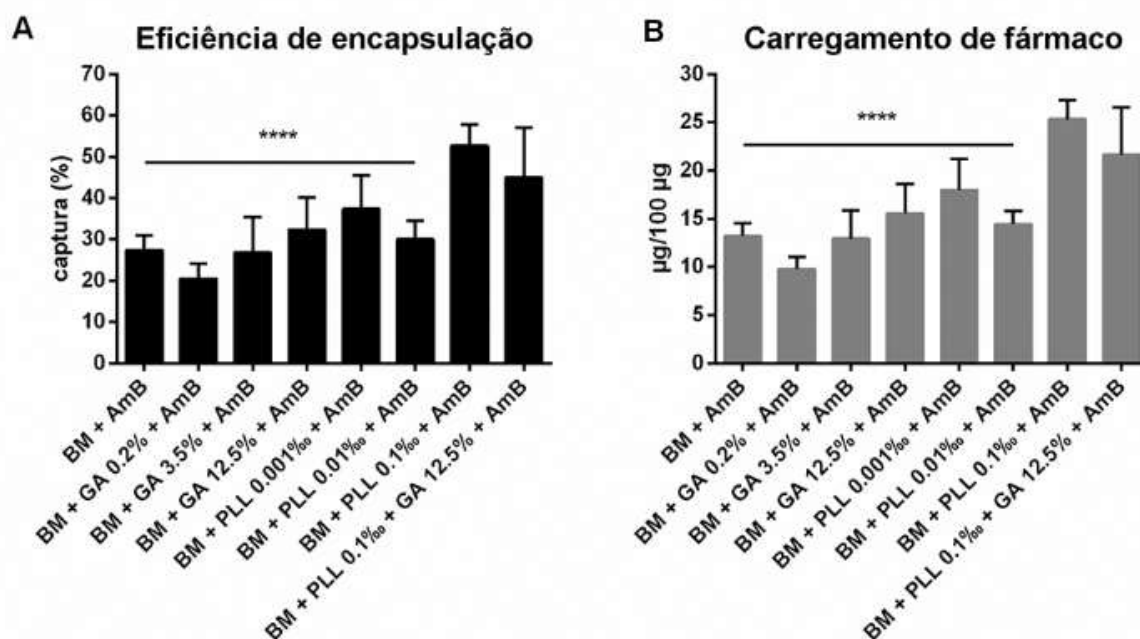


Figura 11. Percentual de AmB ligada e carregamento do fármaco nos diferentes tratamentos testados. Os testes ANOVA mostraram diferença estatisticamente significativa nos valores de eficiência de ligação e carregamento ($p < 0,0001$, ****).

A observação das nanopartículas funcionalizadas por MET evidenciou o aumento na espessura da membrana quando as nanopartículas eram submetidas aos diferentes processos de funcionalização (Figura 12). A maior espessura média de membrana ($13,5 \pm 1,3$ nm) foi observada quando as nanopartículas foram funcionalizadas com ambos os agentes de ligação (BM-PLL-GA-AmB; Figura 12D e 12E). As medidas foram submetidas ao teste ANOVA apresentando diferença estatística relevante ($p < 0,0001$; Figura 12E).

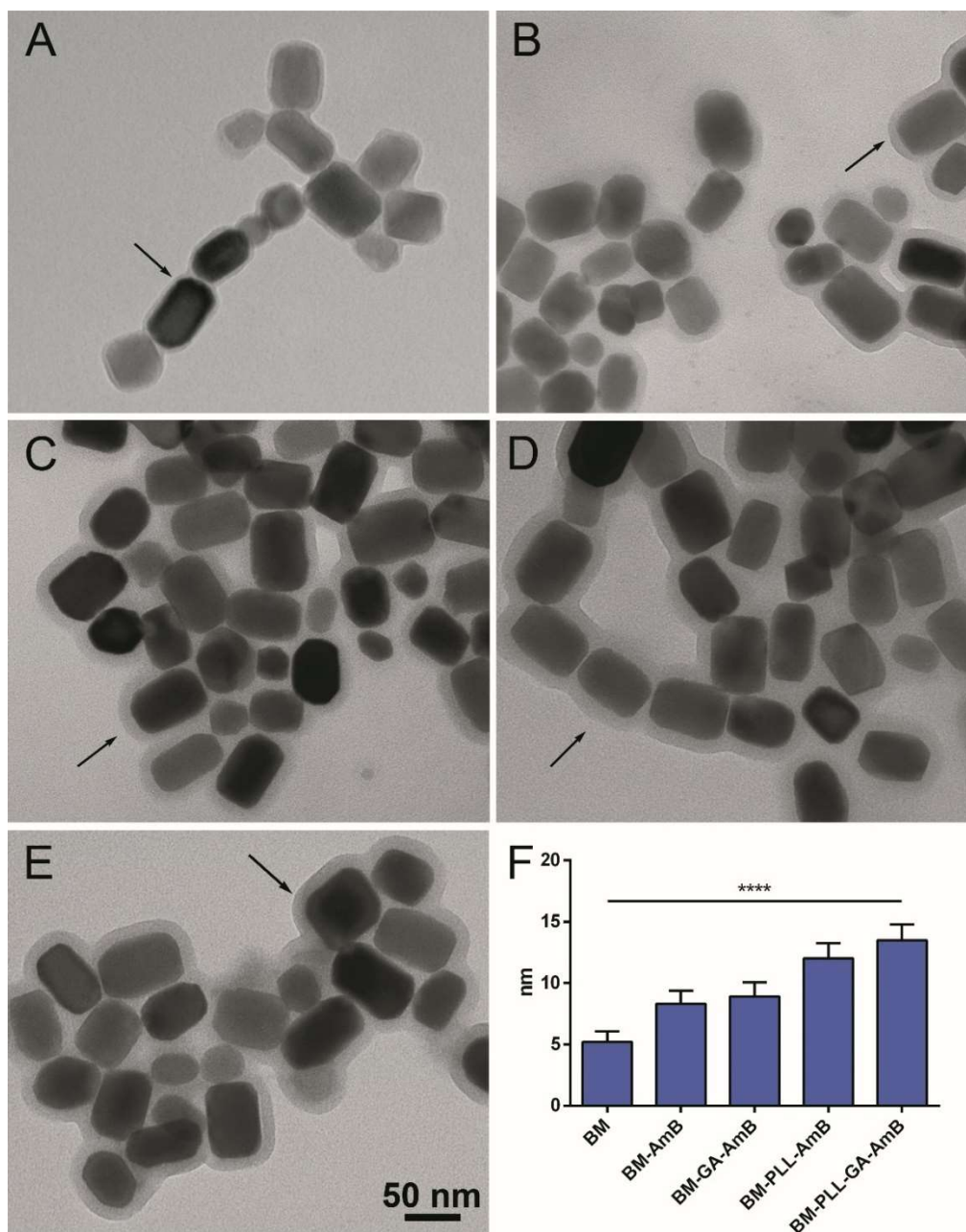


Figura 12. Imagens de MET de BMs livres (A) e seus conjugados: BM-AmB (B), BM-GA-AmB (C), BM-PLL-GA-AmB (D) e BM-PLL-AmB (E). Observe o aumento da espessura da membrana para diferentes preparações. Espessura média da membrana ($n \geq 60$) dos diferentes conjugados (F). Os testes ANOVA mostraram diferença estatisticamente significativa nos valores de espessura ($p < 0,0001$, ****).

A medida do potencial zeta foi realizada para avaliar as propriedades dispersivas das nanopartículas funcionalizadas. Valores entre -35 e -25 mV foram observados para todos os métodos de funcionalização testados, com exceção daquele em que apenas a PLL foi empregada como único reagente de ligação, cujo potencial foi de $15,1 \pm 3,8$ mV (Figura 13).

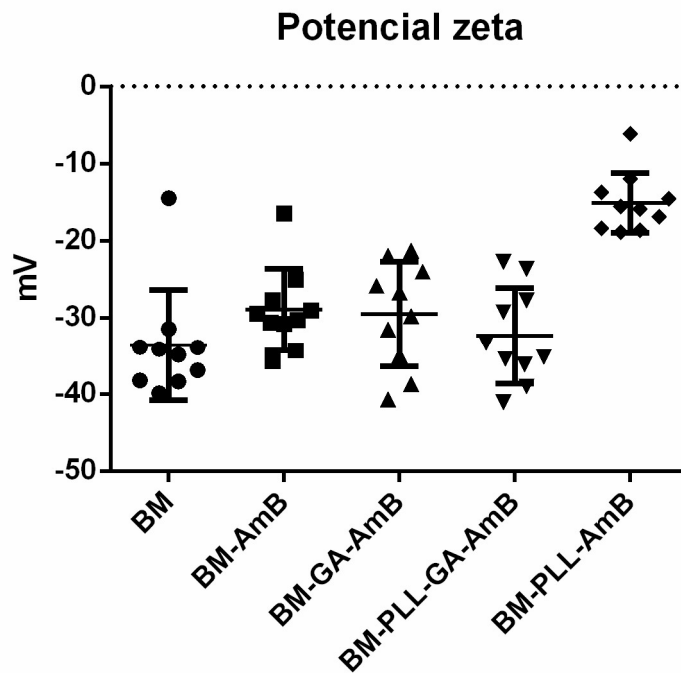


Figura 13. Potencial zeta de BMs e dos conjugados. Os símbolos representam cada medida individual do potencial em milivolts (mV). BM (●), BM-AmB (■), BM-GA-AmB (▲), BM-PLL-GA-AmB (▼) e BM-PLL-AmB (◆).

A ligação covalente da AmB aos BMs nas preparações que utilizaram GA foi verificada através da análise por FTIR. Os picos que foram analisados para se inferir a estrutura dos conjugados encontram-se sinalizados nos espectros (Figura 14). A adsorção e a estabilidade da AmB incorporada às nanoformulações foram investigadas através da análise por UV-Vis. Nas três preparações podem ser observados os picos de absorção, em ordem crescente de intensidade, em 364, 382 e 406 nm (Figura 15). As intensidades relativas entre os picos de absorção são mantidas entre as nanoformulações. A partir das análises espectroscópicas, foi proposta a estrutura química dos complexos formados (Figura 16).

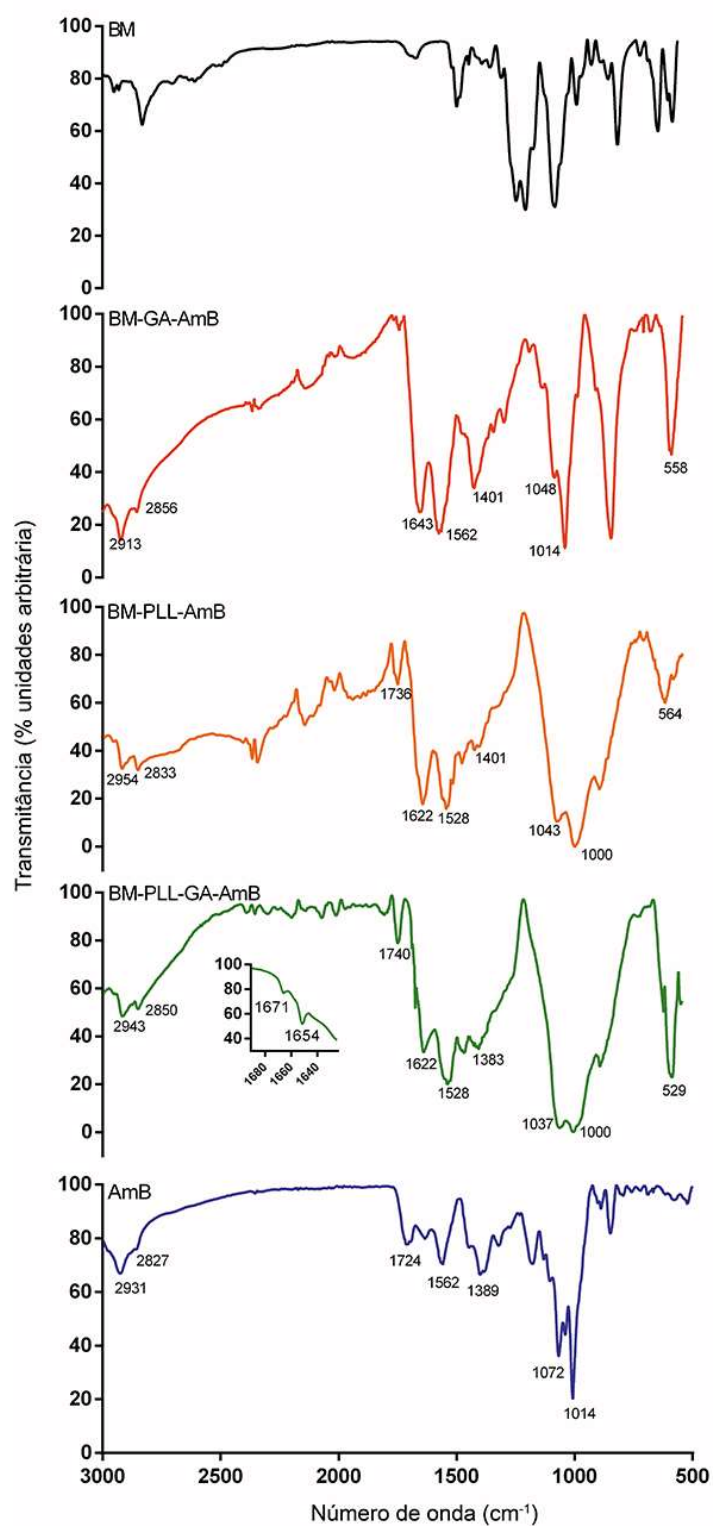


Figura 14. Espectros de FTIR de BMs, AmB e conjugados mostrando picos usados para a identificação de funcionalização.

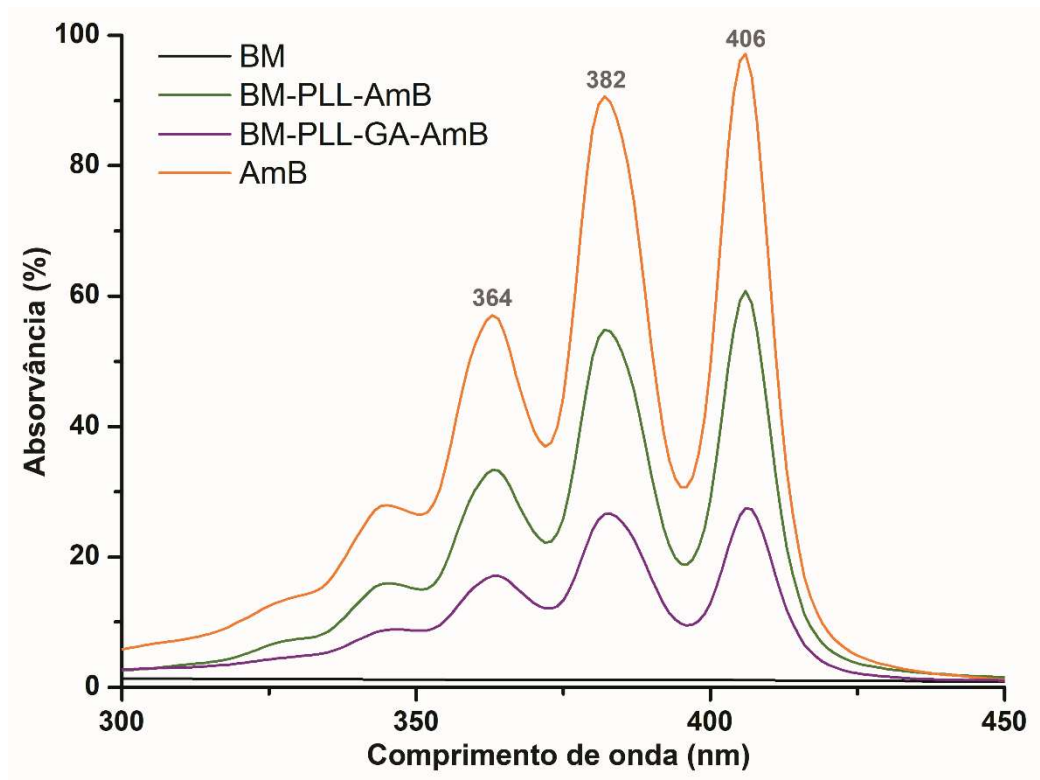


Figura 15. Espectro de UV-Vis de preparações selecionadas (BM-PLL-AmB, BM-PLL-GA-AmB) indicando os três picos de absorção característicos da AmB. Note a ausência desses picos na amostra contendo apenas BMs.

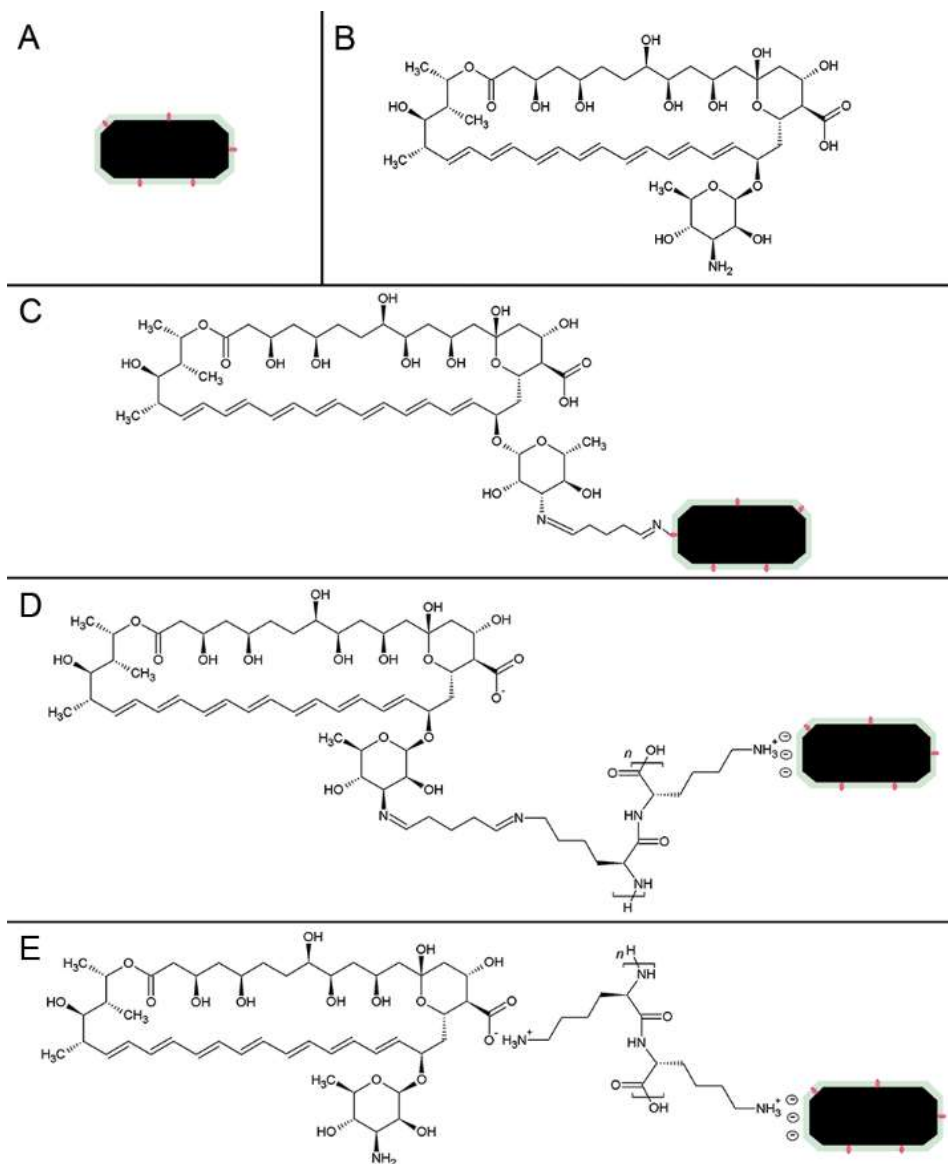


Figura 16. Representação estrutural dos BMs (A), AmB (B) e seus conjugados: BM-GA-AmB (C), BM-PLL-GA-AmB (D) e BM-PLL-GA (E).

Medidas de magnetização foram realizadas em BMs não-funcionalizados e revelaram valores de magnetização de saturação e coercividade de 52 emu.g^{-1} and 115 Oe , respectivamente (Figura 17).

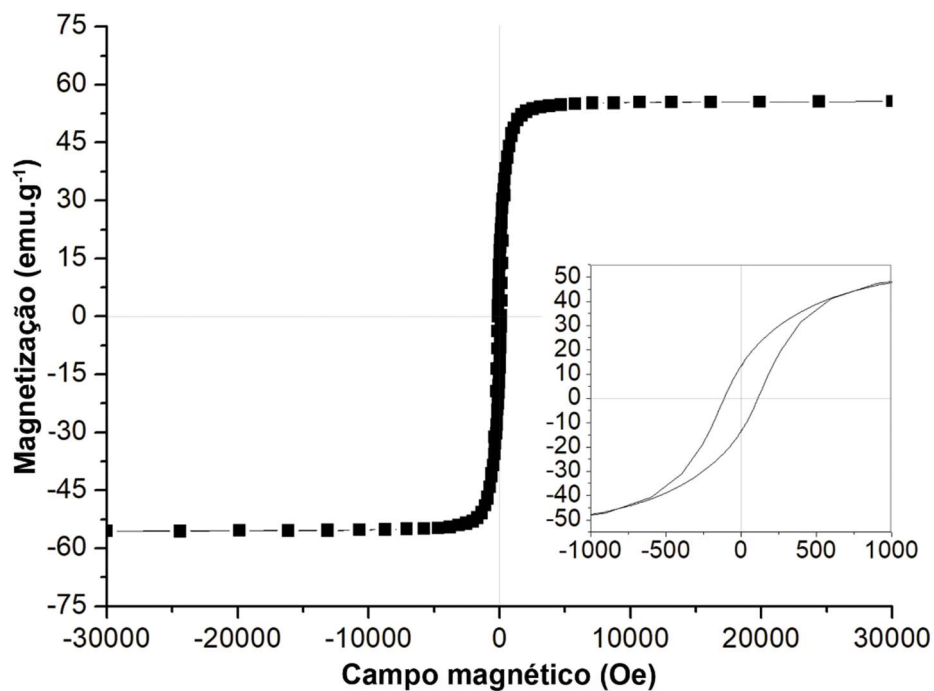


Figura 17. Curva de magnetização de BMs de *My. blakemorei* liofilizados. No inserto, nota-se a histerese exibida pelas nanopartículas.

A capacidade de aquecimento de suspensões contendo BMs nas concentrações de 1,2 e 4,8 mg.mL⁻¹ foi examinada sob um AMF nas condições descritas anteriormente. O aumento da temperatura em resposta à aplicação de um AMF foi o mais alto (6,3 °C) na suspensão contendo a maior quantidade de magnetita (Figura 18). Quando a concentração de magnetita foi de 1,2 mg.mL⁻¹, o aumento da temperatura também foi menor (1,4 °C).

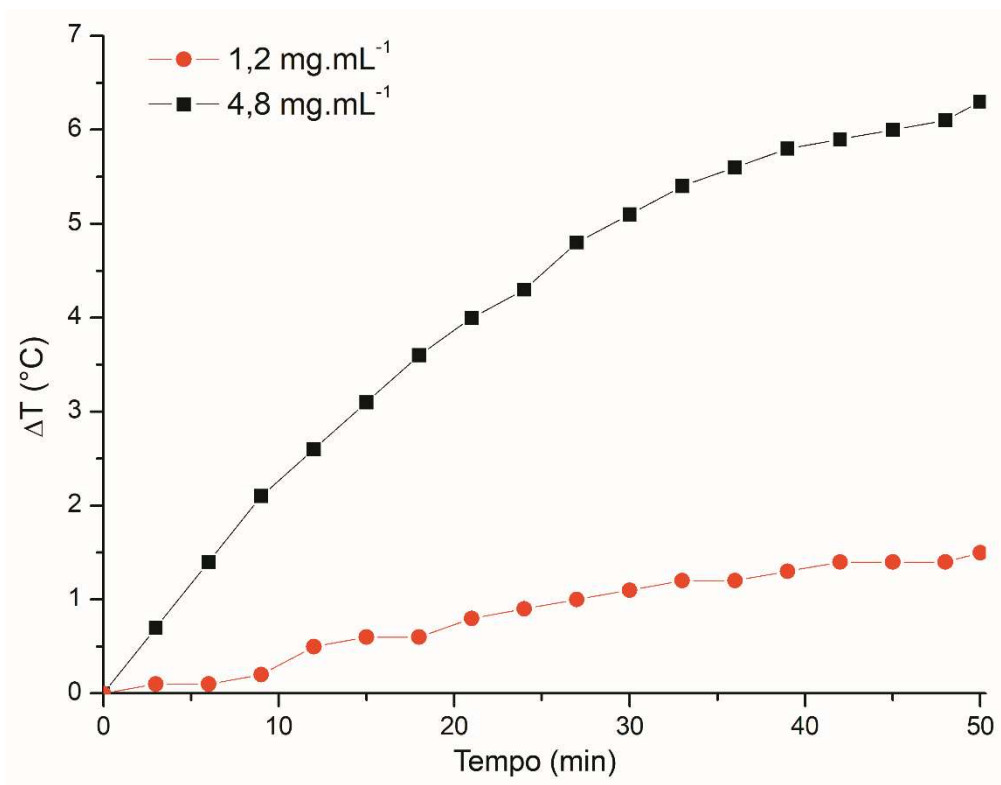


Figura 18. Variação de temperatura em suspensões de BMs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em duas diferentes concentrações (1,2 e 4,8 mg.mL⁻¹) ao longo de 50 min.

A liberação de AmB na condição padrão (37 °C) dentro de 1 h foi de $11,1 \pm 0,4\%$ para o BM-PLL-GA-AmB e de $15,0 \pm 1,2\%$ para o BM-PLL-AmB (Figura 19). Quando a suspensão contendo os nanoconjugados foi submetida ao AMF, a liberação do fármaco no mesmo intervalo de tempo aumentou aproximadamente quatro vezes, atingindo $41,3 \pm 0,5\%$ para o BM-PLL-GA-AmB e $53,8 \pm 6,2\%$ para o BM-PLL-AmB (Figura 19).

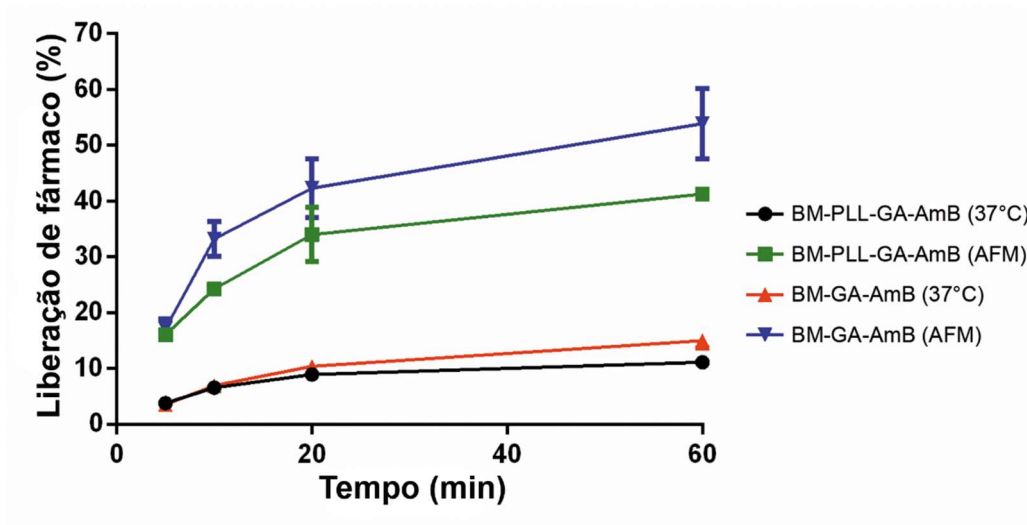


Figura 19. Perfil de liberação cumulativa de AmB a partir das formulações BM-PLL-GA-AmB e BM-PLL-AmB sob condições-padrão (37°C) e sob aplicação de um AMF.

O estudo de liberação frente ao congelamento-descongelamento revelou que após 4 ciclos desse tratamento a nanoformulação retém $43,8 \pm 10,6$ % do carregamento inicial de AmB para BM-PLL-AmB e $45,7 \pm 3,2$ % para o BM-PLL-GA-AmB (Figura 20).

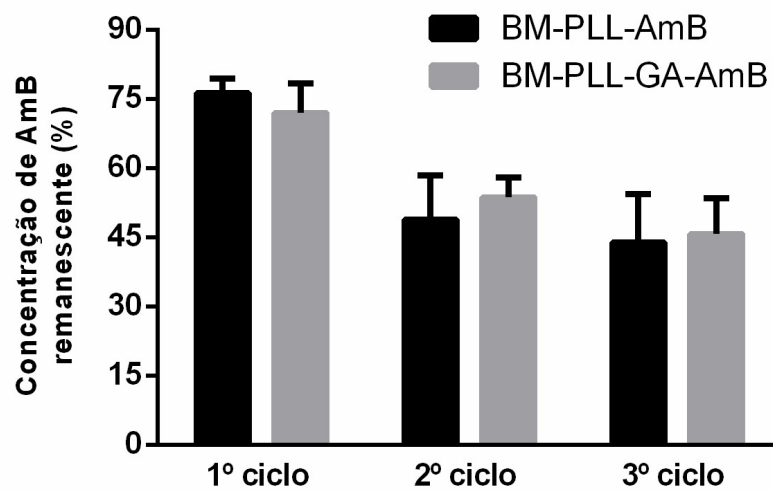


Figura 20. Estabilidade de nanoformulações em termos de quantidade de AmB que permanece ligada a nanopartículas após 3 ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento.

5. Discussão

5.1. Batelada alimentada

Espécies do gênero *Magnetospirillum* requerem maiores concentrações de O₂ para o crescimento e menor para a formação de BMs (Heyen e Schuler, 2003). Para esse propósito, é necessário o controle fino do processo para manter as concentrações de O₂ em uma faixa estreita ou estratégias de cultivo nas quais as duas condições antagônicas são satisfeitas. No caso da bactéria *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, a maior produção de BMs ocorre com um acceptor de elétrons final diferente do O₂, no caso, o N₂O (Bazylnski *et al.*, 2013). A simples suplementação desse gás já é suficiente para aumentar a produção de BMs sem a necessidade de controles complexos de processo, como os descritos para as espécies de *Magnetospirillum*. Essa relativa simplicidade aumenta o potencial de uso de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e seus BMs em aplicações biotecnológicas.

Nosso grupo desenvolveu um cultivo em batelada alimentada com suplementação exclusiva de Fe²⁺ em pulsos de 24 h. Nesse trabalho, duas suplementações foram realizadas até às 120 h de cultivo, sendo a primeira realizada em 72 h, quando o nível de Fe²⁺ estava a 30% da concentração inicial. Nenhuma medida ou injeção de N₂O foi realizada. O cultivo otimizado do biorreator teve produção de magnetita atingindo 22,4 mg.L⁻¹ às 96 h e praticamente não apresentou alterações até as 192 h. Consequentemente, a produtividade de magnetita diminuiu de 5,6 mg.L⁻¹.d⁻¹ às 96 h para 3,2 mg.L⁻¹.d⁻¹ em 192 h. No presente trabalho, apesar de a suplementação com N₂O e Fe²⁺ aumentar tanto a produtividade quanto a produção de magnetita a 72 h, o número médio de BMs por célula diminuiu a partir deste momento (Figura 6A e 7; Tabela 2). A diminuição drástica nos BMs por célula não foi observada no trabalho anterior (Silva *et al.*, 2013). A redução da produção total de BMs é, em parte, explicada pela desaceleração da taxa de crescimento (Figura 6A). Embora a fonte de carbono (succinato) não tenha sido totalmente esgotada, sabe-se que a disponibilidade reduzida de fonte de carbono causa a desaceleração do crescimento (Kim e Gadd, 2008). O acúmulo de produtos tóxicos e inibidores em fases posteriores também influencia negativamente o crescimento celular (Macauley-Patrick e Finn, 2008). De fato, genes codificadores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana foram identificados em *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Araújo *et al.*, 2015). Outra possibilidade para explicar a desaceleração do crescimento pode ser a limitação de outros componentes não medidos presentes nos meios, como solução de minerais ou aminoácidos específicos.

Devido à ausência da magnetita, a absorção da luz incidida durante a medida de densidade óptica deve ser menor por células não magnéticas do que por células produtoras de BMs. Este fato pode ter afetado a medição da densidade celular, resultando em um valor menor em relação ao real. Isto faria com que a concentração de magnetita, calculada a partir do produto da densidade celular com o número médio de BMs por célula fosse subestimado.

Existe pouca informação na literatura sobre o consumo de energia envolvido na síntese de BMs e sobre a fisiologia das MTB em geral. O *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T é capaz de crescer de forma microaerófila e anaeróbica em O₂ e óxidos de nitrogênio, respectivamente (Bazylinski *et al.*, 2013). Apesar da versatilidade metabólica, a redução anaeróbica de N₂O pela cepa MV-1^T produz o maior número de BMs por célula entre todos os aceptores de elétrons já testados na literatura (Bazylinski *et al.*, 2013). Em nossos resultados, podemos ver que os perfis de consumo de Fe²⁺ e N₂O estão fortemente relacionados, sendo ambos os componentes consumidos mais intensamente entre 48 e 72 h (Figura 6B). Essa semelhança nos perfis de consumo pode indicar um sinergismo entre as demandas de energia e material, uma vez que o Fe²⁺ é convertido em Fe₃O₄, enquanto o N₂O é reduzido para produção de ATP para biomineralização. De fato, sabe-se que o processo de biomineralização é fortemente dependente da disponibilidade de energia (Wang *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2016). Em *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1, a redução de oxianions de nitrogênio fornece energia necessária para a formação de vesículas dos BMs (Wang *et al.*, 2011). Além disso, o metabolismo energético e a síntese dos BMs são controlados de maneira integrada no nível genético (Wen *et al.*, 2016).

As fontes de carbono e nitrogênio são consumidas em taxas mais regulares ao longo do processo. O consumo de nitrogênio parece estar menos correlacionado à síntese de magnetita do que os consumos de N₂O, Fe²⁺ e carbono. Portanto, há indicação de que a demanda de nitrogênio é maior para o crescimento e divisão celular do que para a síntese de BMs. Além disso, tanto o carbono quanto o nitrogênio estavam presentes em abundância relativa em meio ao longo da batelada, com 40 e 70% de sua concentração inicial ainda disponível no meio em 96 h de cultivo (Figura 6B). Assim, esses nutrientes essenciais não são limitantes para o crescimento celular e produção de BMs durante os tempos iniciais de cultivo. Em experimentos futuros, pode-se, então, eliminar este excesso através da diminuição de succinato e hidrolisado de caseína no meio. Com isso, pretende-se baratear o meio de cultivo.

5.2. Transferência de massa

Entender a cinética de transferência de massa de gás é crucial para projetar escalas maiores de um dado bioprocessamento (Burke, 2008). Para a cultura contínua de *Mv. blakemorei*, a medição da concentração de N₂O durante o crescimento contínuo é de pouca relevância uma vez que o meio fresco autoclavado é adicionado. Por isso, desenvolvemos uma estratégia para injeção intermitente de N₂O durante o crescimento contínuo. O cultivo de alto rendimento de espécies de *Magnetospirillum* em biorreatores frequentemente exige estratégias para manter as concentrações de O₂ sob fino controle. Esse fato ocorre porque o O₂ é necessário para o crescimento celular, mas a anaerobiose leva a uma maior produção de magnetita. Estratégias de controle de O₂ requerem medição de O₂ em linha através de sondas sensíveis e rápida detecção do esgotamento de O₂ devido ao consumo. Nesse sentido, a estratégia para injeção exclusiva de N₂O para o cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T é vantajoso devido à sua relativa simplicidade.

Outra vantagem é que a solubilidade do N₂O em água doce e do mar é maior que a do O₂, tornando o N₂O mais favorável. No entanto, este gás não está disponível livremente na atmosfera, como o O₂, tornando o processo de injeção de gás mais oneroso. Entre os gases já utilizados para o cultivo em biorreatores de MTB, o N₂O é 2,5 vezes mais caro que o O₂ e o N₂, mas é ligeiramente mais barato que o argônio (Tabela 5). Nesse sentido, uma estratégia de injeção que consumisse um menor volume de gás também ajuda a diminuir os custos de uso de gás.

Tabela 5. Preços e valores de solubilidade de gases usados em cultivos de MTB.

Gás	US\$/m ³	Solubilidade (μmol.L ⁻¹)	Referência
O ₂	13,11	182	Heyen e Schuler, 2003
N ₂	16,51	340	Wei <i>et al.</i> , 2002
Ar	38,00	8,93	Yang <i>et al.</i> , 2001
N ₂ O	36,58	19140	Silva <i>et al.</i> , 2013

Valores de solubilidade em água extraídos da literatura (Weiss, 1970; Weiss e Price, 1980) para uma salinidade de 35‰.

Medições de transferência de massa são mais comumente feitas para estudar a transferência de O_2 da bolha de gás para o meio em processos aeróbicos (Waites *et al.*, 2001). No entanto, a otimização de processos anaeróbicos também depende do conhecimento e da melhoria da transferência de massa (Munasinghe e Khanal, 2010). Em suma, todas as estratégias para melhoria da transferência de massa em culturas submersas são baseadas na otimização do fluxo de gás e taxa de agitação do rotor.

A partir de nossos resultados, podemos ver que quase 80% do N_2O é consumido em fase exponencial (Figura 6A). Como a cultura contínua visa estender as condições de fase exponencial, calculamos um regime de injeção de N_2O que mantém as concentrações deste gás em um nível de pelo menos 75% da saturação. Se considerarmos o consumo de 80% entre 48 e 72 h, 25% do N_2O será consumido em até 8 h. Assim, um regime de injeção de N_2O ao nível de saturação a cada 8 h seria capaz de manter a concentração em, no mínimo, 75% de saturação durante o cultivo contínuo. Considerando essa concentração de N_2O antes da injeção e um valor de $-kLa$ de 0,48 a 200 RPM (Figura 8), o N_2O pode ser reabastecido em pouco menos de 2 min. Assim, ajustamos a agitação para se elevar de 100 a 200 RPM durante 5 min enquanto o N_2O é injetado no meio para assegurar o reabastecimento total. Isso ajuda a transferência de N_2O do gás para a fase líquida, enquanto é evitado o consumo de energia devido à agitação em velocidades superiores à necessária. A taxa de transferência de massa do N_2O em um bioprocessamento foi avaliada pela primeira vez. Esse conhecimento é importante pois gera dados para planejar um processo econômico, com respeito ao consumo do gás, e eficiente, com respeito à solubilização no meio.

O deslocamento de O_2 também foi estudado em nossos experimentos de transferência de massa. Isso foi feito para assegurar condições anaeróbicas, já que não podemos garantir que o meio de alimentação esteja completamente livre de O_2 . O tempo e a agitação escolhidos para a injeção de N_2O são suficientes para remover todo o O_2 detectável do meio (Figura 7).

5.3. Cultivo contínuo

Como discutido na seção da batelada alimentada, os diferentes componentes do meio são consumidos em taxas distintas e apenas os macronutrientes são estudados. Essas limitações são difíceis de superar devido à falta de conhecimento mais profundo sobre as

demandas nutricionais da bactéria e sua fisiologia. Assim, uma estratégia para sustentar o crescimento adicional de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em biorreator seria a adição de meio de cultura fresco completo.

A perda da capacidade de sintetizar BMs ocorre em tempos avançados de crescimento (fase estacionária), embora o Fe²⁺ continue sendo reabastecido. Isso suporta a ideia de que o declínio na produção global de magnetita é devido a deleções espontâneas na região da MAI como descrito na literatura (Dubbels *et al.*, 2004; Schübbe *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2005). Nesse sentido, a implementação da cultura contínua ajudaria a manter uma alta proporção de células produtoras de BMs, influenciando diretamente a produção de magnetita. De fato, poucos mutantes não-magnéticos são observados em sucessivas passagens de uma cultura de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 quando realizadas antes do esgotamento do meio (Schübbe *et al.*, 2003). O cultivo semicontínuo descrito no trabalho de Zhang e colaboradores (2011) visou a aproveitamento de um volume grande de células em fase exponencial para que fossem mantidas as condições de crescimento e produção de BMs em taxas elevadas. Nesse trabalho, o primeiro estágio de cultivo ocorreu como batelada alimentada com meio de alimentação contendo as fontes de ferro (FeCl₃), carbono (ácido láctico) e nitrogênio (NH₃.H₂O). Nesta etapa, a produção de magnetita obtida foi de 280,49 mg.L⁻¹. Ao final da fase exponencial, 90 % do volume do meio com crescimento foi removido e, em seguida, o volume original foi restaurado acrescentando-se o volume necessário de meio fresco. A produção de magnetita ao final deste segundo estágio diminuiu para 111,39 mg.L⁻¹. As instabilidades na MAI das células cultivadas foram indicadas como possível causa desta diminuição de 60 % na produção de BM. Uma vez que a densidade celular usada para iniciar o segundo estágio de cultivo era muito elevada (OD = 25.5), pode-se presumir que as condições da fase estacionária não tenham sido evitadas e, portanto, houve diminuição da produção de BMs. No cultivo descrito no presente trabalho, a densidade celular no início do cultivo era menor que aquela no início do cultivo semicontínuo de Zhang e colaboradores (2011). Deste modo a manutenção das condições de fase exponencial puderam ser mantidas no cultivo contínuo de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T.

A partir dos resultados do crescimento por batelada alimentada, o ponto de 72 h foi escolhido para iniciar a cultura contínua e a injeção intermitente de N₂O. Entre 48 e 72 h, ocorrem o maior consumo de Fe²⁺ e N₂O e a maior concentração de magnetita. A taxa de diluição utilizada foi igual a 70% da taxa máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) durante a fase exponencial. Um aumento substancial no número médio de BMs por célula e uma diminuição

acentuada na proporção de células não-magnéticas (Figura 9A; Tabela 3) ocorreram quando se comparam os mesmos intervalos de tempo da batelada alimentada. Apesar da produção de magnetita em 72 h ter sido ligeiramente menor que a da batelada alimentada, a produção intensa foi mantida até tempos posteriores (Figura 10; Tabela 3). A manutenção de condições de fase exponencial por um tempo estendido evita a fase estacionária, evitando-se ao máximo deleções espontâneas na MAI e, portanto, garantindo a baixa ocorrência de mutantes não magnéticos.

Como visto no experimento de batelada alimentada, o succinato e o nitrogênio amínico não são limitantes para o crescimento da bactéria cultivada. Deste modo, a estabilização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio no cultivo contínuo evitam que a célula produza metabólitos tóxicos em virtude da escassez de nutrientes. Além disso, ao se manter as células em condições de fase exponencial, o gasto de energia é priorizado em processos fisiológicos, dentre eles, a síntese de BMs.

Empregamos apenas uma taxa de diluição ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$), equivalente a 70% da taxa de crescimento na fase exponencial (24 a 72h). Entretanto, será necessário estudar, em etapas futuras deste projeto, os efeitos de diferentes taxas de diluição e tempos permanência mais longos sobre a produção de BMs. De qualquer modo, o presente trabalho apresenta uma estratégia de cultivo em larga escala do *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T que consegue evitar a fase estacionária. Esta nova estratégia contribui para o conhecimento sobre cultivo de MTB em biorreator, principalmente porque a maioria dos trabalhos neste campo utilizam o gênero *Magnetospirillum*.

5.4. Análise de custos

Cada etapa do escalonamento de bioprocessos envolve aumentos nas ordens de grandeza dos custos de material e utilidades (Burke, 2008). Portanto, é importante estudar aspectos financeiros do desenvolvimento de bioprocessos, mesmo em escalas menores. Assim, foi realizada esta análise financeira preliminar da produção de BMs e nanopartículas artificiais. Para efeito de comparação, apenas nanopartículas sintetizadas por métodos químicos com tamanho variando de 20-100 nm foram consideradas nessa análise. Essa restrição se dá porque as partículas dentro dessa faixa de tamanho são ferrimagnéticas de domínio único estáveis, assim como os BMs (Koksharov, 2009).

A coprecipitação consiste na precipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em magnetita em meio alcalino (Reddy *et al.*, 2012). Assim como evidenciado nos resultados, esses métodos são mais econômicos (US\$ 0,68 por g; Tabela 4) e produzem nanopartículas biocompatíveis (Kharisov *et al.*, 2014). Por outro lado, há pouco controle sobre tamanho e forma das nanopartículas produzidas artificialmente (Kharisov *et al.*, 2014). Uma síntese simples de nanopartículas de magnetita com forma mais controlada foi obtida com a adição de dodecilsulfato de sódio (SDS) ao meio de precipitação (Shen *et al.*, 2014).

O método para sintetizar nanocubos de magnetita monodispersos ($78,5 \pm 6,9$ nm) através de decomposição térmica (Kim *et al.*, 2009) mostra um custo de produção calculado de US\$ 30,92 por g de magnetita (Tabela 4). Este método consiste na decomposição de sais férricos orgânicos sob alta temperatura na presença de solventes orgânicos de alto ponto de ebulição (Reddy *et al.*, 2012). Apesar de produzir nanopartículas com controle superior de forma e tamanho (Reddy *et al.*, 2012), esses métodos exigem preços de produção muito mais altos, solventes orgânicos prejudiciais ao meio ambiente e aquecimento extremo (Kharisov *et al.*, 2014; Lloyd, Byrne e Coker, 2011). Como relatado anteriormente, os solventes orgânicos representam cerca de 65-95% do custo de produção de nanopartículas por decomposição térmica (Schwartz-Duval e Shapiro, 2014), valores compatíveis com os encontrados no presente trabalho (73-93%).

O controle fino da biomineralização dos BMs em MTB inspirou rotas para a síntese de nanopartículas artificiais com melhor controle de tamanho e forma e maior biocompatibilidade (Mirabello, Lenders e Sommerdijk, 2016). Assim, peptídeos e polímeros têm sido utilizados como aditivos para a síntese de nanopartículas similares a BMs como controladores de nucleação e crescimento de cristais (Baumgartner *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2013; Mirabello, Lenders e Sommerdijk, 2016). A síntese de decomposição térmica de nanopartículas de greigita similares a BMs foi descrita usando polietilenoglicol (PEG) 4000 e β -ciclodextrina como estabilizadores e etilenoglicol como solvente orgânico (Feng *et al.*, 2013). Os dois primeiros aditivos estavam presentes na superfície das nanopartículas e aumentaram a biocompatibilidade e a estabilidade coloidal de maneira análoga à membrana do BM (Feng *et al.*, 2013). O custo de produção (US\$ 101,23 por g de magnetita; Tabela 4) sofre um aumento de três vezes comparado ao método anterior de decomposição térmica. Em outra abordagem, um método de coprecipitação com a adição de poli-arginina resultou em nanopartículas com uma faixa de diâmetro muito estreita ($35,3 \pm 5$ nm). No entanto, a

contribuição de preço da poli-arginina fez com que o custo por grama de magnetita aumentasse aproximadamente 2.600 vezes em relação ao método de coprecipitação analisado anteriormente (Tabela 4). Portanto, é evidente que o aprimoramento do controle de tamanho e forma de nanopartículas leva a aumentos nos custos de produção. A produção de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana dispensa o uso de reagentes caros como a poli-arginina pois o controle de tamanho é feito de forma fisiológica pelas MTB. Além disso, a forma e tamanho regular é superior aos métodos de síntese química mencionados (Figura 21). Outra consideração importante é que os resíduos gerados durante o bioprocessamento são menos agressivos ao meio ambiente.

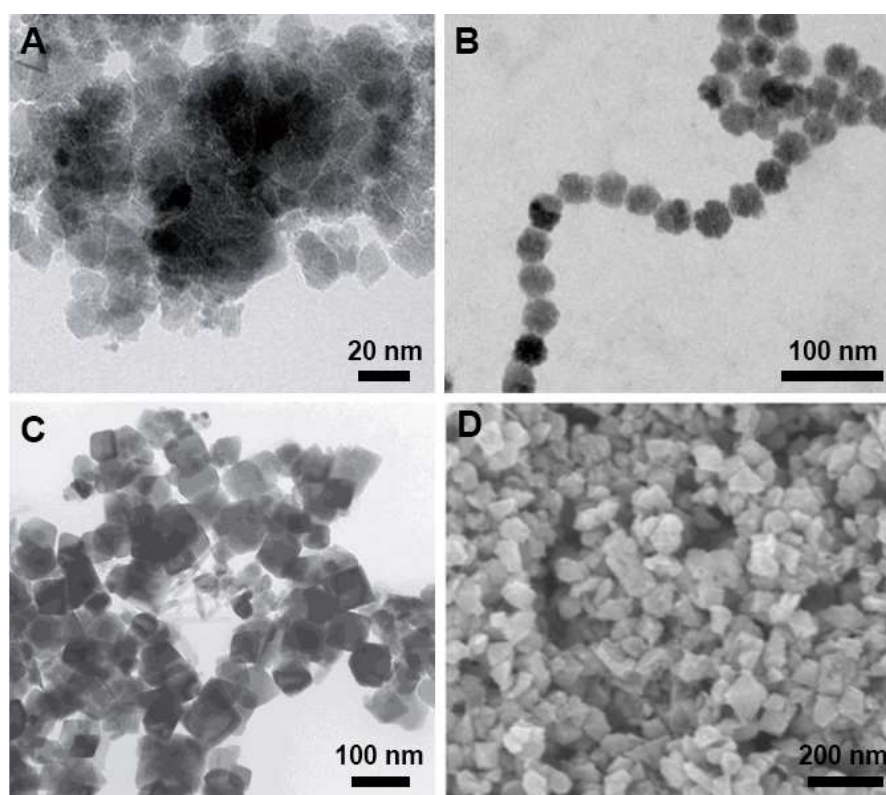


Figura 21. Nanopartículas magnéticas artificiais produzidas por diferentes métodos: nanopartículas de magnetita produzidas por coprecipitação simples (A) e na presença de poliarginina (B) (Baumgartner *et al.*, 2014); nanocubos de magnetita produzidos por decomposição térmica (C) (Shen *et al.*, 2014); nanopartículas de greigita similares a BMs produzidas por decomposição térmica (D) (Feng *et al.*, 2013).

O preço da produção de magnetita no bioprocessamento atual (US\$ 169,26 por g de magnetita; Tabela 4) ainda é maior do que o da produção química e do bioprocessamento anterior usando *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1. A maior produção de magnetita alcançada em um biorreator em escala de bancada (7,5 L) foi de 280,49 mg.L⁻¹ em um processo semicontínuo

(Zhang *et al.*, 2011; Tabela 1). Para esse último caso, o custo de produção calculado (US\$ 16,86 por g de magnetita; Tabela 4) foi mais barato do que a maioria das nanopartículas produzidas artificialmente.

Apesar de melhorar o controle das características físicas, as nanopartículas magnéticas sintetizadas quimicamente geralmente não possuem um revestimento externo como as membranas dos BMs. Como discutido anteriormente, a membrana externa de BMs fornece nanopartículas biogênicas com boas características de dispersão, biocompatibilidade e versatilidade para modificação da superfície (Alphandéry, 2014; Vargas *et al.*, 2018). A reconstrução da membrana dos BMs foi realizada por revestimento com fosfatidilcolina (Yoshino *et al.*, 2008), cujo caráter polar se assemelha ao dos fosfolípidios originais da membrana (Grünberg *et al.*, 2004). A fosfatidilcolina também tem sido usada como revestimento lipídico para nanopartículas sintéticas (Zhang *et al.*, 2012). Em qualquer caso, os preços de revestimento de fosfatidilcolina (US\$ 250-873 por g de magnetita) são muito maiores do que os da produção exclusiva de nanopartículas magnéticas em qualquer abordagem sintética.

Aqui, apenas os custos de material foram considerados para análise. No entanto, o uso de gases e o gasto energético com aquecimento e agitação não é considerado e pode influenciar significativamente o custo final. Além disso, a massa de magnetita produzida em sínteses químicas foi calculada com base em um rendimento estequiométrico (ou seja, quantidade total de ferro convertido em magnetita). Na prática, os rendimentos para a síntese de magnetita podem ser consideravelmente menores e, conseqüentemente, o custo por massa aumentaria.

As vantagens da produção biotecnológica de nanopartículas magnéticas incluem uniformidade de geometria, controle da composição química e estreita distribuição de tamanho. A presença da membrana fosfolipídica envolvendo o BM é a principal vantagem financeira, uma vez que os revestimentos artificiais são mais caros. Além disso, estes revestimentos artificiais são compostos por apenas um tipo de fosfolípido. Em contrapartida, a membrana do BM possui composição lipídica e protéica complexa (Grünberg *et al.*, 2004) que se assemelha às de outras membranas biológicas. Provavelmente, uma das maiores limitações da produção biotecnológica de nanopartículas magnéticas é o tempo de cultivo. Culturas em batelada de MTB levam em torno de 50 a 120 h para atingir concentrações de magnetita que apresentem bom custo-benefício em comparação com algumas horas em

sínteses químicas. Nesse sentido, a cultura contínua permite que a magnetita microbiana seja produzida em altas concentrações por períodos prolongados.

5.5. Nanoformulações

Publicações prévias descrevem o uso de GA como agente de ligação cruzada para imobilização de fármacos sobre BMs (Matsunaga e Kamiya, 1987; Sun, Duan, *et al.*, 2008). A partir disso, diferentes concentrações de GA, variando de 0,2% a 12,5%, foram utilizadas para o tratamento de BM com AmB (BM-GA -AmB). Além disso, os poliaminoácidos também são agentes promissores para a adsorção de fármacos nessas nanopartículas com base nas interações de carga (Sun *et al.*, 2011). Assim, os BMs foram revestidos com PLL (concentrações variando de 0,001 a 0,1 %) antes do tratamento com AmB. BMs revestidas com PLL também foram tratadas com AmB na presença e ausência de GA (BM-PLL-GA-AmB e BM-PLL-AmB, respectivamente) na concentração que proporcionou a melhor eficiência de captura de fármaco (PLL 0,1 %). Quando aplicado como o único agente de ligação, as concentrações máximas testadas de GA e PLL resultaram na eficiência de ligação mais substancial (Figura 11A) e maior carregamento de fármaco (Figura 11B). No geral, todos os BMs tratados com concentrações de PLL testadas resultaram numa melhor captura de fármacos do que aqueles usando GA. Isto é provavelmente devido ao fato de que o GA se liga apenas aos grupos amino localizados nas proteínas da membrana da BM, enquanto o PLL recobre a superfície da BM como um todo por causa da carga negativa líquida fornecida pelos fosfolípidios. Não houve diferença estatística significativa na eficiência de ligação e carga de fármaco entre BM-PLL-AmB (PLL 0,1 %; $45,0 \pm 5,4\%$ e $21,6 \pm 4,9 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$, respectivamente) e quando ambos os reagentes (BM-PLL-GA-AmB) foram utilizados (PLL 0,1 % + GA12,5%; $52,7 \pm 2,1\%$ e $25,3 \pm 1,9 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$, respectivamente).

A fixação e adsorção de AmB em BMs foram então confirmadas usando análises por FTIR (Figura 14) e uma representação esquemática de cada preparação foi proposta na Figura 16. Picos de vibração de estiramento Fe-O da magnetita foram encontrados em todas as preparações de nanopartículas, variando de 534 a 564 cm^{-1} . Os picos 1643 e 1654 cm^{-1} no BM-GA-AmB e BM-PLL-GA-AmB são atribuídos a vibrações ($-\text{CN}$), sugerindo a ligação covalente de AmB (Niemirowicz *et al.*, 2016; Sun, Duan, *et al.*, 2008), conforme ilustrado nas estruturas (Figura 16C e D). As bandas variando de 2943 e 2827 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ da estrutura de polieno do AmB (Gagoś e

Arczewska, 2010). No BM-PLL-AmB e BM-PLL-GA-AmB, o pico 1622 cm^{-1} é atribuído à vibração de flexão de N–H de grupos amida do esqueleto de poliaminoácido da PLL (Alphandéry *et al.*, 2017; Figura 16D e E). Os picos de 1528 cm^{-1} no BM-PLL-AmB e BM-PLL-GA-AmB e de 1562 cm^{-1} no BM-GA-AmB e AmB correspondem às vibrações superpostas de flexão de $-\text{NH}_3$ e alongamento de $-\text{COO}-$ do AmB (Gagoś e Arczewska, 2010) (Figura 16B-E) Os picos de $1383\text{-}1401\text{ cm}^{-1}$ em nanopartículas funcionalizadas e AmB correspondem a vibrações de dobramento do $-\text{COO}^-$ e $-\text{C}=\text{O}$ da AmB. Finalmente, os picos de $1072\text{-}1037\text{ cm}^{-1}$ e $1000\text{-}1014\text{ cm}^{-1}$ dos mesmos espectros são atribuídos ao estiramento da piranose (C–O–C) e ao dobramento do $-\text{CH}$ em configuração *trans* da estrutura de polieno (Gagoś e Arczewska, 2010; Figura 16B-E). Estes resultados confirmam a ligação covalente de AmB a estas preparações.

Medidas da espessura da membrana dos BMs de diferentes preparações dos nanoconjugados a partir de imagens de MET revelaram as interações de superfície observadas após experimentos de funcionalização. Todas as preparações tinham medidas de espessura da membrana progressivamente maiores do que os BMs não funcionalizados (Figura 12), com a maior espessura de membrana observada para o BM-PLL-GA-AmB, quando a maioria dos reagentes estava aderida à superfície dos BMs. Estes resultados sugerem que a membrana do BM se tornou mais espessa à medida que mais porções funcionais foram adicionadas à sua superfície. O aumento da espessura da membrana pode ser vantajoso para este tipo de nanoformulação pois confere uma maior distância entre os núcleos minerais do BMs, desfavorecendo a interação magnética entre os mesmos e, portanto, a sua agregação. Entretanto, imagens de MET também sugeriram algum nível de agregação de nanopartículas, especialmente naquelas preparadas com GA. Isso provavelmente se deve a ligações cruzadas inespecíficas nos BMs, o que também poderia explicar uma menor eficiência de ligação ao usar esse GA como agente de ligação cruzada.

O potencial zeta foi medido para avaliar as propriedades dispersivas das nanopartículas funcionalizadas. Para os BMs não funcionalizados, um potencial zeta de $-33,6 \pm 2,3\text{ mV}$ foi encontrado e está de acordo com os valores encontrados para o BM cuboctaédrico das cepas do gênero *Magnetospirillum* (Deng *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014) (Figura 13). Valores entre -33 e -28 mV foram observados para as preparações testadas, exceto o BM-PLL-AmB, cujo potencial foi de $-15,1 \pm 3,8\text{ mV}$ (Figura 13). Apesar do aumento do valor do potencial zeta, todas as dispersões das preparações testadas podem ser

consideradas moderadamente estáveis (Bhattacharjee, 2016). A mudança no potencial zeta das partículas derivadas de diferentes métodos de funcionalização mostrou a mudança da carga da membrana à interação com as moléculas de GA, PLL e AmB.

As preparações que apresentaram o maior carregamento foram escolhidas para análises posteriores de espectroscopia de UV-Vis e ensaio de liberação. O ensaio espectroscópico é preconizado pela Farmacopeia Internacional (OMS, 2018) e confirma a presença e a estabilidade do fármaco na formulação farmacêutica testada (Legrand *et al.*, 1997). A presença e a intensidade relativa dos três picos de absorção (Figura 15), tanto nas nanoformulações como no fármaco livre, está em conformidade com o padrão farmacopeico. Isto corrobora os resultados que foram obtidos através dos métodos reproduzidos da literatura e fornecendo uma resposta similar àquelas exigidas no caso de medicamentos já aprovados.

Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que BMs com morfologia prismática têm seu potencial de funcionalização explorado. Por causa disso, as propriedades magnéticas para esse tipo de nanopartícula não estavam disponíveis e precisavam ser avaliadas. As medidas de magnetização foram realizadas em BMs não funcionalizadas e revelaram, como esperado, uma única partícula de domínio magnético (Figura 17). As características magnéticas encontradas foram compatíveis com os valores reportados para os BMs cubooctaédricos de *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Timko *et al.*, 2009), e nanopartículas de greigita bioinspiradas (Feng *et al.*, 2013). Esses achados refletem um potencial de aplicabilidade similar para os BMs prismáticos alongados de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e as nanopartículas já estudadas.

As variações de temperatura (Figura 18) alcançadas durante a exposição ao AMF são menores do que os valores relatados anteriormente para hipertermia usando BMs (Alphandéry *et al.*, 2011; Timko *et al.*, 2009). No entanto, um aumento de temperatura similar foi obtido usando parâmetros similares para o aquecimento de BMs de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 induzido por AMF (Mannucci *et al.*, 2014).

A quantidade de AmB liberada no meio em relação à quantidade de fármaco associado à nanopartícula foi medida na condição padrão de liberação do fármaco (37 °C – Legrand *et al.*, 1997) e sob a aplicação de um AMF. O aumento de aproximadamente quatro vezes na liberação de AmB de ambas as nanoformulações submetidas ao AMF (Figura 19) é atribuído ao relaxamento de Brown, que responde pela rotação de nanopartículas nestas condições

(Mura, Nicolas e Couvreur, 2013; Nikiforov e Filinova, 2009). Isso também foi observado em um estudo no qual um aumento de cerca de quatro vezes da liberação de doxorubicina a partir de nanopartículas de magnetita sintéticas decoradas com ciclodextrina foi observado sem o aumento da temperatura (Santos *et al.*, 2018). Em outro estudo, uma liberação aguda de rodamina B de BMs de rodamina B-fluorescente em resposta a um AMF ocorreu em uma variação de temperatura menor que 2,5 °C (Alphandéry *et al.*, 2018).

O teste de estabilidade durante congelamento-descongelamento é recomendado pela Organização Mundial da Saúde como teste adicional específico, especialmente para fármacos que são distribuídos para regiões menos desenvolvidas ou de climas tropicais (OMS, 2009). Adicionalmente, estas regiões são as que abrigam os maiores índices de prevalência de leishmanioses e meningite criptocócica (Dawit, Girma e Simenew, 2013; Williamson *et al.*, 2016). Desta forma, a armazenagem sob congelamento e posterior descongelamento deve garantir a estabilidade do fármaco durante a sua distribuição para estas regiões. Nos resultados, tem-se que 43-45 % da AmB ainda se encontram presentes na nanoformulação após 3 ciclos (Figura 20). Portanto, é necessário, para a conservação da substância ativa presente na formulação, que sejam adotadas condições de armazenamento transporte em baixas temperaturas.

6. Conclusão

Em cultura alimentada em batelada, o fornecimento de N_2O e Fe^{2+} levou à maior produção de magnetita na cepa MV-1^T em biorreator (32,5 mg.L⁻¹). No entanto, uma diminuição na produção global de BMs por célula e um aumento no número de células não magnéticas afetaram negativamente a produtividade de magnetita em fases posteriores de cultivo. Devido à alta demanda de N_2O para a produção de BMs e à necessidade de um fluxo contínuo de meios de crescimento, foi desenvolvido um regime de injeção de N_2O . Nossa estratégia de pulso leva a um suprimento adequado de acceptor de elétrons final para produção contínua de BMs. Assim, uma cultura contínua foi projetada para manter uma alta atividade de formação de BMs em células bacterianas por longos períodos. Apesar da produção máxima alcançada ser menor que a da batelada alimentada, produções tão altas quanto 26,1 mg.L⁻¹ foram mantidas até 168 h.

Em geral, os custos da síntese química da magnetita são menores, mas as nanopartículas não possuem algumas características físico-químicas únicas dos BMs. Além disso, o custo de produção aumenta proporcionalmente ao controle de forma e tamanho. Para as nanopartículas magnéticas biogênicas, a principal vantagem financeira é a presença de uma membrana biológica que reveste o BM, que confere aos BMs propriedades físicas e químicas superiores. O custo para o revestimento artificial com membrana análoga é superior à própria produção por coprecipitação ou decomposição térmica.

Experimentos futuros de cultivo terão como objetivo melhorar o rendimento de magnetita e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção de BMs com morfologia prismática. Duas estratégias possíveis poderiam estar fornecendo outros nutrientes não examinados aqui (por exemplo, solução mineral) e variando as taxas de diluição em cultura contínua. Uma compreensão mais profunda da fisiologia bacteriana através do exame do genoma focado no metabolismo pode ajudar a desenvolver novas composições de meios e estratégias de cultivo.

Neste trabalho, são relatadas a primeira funcionalização dos BMs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e a primeira funcionalização de um fármaco com ação antifúngica e antiparasitária em superfície de BMs. Em nossos experimentos, evidencia-se que a PLL aumenta a taxa de ligação da AmB aos BMs na presença e ausência de GA. Nós também demonstramos a liberação controlada de fármacos a partir desses conjugados com a aplicação de um AMF, que pode ser útil na quimioterapia localizada. Esses resultados expandem a aplicabilidade dessas nanopartículas magnéticas no tratamento de doenças negligenciadas.

7. Referências

- ABREU, F. *et al.* Cryo-electron tomography of the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei*: Insights into the biomineralization of prismatic magnetosomes. **Journal of Structural Biology**, v. 181, n. 2, p. 162–168, 2013.
- ABREU, F. *et al.* Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 4426–4441, 2016.
- ABREU, F. *et al.* Culture-independent characterization of a novel uncultivated magnetotactic member of the Betaproteobacteria class of the Proteobacteria phylum from an acidic lagoon. **Environmental Microbiology**, p. 1–23, 2018.
- ALPHANDÉRY, E. *et al.* Heat production by bacterial magnetosomes exposed to an oscillating magnetic field. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 1, p. 18–22, 2011.
- ALPHANDÉRY, E. Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 5, 2014.
- ALPHANDÉRY, E. *et al.* Development of non-pyrogenic magnetosome minerals coated with poly-L-lysine leading to full disappearance of intracranial U87-Luc glioblastoma in 100% of treated mice using magnetic hyperthermia. **Biomaterials**, v. 141, p. 210–222, 2017.
- ALPHANDÉRY, E. *et al.* Fluorescent magnetosomes for controlled and repetitive drug release under the application of an alternating magnetic field under conditions of limited temperature increase (<2.5 °C). **Nanoscale**, v. 10, n. 23, p. 10918–10933, 2018.
- ARAKAKI, A. *et al.* Comparative subcellular localization analysis of magnetosome proteins reveals a unique localization behavior of Mms6 protein onto magnetite crystals. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 20, p. 2794–2802, 2016.
- ARAÚJO, A. *et al.* Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 389–430, 16 jan. 2015.
- BARBER-ZUCKER, S.; ZARIVACH, R. A look into the biochemistry of Magnetosome biosynthesis in magnetotactic bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 13–22, 2017.
- BAUMGARTNER, J. *et al.* Biomimetic magnetite formation: From biocombinatorial approaches to mineralization effects. **Langmuir**, v. 30, n. 8, p. 2129–2136, 2014.
- BAZYLINSKI, D. A. *et al.* *Magnetovibrio blakemorei* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae) isolated from a salt marsh. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1824–1833, 2013.
- BAZYLINSKI, D. A.; FRANKEL, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 217–30, 2004.
- BAZYLINSKI, D. A.; LEFÈVRE, C. Magnetotactic bacteria from extreme environments. **Life**, v. 3, n. 2, p. 295–307, 2013.
- BELLINI, S. On a unique behavior of freshwater bacteria. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 1, p. 3–5, 2009.
- BERRY, S. L. *et al.* Nanoparticle-mediated magnetic hyperthermia is an effective method for

killing the human-infective protozoan parasite *Leishmania mexicana* in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BLAKEMORE, R. P.; MARATEA, D. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. **Journal of bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 720–729, 1979.

BORG, S. *et al.* New vectors for chromosomal integration enable high-level constitutive or inducible magnetosome expression of fusion proteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2609–2616, 2014.

BURKE, F. Scale up and scale down of fermentation processes. *In*: MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (Eds.). **Practical fermentation technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. p. 231–270.

CHENG, L. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and recombinant plasmid pHSP70-Plk1-shRNA by bacterial magnetosomes for osteosarcoma therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 5277–5286, out. 2016.

CORNEJO, E. *et al.* Dynamic remodeling of the magnetosome membrane is triggered by the initiation of biomineralization. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2016.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. **Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 2, 2013.

DENG, Q. *et al.* Construction of a novel magnetic targeting anti-tumor drug delivery system: Cytosine arabinoside-loaded bacterial magnetosome. **Materials**, v. 6, n. 9, p. 3755–3763, 2013.

DUBBELS, B. L. *et al.* Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2931–2945, 2004.

ESTANQUEIRO, M. *et al.* Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.

FENG, M. *et al.* Bioinspired greigite magnetic nanocrystals: chemical synthesis and biomedicine applications. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2994, p. 327–345, 2013.

FERNÁNDEZ-CASTANÉ, A. *et al.* Development of a simple intensified fermentation strategy for growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1: physiological responses to changing environmental conditions. **New Biotechnology**, 2018.

FRANKEL, R. B.; BAZYLINSKI, D. A. Magnetosomes and magneto-Aerotaxis. *In*: **Bacterial Sensing and Signaling**. Basel: KARGER. 16p. 182–193, 2009.

GAGOŚ, M.; ARCZEWSKA, M. Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 11, p. 2124–2130, 2010.

GRAY, K. C. *et al.* Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 2012.

GRÜNBERG, K. *et al.* Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane

in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1040–1050, 2004.

GUAN, F. *et al.* Ganglioside-magnetosome complex formation enhances uptake of gangliosides by cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6919–6930, 2015.

HEYEN, U.; SCHULER, D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 536–544, 2003.

HONDA, T.; TANAKA, T.; YOSHINO, T. Stoichiometrically controlled immobilization of multiple enzymes on magnetic nanoparticles by the magnetosome display system for efficient cellulose hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 12, p. 3863–3868, 2015.

HOSKISSON, P. A.; HOBBS, G. Continuous culture - Making a comeback? **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3153–3159, 2005.

KE, L. *et al.* Characteristics and optimised fermentation of a novel magnetotactic bacterium, *Magnetospirillum* sp. ME-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 14, 2018.

KHARISOV, B. I. *et al.* Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-Aqueous solvents: Recent trends. **RSC Advances**, v. 4, n. 85, p. 45354–45381, 2014.

KIM, B. H.; GADD, G. M. **Bacterial Physiology and Metabolism**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

KIM, D. *et al.* Synthesis of uniform ferrimagnetic magnetite nanocubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 454–455, 2009.

KOKSHAROV, Y. A. Magnetism of Nanoparticles: Effects of Size, Shape, and Interactions. In: GUBIN, S. P. (Ed.). **Magnetic Nanoparticles**. [s.l.] Wiley-VCH, 2009. p. 197–254.

KUDR, J. *et al.* Magnetic nanoparticles: from design and synthesis to real world applications. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, p. 243, 2017.

KWON, H. J. *et al.* Large-scale synthesis and medical applications of uniform-sized metal oxide nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 30, n. 42, p. 1–24, 2018.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LEFÈVRE, C. T.; BAZYLINSKI, D. A. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 77, n. 3, p. 497–526, 2013.

LEGRAND, P. *et al.* Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 4, n. 5, p. 311–319, 1997.

LI, A. *et al.* Rapid separation and immunoassay for low levels of *Salmonella* in foods using magnetosome-antibody complex and real-time fluorescence quantitative PCR. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 21, p. 3437–3443, 2010.

LIE, S. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 1, p. 37–41, 1973.

LIN, W. *et al.* Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria.

Environmental Microbiology, v. 16, n. 9, p. 2646–2658, 2014.

LIN, W. *et al.* Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. **ISME Journal**, v. 12, n. 6, p. 1508–1519, 2018.

LINKE, H. A. .; MECHLINSKI, W.; SCHAFFNER, C. P. Production of amphotericin B-14C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the amphotericin B-14C-methyl-ester. **The Journal of Antibiotics**, v. 27, n. 3, p. 155–160, 1974.

LIU, J. *et al.* A mutation upstream of an ATPase gene significantly increases magnetosome production in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 551–558, 2008.

LIU, R. T. *et al.* Heating effect and biocompatibility of bacterial magnetosomes as potential materials used in magnetic fluid hyperthermia. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 1, p. 31–39, 2012.

LIU, Y. *et al.* Large-scale production of magnetosomes by chemostat culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* at high cell density. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 1, p. 99, 2010.

LLOYD, J. R.; BYRNE, J. M.; COKER, V. S. Biotechnological synthesis of functional nanomaterials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 509–515, 2011.

LOWER, B. H.; BAZYLINSKI, D. A. The bacterial magnetosome: A unique prokaryotic organelle. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1–2, p. 63–80, 2013.

MACAULEY-PATRICK, S.; FINN, B. Modes of fermenter operation. *In*: MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (Eds.). . **Practical fermentation technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. p. 69–96.

MAEDA, Y. *et al.* Noncovalent immobilization of streptavidin on in vitro- and in vivo-biotinylated bacterial magnetic particles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5139–45, ago. 2008.

MANNUCCI, S. *et al.* Magnetic nanoparticles from *Magnetospirillum gryphiswaldense* increase the efficacy of thermotherapy in a model of Colon Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MATSUNAGA, T.; KAMIYA, S. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 2, p. 328–332, 1987.

MÉRIAUX, S. *et al.* Magnetosomes, biogenic magnetic nanomaterials for brain molecular imaging with 17.2 T MRI Scanner. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 7, p. 1076–1083, 2015.

MIRABELLO, G.; LENDERS, J. J. M.; SOMMERDIJK, N. A. J. M. Bioinspired synthesis of magnetite nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 18, p. 5085–5106, 2016.

MOLLOY, S. F. *et al.* Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 1004–1017, 2018.

MUNASINGHE, P. C.; KHANAL, S. K. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels:

- Opportunities and challenges. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 5013–5022, 2010.
- MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature materials**, v. 12, n. 11, p. 991–1003, 2013.
- MURAT, D. *et al.* Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 12, p. 5593–5598, 2010.
- NIEMIROWICZ, K. *et al.* Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 8, p. 2395–2404, 2016.
- NIKIFOROV, V. N.; FILINOVA, E. Y. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. *In*: GUBIN, S. P. (Ed.). **Magnetic Nanoparticles**. [s.l.] Wiley-VCH, 2009. p. 393–455.
- NUNES-ALVES, C. New tricks for old drugs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 68–68, 2015.
- OMS. **Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1F/Stability_Guideline_WHO_2018.pdf>. Acesso em: 31 de maio de 2019.
- OMS. Amphotericin B for injection (Amphotericini B ad injectionem). *In*: **The International Pharmacopoeia**. 8th. ed. [s.l.: s.n.]. p. 2018.
- PÓSFAL, M. *et al.* Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 344, p. 1–15, 2013.
- REDDY, L. H. *et al.* Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5818–5878, 2012.
- SALDANHA, C. A. *et al.* Antifungal activity of amphotericin B conjugated to nanosized magnetite in the treatment of paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2016.
- SANTOS, E. C. D. S. *et al.* AMF-responsive doxorubicin loaded β -cyclodextrin-decorated superparamagnetic nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 671–680, 2018.
- SCHÜBBE, S. *et al.* Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 19, p. 5779–5790, 2003.
- SCHWARTZ-DUVAL, A. S.; SHAPIRO, E. M. Physico-chemical and financial Comparisons of one-step iron oxide nanocrystal syntheses for nanoparticle fabrication. **Nanoscience and Nanotechnology Letters**, v. 6, n. 7, p. 618–623, 2014.
- SHAHWAN, T. *et al.* Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, n. 1, p. 258–266, 2011.
- SHEN, L. *et al.* Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. **Ceramics International**, v. 40, n. 1, p. 1519–1524, 2014.
- SILVA, K. T. *et al.* Optimization of magnetosome production and growth by the

magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 through a statistics-based experimental design. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2823–2827, 2013.

SPARKS, N. H. C. *et al.* Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 98, n. 1, p. 14–22, 1990.

SUN, J.-B.; ZHAO, F.; *et al.* High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 389–97, 2008.

SUN, J.-B.; DUAN, J.-H.; *et al.* Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 1313–20, 2008.

SUN, J. *et al.* Bacterial magnetosome: A novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], v. 2011, p.1-13, 2011.

TAKAHASHI, M.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T. Surface modification of magnetic nanoparticles using asparagines-serine polypeptide designed to control interactions with cell surfaces. **Biomaterials**, v. 31, n. 18, p. 4952–4957, 2010.

TAMIRU, A. *et al.* Safety and efficacy of liposomal amphotericin B for treatment of complicated visceral leishmaniasis in patients without HIV, North-West Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

TIMKO, M. *et al.* Magnetic properties and heating effect in bacterial magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1521–1524, 2009.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P. Amphotericin B formulations and drug targeting. v. 97, n. 7, p. 2405–2425, 2008.

TRUSKEWYCZ, A.; SHUKLA, R.; BALL, A. S. Phytofabrication of iron nanoparticles for hexavalent chromium remediation. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 10781–10790, 2018.

UEBE, R.; SCHÜLER, D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 621–637, 2016.

ULBRICH, K. *et al.* Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 5338–5431, 2016.

ULLRICH, S. *et al.* A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. **Microbiology**, v. 187, n. 21, p. 7176–7184, 2005.

VARGAS, G. *et al.* Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: Mini-review. **Molecules**, v. 23, n. 2438, 2018.

VIOLLIER, E. *et al.* The ferrozine method revisited: Fe (II)/Fe (III) determination in natural waters. **Applied Geochemistry**, v. 15, n. 6, p. 785–790, 2000.

WAITES, M. J. *et al.* **Industrial Microbiology: An Introduction**. London: Blackwell Science, 2001.

- WANG, K. *et al.* Interruption of the denitrification pathway influences cell growth and magnetosome formation in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 55–62, 2011.
- WEI, J. *et al.* Submerged culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* under N₂-fixing condition and regulation of activity of nitrogen fixation. **Chinese Science Bulletin**, v. 47, n. 24, p. 2095–2099, 2002.
- WEISS, R. F. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. **Deep-Sea Research**, v. 17, n. 4, p. 721–735, 1970.
- WEISS, R. F.; PRICE, B. A. Nitrous oxide solubility in water and seawater. **Marine Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 347–359, 1980.
- WEN, T. *et al.* A novel role for Crp in controlling magnetosome biosynthesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- WIJNANT, G. J. *et al.* Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 223–228, 2018.
- WILLIAMSON, P. R. *et al.* Cryptococcal meningitis: Epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 2016.
- XU, J. *et al.* Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 4–11, 2014.
- YANG, C.-D. *et al.* Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 1, p. 13–19, 2001.
- YOSHINO, T. *et al.* Magnetic cell separation using nano-sized bacterial magnetic particles with reconstructed magnetosome membrane. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 470–477, 2008.
- YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T. Efficient and Stable Display of Functional Proteins on Bacterial Magnetic Particles Using Mms13 as a Novel Anchor Molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 465–471, 2006.
- ZHANG, S. *et al.* Biocompatible phosphatidylcholine bilayer coated on magnetic nanoparticles and their application in the extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water and milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 38–45, maio 2012.
- ZHANG, Y. *et al.* Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5851–6, 2011.

ANEXO 1 – Composição do meio de cultivo otimizado para *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

Tabela A1. Componentes do meio de cultivo otimizado para *Mv. blakemorei* MV-1^T (Silva *et al.*, 2013)

Componente	Quantidade
Solução de minerais de Wolfe	33,4 mL
Succinato de sódio	41,8 mM
Hidrolisado de caseína	0,33%
Acetato de sódio	2,4 mM
Cisteína	0,82 mM
FeSO ₄	100 µM
Água do mar artificial	suficiente para 1 L

A solução de minerais apresenta composição, por L, de 1,5 g de ácido nitriloacético, 3,0g de MgSO₄.7H₂O, 0,5g de MnSO₄-H₂O, 1,0g de NaCl, 0,1g de FeSO₄.7H₂O, 0,1g de CoCl₂.6H₂O, 0,1g de CaCl₂, 0,1g de ZnSO₄.7H₂O, 0,01g de CuSO₄.5H₂O, 0,01g de AlK(SO)₄.12H₂O, 0,01g de H₃BO₃ e 0,01g de Na₂MoO₄-2H₂O dissolvidos em água ultrapura. A água do mar artificial (ASW) apresenta composição, por L, de 16,4 g de NaCl, 3,5 g de MgCl₂.6H₂O, 2,7 g de Na₂SO₄, 0,47 g de KCl, e 0,39 g de CaCl₂.2H₂O dissolvidos em água ultrapura.

ANEXO 2 – Análise de custo para produção microbiana de BMs através do cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e *Mv. gryphiswaldense* cepa MSR-1 em biorreator.

Tabela A2.1. Comparação detalhada de custos para produção BMs através do cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e *Mv. gryphiswaldense* cepa MSR-1 em biorreator

<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1 ^T				<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1			
Cultivo contínuo – 4 L (presente trabalho)				Cultivo semicontínuo – 7,5 L (Zhang <i>et al.</i> , 2011)			
	Custo (US\$/g ou mL)	quantidade de material (g ou mL)	Custo total		Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo total
Minerais de Wolfe (tabela A2.2)	0,0013	133,76	0,24	Ácido láctico	0,014	100	1,38
Succinato de sódio (g)	0,093	45,2	4,20	Amônio 28%	0,033	18	0,59
Acetato de sódio	0,18	0,8	0,14	Fosfato de potássio	0,10	6,3	0,61
Hidrolisado de caseína	0,12	13,36	1,65	Fosfato de magnésio	0,06	2,52	0,16
Água do mar artificial (tabela A2.3)	0,0023	4000	9,24	Cloreto férrico	0,41	2	0,82
Óxido nitroso (m ³)	36,64	0,045	1,65	Extrato de levedura	0,17	6,3	1,07
Cisteína	1,17	0,4	0,47	Minerais de Wolfe (tabela A2.2)	0,0018	7,35	0,02
Sulfato ferroso	0,14	0,112	0,02	Lactato de sódio (70-80%)	0,088	6	0,53
				Cloreto de amônio	0,079	1	0,08
CUSTO TOTAL (US\$)			17,60				4,73
RENDIMENTO (mg)			104,25				280,49
Magnetita (US\$/g)			169,26				16,86

*valores por m³.

ANEXO 2 - continuação

Tabela A2.2. Componentes e preços por g para 1 L de solução de minerais de Wolfe.

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo (US\$)
Sulfato de magnésio	0,094	3	0,282
Sulfato de manganês	0,302	0,5	0,151
Cloreto de sódio	0,0539	1	0,0539
Sulfato ferroso	0,1198	0,1	0,01198
Cloreto de cobalto	0,732	0,1	0,0732
Cloreto de cálcio	0,1474	0,1	0,01474
Sulfato de zinco	0,1302	0,1	0,01302
Sulfato de cobre	0,122	0,01	0,00122
Sulfato de alumínio- potássio	0,443	0,01	0,00443
Ácido bórico	0,101	0,01	0,00101
Sódio de sódio	0,909	0,01	0,00909
Ácido nitriloacético	0,433	1,5	0,6495
Hidróxido de potássio*	0,087	0,1	0,0087
Total (US\$/L)			1,27

* a quantidade de hidróxido de potássio é uma estimativa porque é usada apenas para ajuste de pH.

Tabela A2.3. Componentes e preços por g para 1 L de água do mar artificial.

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo (US\$)
Cloreto de sódio	0,0539	16,4	0,88396
Cloreto de magnésio	0,1584	3,49	0,552816
Sulfato de sódio	0,1038	2,74	0,284412
Cloreto de cálcio	0,1392	0,386	0,053731
Cloreto de potássio	0,0802	0,466	0,037373
Total (US\$/L)			1,81

ANEXO 3 – Análise detalhada de custos para produção de nanopartículas magnéticas por métodos químicos selecionados.

Tabela A3.1. Análise de custos para produzir nanocubos de magnetita por coprecipitação, conforme descrito por Shen *et al.* (2014).

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo total
Sulfato ferroso	0,14	2,8	0,38
Sulfato férrico	0,16	4,0	0,63
SDS	0,70	0,8	0,56
TOTAL (US\$)			1,57
RENDIMENTO (g)			2,3
Magnetita (US\$/g)			0,68

SDS = dodecilsulfato de sódio

Tabela A3.2. Análise de custos para produção de nanocubos magnetita por decomposição térmica descrita por Kim *et al.* (2009).

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo total
Acetilacetonato férrico	0,42	0,706	0,30
Ácido oleico	0,05	1,129	0,06
Éter benzílico	0,05	10,4	0,48
Tolueno	0,05	40	2,14
Hexano	0,10	10	1,01
Clorofórmio	0,08	10	0,81
TOTAL			4,79
RENDIMENTO (mg)			155
Magnetita (US\$/g)			30,92

Tabela A3.3. Análise de custos para produzir nanopartículas de greigita similares a BMs por decomposição térmica, conforme descrito por Feng *et al.* (2013).

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo total
Acetilacetato férrico	0,42	0,0882925	0,04
β -ciclodextrina	1,59	0,238745	0,38
PEG 4000	0,054	2	0,11
Etilenoglicol	0,057	25	1,42
Tioacetamida	0,45	0,026	0,01
TOTAL (US\$)			1,95
RENDIMENTO (mg)			0,0193
magnetita (US\$/g)			101,23

PEG 4000 = polietileno glicol com peso molecular de 4000

Tabela A3.4. Análise de custo para produzir nanopartículas de magnetita similares a BMs por coprecipitação suplementada com poli-L-arginina conforme descrito por Baumgartner *et al.* (2014).

	Custo (US\$/g ou mL)	Quantidade de material (g ou mL)	Custo total
Cloreto férrico	0,41	0,06	0,03
Cloreto ferroso	3,21	0,03	0,08
Poli-L-arginina	2500,00	0,10	250,00
TOTAL (US\$)			250,11
RENDIMENTO (mg)			139
Magnetita (US\$/g)			1.798,56