

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Elisandra Maria dos Santos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO
PEPTÍDEO Lrot3.6 NANOENCAPSULADO FRENTE ÀS BACTÉRIAS
E. coli, *S. aureus* E *S. epidermidis***

Dissertação

JUIZ DE FORA
2018

ELISANDRA MARIA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO
PEPTÍDEO Lrot3.6 NANOENCAPSULADO FRENTE ÀS BACTÉRIAS
E. coli, *S. aureus* E *S. epidermidis***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira

JUIZ DE FORA

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Elisandra Maria dos.

Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado frente às bactérias E. coli, S. aureus e S. epidermidis / Elisandra Maria dos Santos. -- 2018.

107 f.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Coorientadora: Michele Munk Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. Infecções bacterianas. 2. AMPs. 3. Nanotecnologia. 4. AMPs nanoencapsulados. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Pereira, Michele Munk, coorient. III. Título.

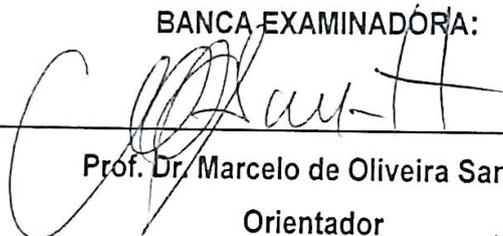
ELISANDRA MARIA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO PEPTÍDEO
Lrot3.6 NANOENCAPSULADO FRENTE ÀS BACTÉRIAS *E.coli*, *S.aureus* E
S. epidermidis

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

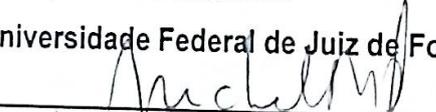
Aprovada em: 20, 02, 18.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

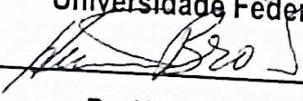


Prof.ª Dr.ª Michele Munk Pereira
Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Humberto de Mello Brandão
Embrapa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de realizar o Mestrado.

A CAPES, pela bolsa que financiou meus estudos e estadia em Juiz de Fora.

A Embrapa Gado de Leite, por conceder sua infraestrutura, permitindo que realizasse parte dos meus experimentos, em especial ao Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal e ao Dr. Humberto de Mello Brandão.

Ao Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana da UFJF, por ceder as ATCCs para realização dos ensaios.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos, por me aceitar, confiar em mim e no meu potencial. Por todo apoio, ensinamentos, prontidão, atenção, incentivo e sobretudo paciência nesses dois anos.

A Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira, por todos os ensinamentos, paciência, empenho e dedicação.

A Prof^a. Dr^a. Letícia Stephan Tavares, por todos os ensinamentos, paciência e especialmente a prontidão de sempre.

Aos colegas de laboratório, Marinna, Leo, Dani, Laura e Rafa, por toda a ajuda, apoio e conhecimentos adquiridos nesses anos.

Em especial a Marinna, que além de colega de laboratório se transformou em uma verdadeira amiga. Por todos os cuidados nesses dois anos, preocupações, ensinamentos, sufocos, finais de semana e feriados de laboratório, risadas e momentos leves. Esse agradecimento estendo também a Bárbara, grande amiga.

Aos mestrandos e doutorandos do Laboratório de Genética e Biotecnologia em geral, que me auxiliaram em algum momento em meus experimentos e dúvidas.

Ao saudoso Prof. Dr. Raúl e ao Silvioney, por sempre se interessarem pelo meu projeto, pelo entusiasmo, auxílio e comemoração a cada resultado.

Aos professores do Programa, que com suas dicas e conhecimentos auxiliaram e são parte fundamental da minha formação.

Aos meus pais, por serem meu exemplo e minha base. Por caminharem sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões da minha vida. Por confiarem em meu potencial, me darem força em todos os momentos e me ensinarem a correr atrás de meus objetivos.

Aos meus irmãos, pelo incentivo de sempre.

Ao Gabriel, por compreender as ausências.

Ao meu amor, Álvaro, que compartilhou cada momento desse Mestrado comigo. Alegrias, tristezas, doenças, comemorações, desde a seleção até a finalização. Por todo carinho e cuidado. Obrigada por viver o mestrado comigo.

A Deus, por abençoar e proteger a minha caminhada.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Augusto Branco

RESUMO

Infecções bacterianas constituem uma ameaça à saúde humana e um sério problema para os sistemas de saúde, devido à uma crescente incidência de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Entre importantes bactérias causadoras de infecções estão as *Staphylococcus aureus*, espécie de maior interesse médico, sendo a causadora mais comum de infecções nosocomiais e também comunitárias; *Staphylococcus epidermidis*, isolado mais frequente encontrada em epitélios humanos, sendo a principal responsável por infecções relacionadas a dispositivos médicos; e a *Escherichia coli*, dentre as bactérias gram-negativas é a causadora mais comum de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são um grupo diverso e abundante de compostos produzidos por organismos multicelulares, tanto animais quanto vegetais, e são componentes principais da imunidade inata contra infecções e podem ser alternativas no tratamento de doenças infecciosas. Neste contexto, a associação entre AMPs e a nanotecnologia pode ser utilizada como estratégia no combate a infecções bacterianas. Entre os nanomateriais existentes estão as nanopartículas poliméricas, que são biodegradáveis e biocompatíveis. Esses nanomateriais podem participar de formulações contendo antibióticos usuais ou novas moléculas bioativas, como os AMPs, e podem ser alternativas promissoras para o tratamento de infecções bacterianas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado frente à bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como os efeitos citotóxicos em cultura *in vitro* de células HEK293. Foram sintetizadas nanopartículas de quitosana livre e estruturadas com o peptídeo Lrot3.6 pelo método de gelificação iônica. As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial Zeta e foi determinada a eficiência de encapsulação do peptídeo. Após a síntese, foram realizados ensaios antimicrobianos por microdiluição em placa de 96 poços, utilizando cloranfenicol, o peptídeo livre e nanoencapsulado, e a nanopartícula livre nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, bem como ensaio para análise da ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos e avaliação da citotoxicidade dos tratamentos por MTT. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os índices de polidispersão foram 0,356 (nanopartícula livre) e 0,398 (peptídeo nanoencapsulado). Os potenciais Zeta foram $36,5 \pm 2,1$ mV (nanopartícula livre) e $35,7 \pm 2,2$ mV (peptídeo nanoencapsulado). O peptídeo nanoencapsulado apresentou uma eficiência de encapsulação de 93,55%. Em relação aos ensaios antimicrobianos, o peptídeo livre apresentou MIC de 8 µg/mL para todas as bactérias testadas. A nanopartícula livre também apresentou efeito antimicrobiano, com MIC de 64 µg/mL para todas as bactérias. A nanoencapsulação do peptídeo favoreceu principalmente a inibição do crescimento de *E. coli*, bactéria em que o tratamento mais se destacou por possível efeito sinérgico entre a quitosana e o peptídeo Lrot3.6. No geral, observou-se também a liberação prolongada do peptídeo em até 48 horas. Além disso, o nanossistema na menor concentração, 8 µg/mL, não foi citotóxico em até 48 horas.

Palavras chave: Infecções. AMPs. Nanotecnologia. AMPs nanoencapsulados.

ABSTRACT

Bacterial infections are a threat to human health and a serious problem for health systems due to an increasing incidence of infections caused by multiresistant bacteria. Among important bacteria that cause infections are *Staphylococcus aureus*, a species of major medical interest, being the most common cause of nosocomial and community infections; *Staphylococcus epidermidis*, the most frequent isolate found in human epithelia, being the main responsible for infections related to medical devices; and *Escherichia coli* among gram-negative bacteria is the most common cause of nosocomial and community-acquired infections. Antimicrobial peptides (AMPs) are a diverse and abundant group of compounds produced by multicellular organisms, both animal and plant, and are major components of innate immunity against infections and may be alternatives in the treatment of infectious diseases. In this context, the association between AMPs and nanotechnology can be used as a strategy to combat bacterial infections. Among the existing nanomaterials are polymer nanoparticles, which are biodegradable and biocompatible. These nanomaterials may participate in formulations containing usual antibiotics or novel bioactive molecules, such as AMPs, and may be promising alternatives for the treatment of bacterial infections. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of the peptide Lrot3.6 nanoencapsulated against gram-positive and gram-negative bacteria, as well as the cytotoxic effects in vitro culture of HEK293 cells. Free chitosan nanoparticles were synthesized and structured with the Lrot3.6 peptide by the ionic gelation method. The synthesized nanoparticles were characterized by size, polydispersity index, Zeta potential and the peptide encapsulation efficiency was determined. After the synthesis, antimicrobial assays were performed by microdilution in a 96-well plate using chloramphenicol, the free and nanoencapsulated peptide, and the free nanoparticle at the concentrations of 8, 16, 32, 64 and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as well as assay for analysis of the bactericidal or bacteriostatic action of the treatments and evaluation of the cytotoxicity of the treatments by MTT. Statistical analyzes were performed using the Tukey test ($p < 0.05$). The polydispersity indices were 0.356 (free nanoparticle) and 0.398 (nanoencapsulated peptide). Zeta potentials were 36.5 ± 2.1 mV (free nanoparticle) and 35.7 ± 2.2 mV (nanoencapsulated peptide). The nanoencapsulated peptide showed an encapsulation efficiency of 93.55%. Regarding the antimicrobial assays, the free peptide showed MIC of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all the bacteria tested. The free nanoparticle also showed antimicrobial effect, with MIC of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all bacteria. Nanoencapsulation of the peptide mainly favored the inhibition of the growth of *E. coli*, a bacterium in which the treatment was most highlighted by a possible synergistic effect between the chitosan and the peptide Lrot3.6. In general, prolonged release of the peptide was also observed within 48 hours. In addition, the nanosystem at the lowest concentration, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was not cytotoxic within 48 hours.

Keywords: Infections. AMPs. Nanotechnology. Nanoencapsulated AMPs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Composição da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. EP: espaço periplasmático; MP: membrana plasmática; P: parede gram-positiva (peptidoglicano); ME: membrana externa; M: peptidoglicano ou mureína (gram-negativa).....26
- Figura 2: Representação das quatro classes de AMPs classificados segundo sua estrutura secundária. (A) α -hélice (magainina-2, PDB ID: 2MAG); (B) folhas β (defensinas, PDB ID: 2LXZ); (C) linear (indolicidina, PDB ID: 1QXQ); (D) estrutura dobrada (microcina, PDB ID: 1S7P).....33
- Figura 3: Representações dos modelos de interação de AMPs com a membrana plasmática. (A) *Membrane thinning*; (B) *Barrel-stave*; (C) Poro toroidal; (D) *Aggregate*; (E) *Carpete*. ME: membrana externa; MI: membrana interna; MC: membrana citoplasmática35
- Figura 4: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas. a) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; b) Fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; c) Fármaco retido à matriz polimérica em nanoesferas; d) Fármaco adsorvido à matriz polimérica da nanoesfera39
- Figura 5: Estrutura química das unidades repetitivas de quitosana. À esquerda tem-se a unidade N-acetil-D-glicosamina, e à direita tem-se a D-glicosamina40
- Figura 6: Interação eletrostática (*cross-linking*) entre quitosana e TPP41
- Figura 7: Distribuição do raio hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de quitosana livres56
- Figura 8: Distribuição do raio hidrodinâmico (nm) da nanopartícula estruturada com o peptídeo Lrot3.6.....56
- Figura 9: Curva de crescimento padrão das bactérias *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 1222858

Figura 10: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	59
Figura 11: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	59
Figura 12: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	60
Figura 13: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 24 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle.....	69
Figura 14: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 48 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle.....	69
Figura 15: Viabilidade celular relativa às 24 h. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle.....	70
Figura 16: Viabilidade celular relativa às 48 h. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP	

16: nanopartícula livre na concentração de 16 µg/mL; PL 8: peptídeo livre na
concentração de 8 µg/mL; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 µg/mL; C:
controle70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais mecanismos de ação de antibióticos.....	22
Tabela 2: Principais mecanismos de ação de antibióticos (continuação)	23
Tabela 3: Mecanismos de ação de AMPs disruptivos de membrana.....	34
Tabela 4: Principais características das nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 sintetizadas neste trabalho: raio hidrodinâmico médio, índice de polidispersão médio, potencial Zeta médio e eficiência de encapsulação	55
Tabela 5: Valores médios de absorvância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 em 24 h e 48 h.....	61
Tabela 6: Valores médios de absorvância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em 24 h e 48 h.....	62
Tabela 7: Valores médios de absorvância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> ATCC 25922 em 24 h e 48 h	63
Tabela 8: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	65
Tabela 9: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em <i>S. aureus</i> ATCC 29213	66
Tabela 10: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em <i>E. coli</i> ATCC 25922	67
Tabela 11: Concentração mínima bactericida (MBC) relacionada ao cloranfenicol, peptídeo Lrot3.6 livre e peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado para as estirpes: <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. coli</i> 25922	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β	Beta
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
30S	Subunidade menor do ribossomo bacteriano
50S	Subunidade maior do ribossomo bacteriano
5M	Cinco molar
AMP	Peptídeo antimicrobiano
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPs	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CH_3	Grupamento metil
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DLS	Espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasivas
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
g	Força gravitacional
h	Hora
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IRAS	Infecções Relacionadas À Assistência À Saúde
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo

LTA	Ácido lipoteicoico
m	Metros
MBC	Concentração mínima bactericida
mg/mL	Miligramas por mililitro
MIC	Concentração mínima inibitória
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
°C	Celsius
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP2a	Proteína de ligação a penicilina
PDI	Índice de polidispersão
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido poli DL-lático
PLGA	Ácido poli D-lático coglicólico
RNA	Ácido ribonucleico
R-NH ₃ ⁺	Grupamento amino
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TPP	Tripolifosfato de sódio
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Infecção do trato urinário
UTIs	Infecções do trato urinário
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS	20
2.2 ANTIBIÓTICOS: PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO	22
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	23
2.4 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS	25
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.6 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	28
2.7 <i>Escherichia coli</i>	30
2.8 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs).....	31
2.9 PEPTÍDEO Lrot3.6	36
2.10 NANOTECNOLOGIA	36
2.10.1 NANOFÁRMACOS: NANOSSISTEMAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS E MOLÉCULAS BIOATIVAS	38
2.10.2 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	39
2.11 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NANOENCAPSULADOS	41
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 SÍNTESE E SOLUBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Lrot3.6	45
4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES.....	45
4.3 SÍNTESE DE NANOESFERAS DE QUITOSANA ESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO Lrot3.6.....	46
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	47
4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	47
4.6 MICRORGANISMOS.....	48
4.7 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO PADRÃO	48
4.8 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	49
4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	50
4.9 ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO	51
4.10 ENSAIO PARA ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA.....	51

4.11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	51
4.11.1 CULTURA DE CÉLULAS HEK293 <i>in vitro</i>	52
4.11.2 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AOS TRATAMENTOS.....	52
4.11.3 VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	53
4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES E NANOESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO Lrot3.6 E DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PEPTÍDEO Lrot3.6 NAS NANOESFERAS DE QUITOSANA.....	55
5.2 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	57
5.2.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.....	60
5.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	61
5.2.3 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	63
5.3 ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA.....	64
5.3.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.....	64
5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	65
5.3.3 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	66
5.3.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA.....	67
5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	68
6 DISCUSSÕES.....	72
7 CONCLUSÕES.....	79
8 PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICES.....	92
APÊNDICE A – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas ao tamanho e potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livre e estruturadas com o peptídeo Lrot3.6.....	92
APÊNDICE B – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.....	93

APÊNDICE C – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de <i>S. aureus</i> ATCC 29213, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.	95
APÊNDICE D – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> ATCC 25922, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.	97
APÊNDICE E – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.	99
APÊNDICE F – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de <i>S. aureus</i> ATCC 29213, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.	102
APÊNDICE G – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de <i>E. coli</i> 25922, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.	105

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos e vacinas que previnem e curam infecções bacterianas foi uma das maiores contribuições do século XX à longevidade e qualidade de vida humanas (KASPER e FAUCI, 2015). A descoberta, comercialização e administração de compostos antimicrobianos para tratar infecções de rotina revolucionaram a medicina moderna (MUNITA e ARIAS, 2016).

Entretanto, o uso indiscriminado, principalmente de antibióticos, selecionou patógenos bacterianos resistentes, comprometendo os resultados bem-sucedidos de pacientes criticamente doentes e dificultando a administração e utilização desses medicamentos (FRÈRE e RIGALI, 2016; MUNITA e ARIAS, 2016).

Especialmente em cepas multirresistentes, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Streptococcus pneumoniae* (WHO, 2017), que apresentam um alto grau de resistência e poucos antibióticos apresentam uma eficácia limitada, resultando no surgimento de infecções quase intratáveis (MUNITA e ARIAS, 2016). Diante desse cenário, torna-se necessária a busca por novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas, na tentativa de amenizar esse complexo quadro de resistência (FRÈRE e RIGALI, 2016).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas, com 15 a 50 aminoácidos, que podem ser uma solução promissora para o problema de resistência bacteriana. Podem ser encontrados em diversos seres vivos, desde bactérias a seres humanos, e fazem parte do sistema imune inato (SILVA e MACHADO, 2012). Possuem amplo espectro de ação e atuam por mecanismos de ação diferentes dos antibióticos tradicionais, que atuam principalmente em alvos celulares bacterianos, como enzimas e ribossomos (KANG et al., 2014). Os AMPs atuam, basicamente, desestruturando e formando poros na membrana bacteriana, de forma diferente dos antibióticos convencionais, permitindo níveis menores de resistência induzida (BAHAR e REN, 2013).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, que manipula materiais à bilionésima parte do metro. Atua em diversas áreas do conhecimento, entre elas a medicina e a área farmacêutica (FAROKHZAD e LANGER, 2009). Entre os nanomateriais, estão as nanopartículas poliméricas, que são polímeros

biodegradáveis e biocompatíveis. Esses nanomateriais podem participar de formulações utilizadas no tratamento de infecções bacterianas, os antibióticos nanoestruturados, que podem ser nanomateriais que apresentem atividade antimicrobiana, como as nanopartículas de quitosana, ou então formulações com antibióticos usuais ou moléculas bioativas nanoencapsuladas. Essas formulações inovadoras permitem proteção, entrega dos fármacos nas células alvo, bem como uma administração controlada e prolongada desses medicamentos (YADAV et al., 2011; EDSON e KWON, 2016; SANDRESCHI et al., 2016).

Já existem estudos que demonstram a incorporação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) em nanopartículas, como alternativa na busca de novas formulações para controle e tratamento de doenças infecciosas (WATER et al., 2015; PIRAS et al., 2015b; GARCIA-ORUE et al., 2016; CRUZ et al., 2017). A nanotecnologia é capaz de superar algumas limitações dos AMPs, como fraca estabilidade, inativação em alguns fluidos biológicos e curta vida útil no sistema circulatório. Além de poder até mesmo potencializar os efeitos antimicrobianos de muitos AMPs, diminuindo por muitas vezes a concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou agindo em sinergismo com essas moléculas (BRANDELLI, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado, com nanopartículas poliméricas, frente à bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como seus possíveis efeitos citotóxicos para células humanas (HEK293) cultivadas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS

Infecções bacterianas constituem uma ameaça à saúde humana e um sério problema para os sistemas de saúde, devido à uma crescente incidência de infecções nosocomiais e a disseminação de infecções causadas por bactérias multirresistentes (WATER et al., 2015).

A implantação da antimicrobianoterapia, na década de 1930, parecia ditar o fim das doenças infecciosas no mundo (SANTOS et al., 2007). A partir da descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, novos antibióticos foram desenvolvidos e a incidência de infecções reduziu-se consideravelmente (FERREIRA et al., 2008). Desde então, os antimicrobianos estão entre os fármacos mais prescritos no mundo, e se utilizados de forma adequada podem salvar vidas (KASPER e FAUCI, 2015).

Apesar dos benefícios obtidos com o emprego de medicamentos antibacterianos, o uso indiscriminado de antibióticos, tanto para fins terapêuticos quanto na pecuária como promotor de crescimento em animais, favoreceu a pressão seletiva de espécies bacterianas resistentes, levando ao aumento do número de infecções hospitalares causadas por esses microrganismos (MADIGAN et al., 2010).

No entanto, de forma alarmante, bactérias resistentes não se restringiram apenas ao ambiente hospitalar, disseminando-se também na comunidade e acometendo indivíduos jovens e saudáveis, sem fatores de risco pré-determinados. Nesse contexto, o foco exclusivo em infecções nosocomiais foi ampliado também para outros locais, sendo essas infecções denominadas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (OLIVEIRA et al., 2009).

As infecções relacionadas à assistência à saúde são aquelas adquiridas durante a prestação dos cuidados de saúde. Consistem em eventos adversos ainda persistentes nos serviços de saúde, que levam ao aumento de diversos fatores como, por exemplo: custos com os pacientes, tempo de internação, morbidade e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2009). As principais IRAS são infecções do trato respiratório, trato urinário, corrente sanguínea e infecção do sítio cirúrgico. São três os desafios fundamentais para a prevenção e controle de IRAS: (1) resistência bacteriana; (2)

processamento de produtos para a saúde e (3) adoção de boas práticas de controle de infecção por profissionais de saúde (ANVISA, 2013).

As IRAS afetam centenas de milhões de pessoas por ano no mundo. A cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma IRAS (ANVISA, 2016). Segundo estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS), a maior prevalência de IRAS ocorre em UTIs, em enfermarias cirúrgicas e alas de ortopedia (WHO, 2014). Há um consenso entre os especialistas de que, para minimizar o acometimento de IRAS, deve haver a melhoria das práticas sanitárias, bem como a adoção de medidas de prevenção e controle de infecções nos serviços de saúde (WHO, 2014; ANVISA, 2016).

Infecções relacionadas à resistência bacteriana a antibióticos, como as IRAS, são consideradas um problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, e, a cada ano, pelo menos 23.000 pessoas morrem devido a essas infecções (YOUSEFI et al., 2017).

A Organização Mundial da Saúde denominou a resistência aos antibióticos como uma das três ameaças mais importantes para a saúde pública do século XXI (MUNITA e ARIAS, 2016). Em 2017, a OMS divulgou uma lista com patógenos prioritários para desenvolvimento de novos antibióticos, devido a situação crítica em relação a resistência em que se encontram, agrupando-os em três categorias de risco: crítico, alto e médio. Entre essas bactérias resistentes estão as pertencentes a família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Streptococcus pneumoniae* (WHO, 2017).

A crise de resistência a antibióticos vem se tornando cada vez mais preocupante, visto que a resistência bacteriana limita as opções de tratamento, possibilitando o uso, por vezes, apenas de antibióticos de última geração. Isso pode prolongar a gravidade ou duração da doença. Dessa forma então, as futuras estratégias em pesquisa e desenvolvimento (P&D) devem se concentrar na descoberta e no desenvolvimento de novos antimicrobianos, especificamente ativos contra bactérias multirresistentes (VENTOLA, 2015; WEESE et al., 2015; WHO, 2017).

2.2 ANTIBIÓTICOS: PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. São classificados como bactericidas, quando são capazes de matar a bactéria, ou bacteriostáticos, quando apenas inibem seu crescimento. Embora a atividade bacteriostática seja adequada ao tratamento da maioria das infecções, a atividade bactericida demonstra importância em casos específicos, como em casos graves de bacteremia por *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES et al., 2010; KASPER e FAUCI, 2015).

A maioria dos antibióticos utilizados para uso clínico são classificados segundo seu mecanismo de ação. Existem quatro principais modos de ação: (1) interferência na síntese da parede celular bacteriana, como os β – lactâmicos; (2) inibição da síntese proteica, como as tetraciclina e o cloranfenicol; (3) interferência na síntese dos ácidos nucleicos, como a rifampicina e as fluoroquinolonas, e (4) inibição de alguma via metabólica importante para a bactéria, como as sulfonamidas (TENOVER, 2006). A tabela a seguir (Tabela 1) resume as principais classes de antibióticos e seus mecanismos de ação.

Tabela 1: Principais mecanismos de ação de antibióticos

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactams)	Enzima transpeptidase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas (dalfopristina e quinupristina), cloranfenicol, oxazolidinonas (linezolida)	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.

Tabela 2: Principais mecanismos de ação de antibióticos (continuação)

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Peptídeos não ribossomais (bacitracina, gramicidina C, polimixina B)	Membrana plasmática	Afetam a permeabilidade da membrana bacteriana devido à perda de compartimentalização celular.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Topoisomerase II (DNA girase) Topoisomerase IV	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.

Fonte: GUIMARES et al., 2010; KOHANSKI et al., 2010.

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana é uma resposta biológica natural de bactérias a uma pressão seletiva, como por exemplo: condições climáticas, disponibilidade de alimentos, oxigênio, água ou a presença de um medicamento antimicrobiano (SOARES et al., 2010).

Quando uma nova classe de antibiótico é introduzida, é efetiva em um primeiro momento, mas eventualmente selecionará para a sobrevivência de uma pequena fração de populações bacterianas que possuem algum mecanismo de resistência. Essa resistência bacteriana a antibióticos pode ser classificada de duas formas: intrínseca e adquirida (HAWKEY, 1998; BECEIRO et al., 2013).

A resistência intrínseca ocorre quando bactérias são naturalmente resistentes a uma classe de antibióticos, devido às características biológicas do organismo, como a ausência da estrutura alvo do antibiótico. Nesses casos, todas as estirpes são igualmente resistentes a classe antibacteriana (TENOVER, 2006).

Já a resistência adquirida ocorre quando populações bacterianas inicialmente susceptíveis tornam-se resistentes ao antibiótico, e se proliferam por pressão seletiva desse antibacteriano. Isso pode acontecer devido a mutações em genes no cromossomo bacteriano ou aquisição de novo DNA, por transferência horizontal ou vertical. A transferência de genes de resistência pode ser via plasmídeos, bacteriófagos e transposons (HAWKEY, 1998; TENOVER, 2006; YOUSEFI et al., 2017).

São vários os mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos, e apesar destes mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência pode ser causada por fatores básicos. Entre os principais estão: (1) a produção de enzimas capazes de degradar o antibiótico antes que ele possa ter efeito, como as β -lactamases; (2) bombas de efluxo, que eliminam o agente antibacteriano antes que ele alcance seu destino e exerça seu efeito; (3) alterações metabólicas devido à genes de resistência, que podem produzir paredes celulares bacterianas alteradas, sem o local de ligação do agente antimicrobiano, ou mutações que limitem o acesso ao sistema intracelular, por meio da regulação dos genes das porinas; (4) por fim, mecanismos genéticos que podem levar à resistência, incluindo transformação, conjugação e transdução (TENOVER, 2006; KOHANSKI et al., 2010; BECEIRO et al., 2013).

As bactérias multirresistentes ocorrem devido à aquisição de múltiplos genes de resistência não relacionados, por etapas sequenciais de transferência de genes e seleção ambiental em locais onde há uma alta incidência do uso de antibióticos. Entre elas estão bactérias gram-negativas e gram-positivas. Resistência a múltiplos antimicrobianos não relacionados ocasionados por mutações ocorrem, principalmente, nos genes que codificam as porinas da membrana externa e proteínas de efluxo em bactérias gram-negativas (KASPER e FAUCI, 2015).

2.4 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Os procariotos podem ser divididos em dois grandes grupos, denominados gram-positivos e gram-negativos. Apesar da divisão ser originalmente baseada na técnica de coloração de Gram, a diferença entre esses dois grupos reside, basicamente, na composição de sua parede celular. Gram-positivos possuem, fundamentalmente, um único tipo de molécula na composição de sua parede, que é normalmente mais espessa. Já os gram-negativos possuem uma parede celular mais complexa, composta por múltiplas camadas de diferentes moléculas (MADIGAN et al., 2010).

A parede celular de gram-positivos é composta principalmente por peptideoglicano – cerca de 40-80% do peso seco da parede celular –, um polímero formado por finas lâminas de dois derivados glicosídicos, a N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico. Além de peptideoglicano, a parede de gram-positivos também apresenta outros dois constituintes, o ácido teicoico, que contém glicerol fosfato ou ribitol fosfato, e ácido teicurônico, polímeros semelhantes que diferem por possuir grupos carboxilas funcionais ao invés de fosfatos. Existem dois tipos de ácidos teicoicos: os ácidos teicoicos da parede, que apresentam ligação covalente com os peptideoglicanos; e o ácido teicoico da membrana, também chamado de ácido lipoteicoico (LTA), associados aos lipídeos de membrana. Por serem relativamente carregados, são responsáveis, em parte, pela carga negativa da superfície celular procariota e também constituem os principais antígenos de superfície em gram-positivos. Em *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, o ácido lipoteicoico está associado a proteína M, e juntos se projetam através da camada de peptideoglicano e facilitam a ligação da bactéria às células animais, permitindo assim sua colonização (JIANG et al., 2004; BROOKS et al., 2014).

Quando comparadas a gram-positivas, a parede celular de bactérias gram-negativas possui uma maior complexidade (Figura 1). Isso é devido à presença de outros três componentes localizados fora da camada de peptideoglicano: uma membrana externa, lipoproteínas e lipopolissacarídeos. A membrana externa de gram-negativos é quimicamente distinta de outras membranas biológicas, seu folheto interno é semelhante em composição a outras membranas, o que a difere é a composição de seu folheto externo, basicamente lipopolissacarídeo (LPS). Internamente, a membrana possui lipoproteínas que contém pequenas proteínas que

permitem ancorar a membrana externa ao peptidoglicano. Embora a principal função da membrana externa seja estrutural, também exibe uma importante propriedade às bactérias: são tóxicas aos animais. Alguns dos sintomas desenvolvidos por colonizações gram-negativas patogênicas é devido à sua membrana externa tóxica, especificamente à presença do lipídeo A. O LPS de bactérias não-patogênicas também exibe atividade de endotoxina, o que demonstra que mesmo organismos não-patogênicos apresentem componentes tóxicos em sua parede celular (MADIGAN et al., 2010; BROOKS et al., 2014).

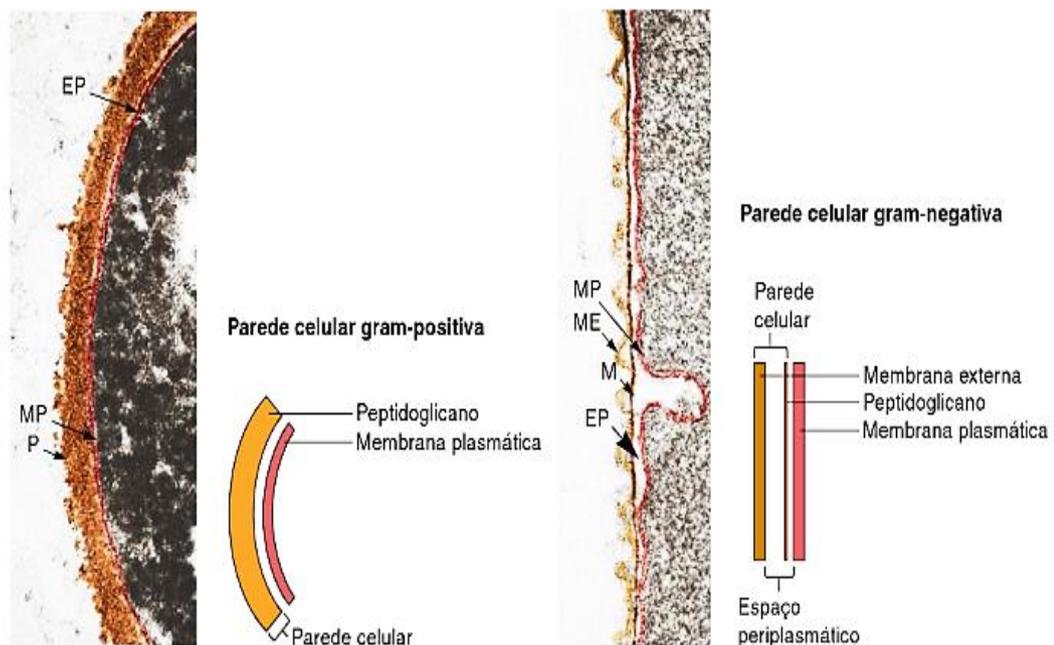


Figura 1: Composição da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. EP: espaço periplasmático; MP: membrana plasmática; P: parede gram-positiva (peptidoglicano); ME: membrana externa; M: peptidoglicano ou mureína (gram-negativa). Fonte: BROOKS et al., 2014.

2.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas da família Micrococcaceae. Existem pelo menos 200 estirpes diferentes de *S. aureus*, e dentro do gênero *Staphylococcus* é a espécie de maior interesse médico, visto que é responsável por uma variedade de infecções sendo a causadora mais comum de infecções nosocomiais e também comunitárias, podendo apresentar grandes índices de morbidade e mortalidade. Em razão disso, é considerada um importante patógeno

humano e um problema de saúde pública (SANTOS et al., 2007; GELATTI et al., 2009; DURAI et al., 2010; LAABELI et al., 2015).

Seu principal hospedeiro é o homem e pode ser encontrada colonizando o trato respiratório, a pele, cavidade oral e o trato gastrointestinal. Entre esses, as narinas apresentam o maior índice de colonização, cerca de 40% em adultos. As infecções causadas por *S. aureus* podem ser por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou portadores saudáveis, e a transmissão ocorre por contato direto ou indireto. Sua disseminação é vasta, uma vez que essa bactéria é capaz de resistir à dessecação e ao frio, persistindo viável por longos períodos em partículas de poeira (SANTOS et al., 2007; RATTI e SOUSA, 2009).

São várias as patologias relacionadas a *S. aureus*, como: infecções na pele e subcutânea, infecções pós-cirúrgicas, pneumonias, intoxicação alimentar e bacteremia. Entre as infecções na pele estão furúnculos e espinhas. Em hospitais, feridas cirúrgicas representam um foco potencial para o desenvolvimento de infecções. Pode ocorrer também a pneumonia estafilocócica, principalmente em idosos, que está relacionada a pneumonia viral e ocorre por conta da queda da imunidade. As bactérias também podem se inserir em cateteres, por colonizarem a pele, e migrar até a circulação sanguínea, levando a quadros graves de bacteremia que podem provocar infecções em sítios distantes como osteomielites, endocardites, meningites e formação de abscessos metastáticos (SANTOS et al., 2007; TONG et al., 2015).

Há uma grande variedade de potenciais fatores de virulência relacionados à invasão e patogenicidade de *S. aureus*. Alguns deles são, por exemplo, a presença de ácido teicoico e proteínas de superfície na parede celular - que promovem adesão ao tecido danificado e podem diminuir a função de resposta mediada por células do sistema imune inato - e a produção de enzimas e secreção de toxinas, que também contribuem para a evasão da bactéria ao sistema imune. Além desses também há a produção de biofilmes, frequentemente encontrados em infecções relacionadas a dispositivos médicos permanentes (IWATSUKI et al., 2006; VANDECANDELAERE et al., 2017).

A espécie é resistente a diversos antimicrobianos, que eram usualmente utilizados para seu combate. A primeira vez que um antimicrobiano foi utilizado clinicamente foi contra uma amostra de *S. aureus*, com a descoberta da penicilina, introduzida na década de 1940. Em 1942, foram reconhecidos os primeiros

estafilococos resistentes à penicilina. No final da década de 1960, mais de 80% dos casos de infecções por *S. aureus*, tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, eram causadas por bactérias resistentes à penicilina (LOWY, 2003).

A fim de contornar o problema, foi produzido o β -lactâmico sintético meticilina, resistente às β -lactamases produzidas pela bactéria, contudo logo depois já foram identificadas amostras resistentes, denominadas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Essa resistência está relacionada a produção de uma nova proteína de ligação a penicilina, PBP2a, que não demonstra afinidade a este grupo de β -lactâmicos, tornando-as resistentes a esse tipo de antimicrobiano (GELATTI et al., 2009).

As infecções causadas por *S. aureus* MRSA eram comumente limitadas ao ambiente hospitalar, entretanto nos últimos anos houve um crescente número de relatos de infecções adquiridas na comunidade (DURAI et al., 2010). Isso é preocupante, visto que essas infecções têm demonstrado altos índices de mortalidade e o tratamento emprega antibióticos de última geração, fazendo com que essas infecções se tornem progressivamente intratáveis (LOWY, 2003).

2.6 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis são bactérias gram-positivas da família Micrococcaceae. Existem cerca de 204 estirpes de *S. epidermidis*, que fazem parte do grupo de estafilococos coagulase-negativos, que durante anos foram apontados como organismos não patogênicos. Entretanto, esse quadro se modificou e os representantes do grupo passaram a ser considerados os patógenos mais comumente relatados em isolados de infecções da corrente sanguínea de pacientes hospitalizados. *S. aureus* e *S. epidermidis* são as principais espécies gram-positivas causadoras de infecções nosocomiais relatadas atualmente (EIFF et al., 2002; NAMVAR et al., 2014).

S. epidermidis é a espécie mais frequentemente isolada em epitélios humanos, sendo colonizadores comuns de pele e membranas mucosas. São encontradas predominantemente nas axilas, cabeça e narinas. As infecções causadas pela bactéria iniciam-se por patógenos presentes na pele do próprio indivíduo ou transmissão por profissionais de saúde durante a inserção de dispositivos periféricos.

São responsáveis por 50 a 70% de infecções relatadas por utilização de cateteres e representam o agente causal mais frequente de infecções de dispositivos médicos permanentes, isso devido ao aumento de cateterismo intravascular em pacientes hospitalizados (O' GARA e HUMPHREYS, 2001; OTTO, 2009).

Além de ser o principal causador de infecções relacionadas a dispositivos médicos, *S. epidermidis* também está relacionada à infecção associada à colocação de válvulas cardíacas sintéticas: 40 a 50%; próteses articulares: 20 a 50%; ceratite ocular e endoftalmite de lentes de contato contaminadas; e a maioria de infecções oriundas de procedimentos neurocirúrgicos (O' GARA e HUMPHREYS, 2001; NAMVAR et al., 2014).

Nessa espécie, o principal mecanismo de evasão está relacionado à sua capacidade de formar biofilmes e dessa forma evitar a ingestão e morte por neutrófilos, contornando assim a resposta imune inata. Biofilmes são aglomerações bacterianas envoltas por polímeros, principalmente polissacarídeos, que permitem que essas bactérias possam se aderir a diversas superfícies. Além disso, garantem proteção a diversos tipos de agressões, como a falta de nutrientes e a ação de diversos antibióticos. Acredita-se também que a liberação de exopolímeros em biofilmes protegem as células bacterianas ao reconhecimento por anticorpos, burlando assim o papel da resposta imune adquirida e dificultando o sistema imunológico em combater essas bactérias (EIFF et al., 2002; OTTO, 2009; VANDECANDELAERE et al., 2017).

A produção de biofilmes permite que essas bactérias colonizem facilmente diversas superfícies, contribuindo para que a espécie seja a principal causadora de infecções relacionadas à utilização de instrumentos cirúrgicos. Também contribuem para que a espécie apresente resistência a uma série de antibióticos, como meticilina e antibióticos glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, possuindo um padrão característico multirresistente. Parte disso é devido à dificuldade de penetração e difusão dos antibióticos na matriz polissacarídica dos biofilmes. Há uma grande limitação em relação ao tratamento de infecções causadas por *S. epidermidis*, pois os poucos antibióticos que possuem uma eficácia limitada são a rifampicina, novobiocina e minociclina. Dessa forma, a bactéria consegue uma tolerância aos diversos tratamentos e facilidade de disseminação, por isso é considerada um importante patógeno causador de doenças nosocomiais (RAAD et al., 1998; VANDECANDELAERE et al., 2017).

2.7 *Escherichia coli*

Escherichia coli são bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae. Dentre as bactérias gram-negativas, a espécie é a causadora mais comum de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Cerca de 50% de infecções hospitalares são causadas pela bactéria, e 70 a 90% de casos de infecções do trato urinário estão relacionados à espécie, acometendo indivíduos vulneráveis como crianças, idosos e gestantes, e sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e altos custos financeiros em tratamentos para pacientes tanto no sistema público como privados de saúde (SALTER et al., 2000; BAUM e MARRE, 2005; KORB et al., 2013).

A maioria de bactérias da espécie são pertencentes à microbiota intestinal, sendo consideradas comensais. Contudo, cerca de 10% são patogênicas, podendo ocasionar infecções intestinais e extra intestinais. Há seis categorias bem descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). As estirpes patogênicas, em relação às comensais, possuem uma alta capacidade de colonização, apesar do peristaltismo intestinal, e se sobressaem quanto à competição por nutrientes, o que favorece sua sobrevivência (NATARO e KAPER, 1998; KAPER et al., 2004; SANTOS et al., 2009).

Geralmente são inócuos e permanecem confinadas ao lúmen do intestino. Entretanto, quando o hospedeiro torna-se debilitado ou imunossuprimido, ou ainda quando as barreiras gastrointestinais são violadas, até mesmo cepas de *E. coli* não-patogênicas são capazes de causar infecção. Infecções causadas pela espécie podem estar limitadas às superfícies mucosas ou podem estar por todo o corpo (NATARO e KAPER, 1998).

São três as síndromes clínicas gerais resultantes de infecções por *E. coli*: doenças diarreicas/entéricas, infecções do trato urinário (UTI) e sepse. As mais comuns são infecções do trato urinário (UTIs), e podem evoluir de não complicadas, como cistites, para casos mais enredados, como uretrites e pielonefrites (KAPER et al., 2004; KORB et al., 2013).

Para a adesão e colonização, por exemplo, a bactéria possui adesinas, complexos proteicos que formam estruturas denominadas fímbrias, capazes de se aderir às superfícies mucosas e assim permitir a colonização e multiplicação dessas

bactérias. Além das fímbrias, outro fator de virulência importante para *E. coli*, e o mais numeroso, é sua capacidade de secretar toxinas, responsáveis por modificar estruturas das superfícies celulares do hospedeiro ou causar danos celulares irreversíveis, e proteínas efetoras que atuam em uma variedade de processos eucarióticos fundamentais, como, por exemplo, o bloqueio da divisão celular das células colonizadas, impedindo a regeneração. Estirpes de *E. coli* também são aptas a desenvolver biofilmes, o que auxilia a resistência a antimicrobianos e mais um mecanismo de evasão às defesas do hospedeiro (KAPER et al., 2004; MOREIRA et al., 2006).

Como outros patógenos, *E. coli* também demonstra resistência a algumas classes de antibióticos, como os β -lactâmicos, os aminoglicosídicos e as fluoroquinolonas. Isso é preocupante, visto que a espécie é o principal agente etiológico de infecções sanguíneas, sejam comunitárias ou nosocomiais, entre bacilos gram-negativos e essas infecções podem acabar se tornando intratáveis e constantes (SANTOS et al., 2009; IREDELL et al., 2016).

2.8 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Peptídeos antimicrobianos são um grupo diverso e abundante de compostos produzidos por organismos multicelulares, tanto animais quanto vegetais, e são componentes principais da imunidade inata contra infecções. Apresentam amplo espectro de ação sobre variados microrganismos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, alguns vírus e parasitos e até mesmo algumas células cancerosas. Em geral são moléculas pequenas, apresentando de 15 a 50 resíduos de aminoácidos. Não possuem nenhuma sequência consenso definida associada à atividade biológica, no entanto a maioria dos AMPs mantém características comuns, determinadas conforme a presença de aminoácidos específicos, capazes de afetar a atividade antimicrobiana e a especificidade desses peptídeos (GALLO et al., 2002; NGUYEN et al., 2011; SILVA e MACHADO, 2012; NARAYANA e CHEN, 2015).

Geralmente, duas características são comuns em peptídeos antimicrobianos: são catiônicos e possuem quantidade considerável de aminoácidos hidrofóbicos em sua composição. Cerca de 10% dos peptídeos antimicrobianos identificados até então são aniônicos, com carga global variando entre -1 a -7. O

restante, aproximadamente 90%, são catiônicos, com carga global variando de +2 a +11. Peptídeos aniônicos são comumente ricos em glutamato e aspartato. Já peptídeos catiônicos são ricos em arginina e lisina. Quanto aos resíduos hidrofóbicos encontrados em peptídeos são, em geral, os aminoácidos alanina, leucina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, tirosina e valina (BROGDEN, 2005; NGUYEN et al., 2011; KANG et al., 2014).

Como a maioria dos AMPs possuem carga positiva, são frequentemente referidos como peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAPs). Essa característica básica permite que os CAPs tenham a capacidade de interagir com a membrana plasmática dos microrganismos devido a diferença de cargas, já que as membranas possuem sua superfície carregada negativamente. Além disso, sua natureza anfipática, com uma porção hidrofílica com resíduos de aminoácidos polares e a outra porção com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (apolares), também permite a interação com a membrana plasmática dos microrganismos, especificamente aos ácidos graxos (BATONI et al., 2011; NGUYEN et al., 2011).

A interação com a membrana plasmática é um dos principais mecanismos de ação dos peptídeos, em contraste com a maioria dos antibióticos, que normalmente direcionam-se a proteínas específicas. Isso é uma vantagem para a utilização dessas moléculas como uma potencial fonte de produtos farmacêuticos para o tratamento de infecções bacterianas, já que dificultam o desenvolvimento de resistência microbiana por mutação genética (BROGDEN, 2005).

Além de interagirem com a membrana plasmática, AMPs também possuem mecanismos de ação intracelulares, como inativação de ácidos nucleicos, se ligando a eles e inibindo a replicação, transcrição e tradução. Podem se ligar também a proteínas e enzimas citoplasmáticas, alterando as funções metabólicas dos microrganismos. São capazes de inibir a síntese da parede celular e podem possuir atividade imunomodulatória, com o recrutamento e ativação de células imunes (BROGDEN, 2005; KANG et al., 2014).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser classificados quanto a sua estrutura secundária e podem apresentar uma grande diversidade estrutural. No entanto, é possível agrupá-los em quatro classes distintas principais: peptídeos α -hélice; peptídeos folhas β , com duas ou mais ligações dissulfídicas; peptídeos lineares, ricos em triptofano, prolina e histidina; e, menos comuns, os peptídeos de

estruturas dobradas, formados por ligações dissulfeto simples (Figura 2) (KANG et al., 2014).

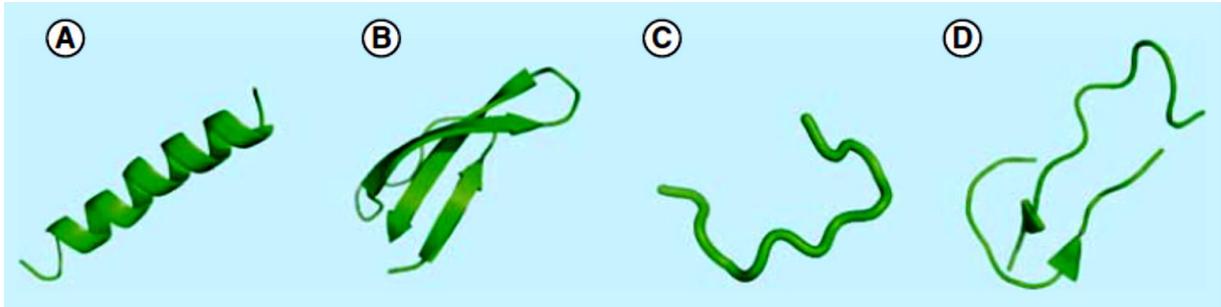


Figura 2: Representação das quatro classes de AMPs classificados segundo sua estrutura secundária. (A) α -hélice (magainina-2, PDB ID: 2MAG); (B) folhas β (defensinas, PDB ID: 2LXZ); (C) linear (indolicidina, PDB ID: 1QXQ); (D) estrutura dobrada (microcina, PDB ID: 1S7P). Fonte: KANG et al., 2014.

Entre os peptídeos α -hélice tem-se, por exemplo, as magaininas e temporinas, que adotam uma estrutura de hélice anfipática quando em contato com a membrana hidrofóbica. Exemplos de folhas β tem-se as defensinas, que possuem uma estrutura mais rígida devido à presença das ligações dissulfídicas. Em contraste, peptídeos lineares, como a indolicidina, e peptídeos de estrutura dobrada, como a microcina, são menos rígidos e estruturados. Desses, AMPs de α -hélice são os mais estudados, visto que a maioria catalogada até então demonstra adotar uma conformação helicoidal (KANG et al., 2014).

A estrutura secundária dos peptídeos é determinante na forma como eles interferem na estrutura da membrana dos microrganismos, já que a ação dos AMPs é, em geral, devido a alterações na permeabilidade da membrana plasmática. Embora seja um dos principais mecanismos relacionados a maioria dos peptídeos, existem duas classes de CAPs principais: disruptivos de membrana e não-disruptivos de membrana. Ambos, em um primeiro momento, interagem com a membrana plasmática devido à diferença de cargas entre o peptídeo e a superfície externa da membrana ou parede celular bacteriana (HALE e HANCOCK, 2007).

Para que ocorra a interação entre CAPs e membranas bacterianas, primeiramente há a atração eletrostática entre os peptídeos, carregados positivamente, e superfícies exteriores polianiónicas nas células. No caso de gram-positivas aos ácidos teicoicos e lipoteicoicos, e em gram-negativas aos lipopolissacarídeos (LPS). Após atração, há o início da passagem do peptídeo através da parede celular, em gram-positivas, e membrana externa, em gram-negativas. CAPs

conseguem atravessar a membrana por promoverem uma instabilidade na mesma, que permite a translocação do peptídeo através da bicamada lipídica da membrana (ou parede celular) (HALE e HANCOCK, 2007; BATONI et al., 2011). Essa passagem comumente forma poros na membrana de diversas formas (Figura 3). Bahar e Ren (2013) resumiram os modelos de interação e mecanismos de ação de CAPs, como se observa na Tabela 3.

Tabela 3: Mecanismos de ação de AMPs disruptivos de membrana

Modelo de interação	Mecanismo de ação
Carpete (detergente)	Os peptídeos cobrem uma parte da membrana, como um tapete. Em seguida, os AMPs penetram na bicamada lipídica, formando poros.
Diluição de membrana (<i>Membrane thinning</i>)	Os AMPs inserem-se em apenas um lado da bicamada lipídica e formam uma lacuna entre moléculas lipídicas na região da cadeia. Essa lacuna cria uma força e desloca as moléculas lipídicas vizinhas para preenchê-la.
Agregação (<i>Aggregate</i>)	AMPs inserem-se paralelamente na superfície da membrana. Então, há uma reorientação de AMPs e eles se inserem na membrana verticalmente para formar estruturas esféricas.
Poros toroidal	AMPs se inserem perpendicularmente na membrana formando um poro, com suas partes hidrofóbicas associadas aos lipídeos e suas regiões hidrofílicas voltadas para o poro.
Barril (<i>Barrel-stave</i>)	AMPs são inseridos perpendicularmente à membrana, e formam estruturas parecidas com barris.

Fonte: Adaptado de Bahar e Ren, 2013

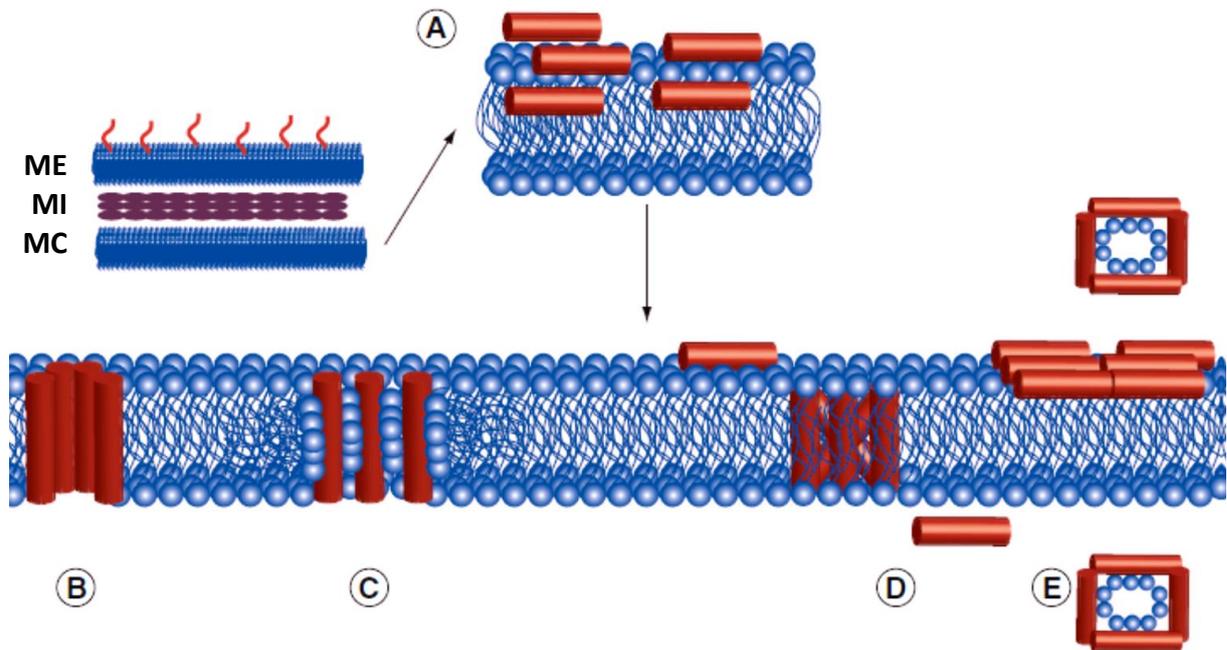


Figura 3: Representações dos modelos de interação de AMPs com a membrana plasmática. (A) *Membrane thinning*; (B) *Barrel-stave*; (C) Poro toroidal; (D) *Aggregate*; (E) *Carpete*. ME: membrana externa; MI: membrana interna; MC: membrana citoplasmática. Fonte: Adaptado de HALE e HANCOCK, 2007.

AMPs demonstram diversas vantagens em relação aos antibióticos convencionais, como amplo espectro, mecanismo de ação diferenciado – promovendo atividade bactericida quando lisa a membrana plasmática –, rápida ação e níveis potencialmente baixos de resistência induzida. Essas características permitiram a possibilidade de utilização dessas moléculas como potenciais novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas e com isso iniciou-se a busca por novos AMPs (GORDON e ROMANOWSKI, 2005).

Tradicionalmente, essa busca envolveu peptídeos ativos de ocorrência natural de diferentes seres vivos. No entanto, com o desenvolvimento da bioinformática e da modelagem molecular, a possibilidade de seleção de biblioteca combinatória para novos peptídeos e manipulação química de peptídeos já existentes permitiu o desenvolvimento de peptídeos sintéticos, com atividade antimicrobiana tal qual os naturais. A busca por potenciais sequências de peptídeos antimicrobianos e de fragmentos que demonstrem exercer atividade antimicrobiana dentro de outras grandes proteínas, aumentaram ainda mais o âmbito de aplicação e produção de novos AMPs, capazes de serem utilizados como possíveis novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas (NGUYEN et al., 2011).

2.9 PEPTÍDEO Lrot3.6

O peptídeo Lrot3.6 é um peptídeo antimicrobiano sintético desenvolvido por Tavares (2015). Possui 16 aminoácidos (GSVLRAIMRMFAKLMG), dos quais 62,5% são hidrofóbicos. Apresenta carga global +3, peso molecular de aproximadamente 1781 Da, e seu tamanho estimado em 1,5 nm (ExPASy). Foi obtido por análise do transcriptoma de folhas de *Lippia rotundifolia*. O trabalho foi realizado visando descobrir possíveis sequências codificadoras de peptídeos antimicrobianos em *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*, comparando a sequências de AMPs já existentes em bancos de dados. Com auxílio da bioinformática e da modelagem molecular foi desenvolvido, entre outros peptídeos, o peptídeo Lrot3, que por demonstrar ser eficaz e possuir ação antimicrobiana foi remodelado e produziu outros oito AMPs, entre eles o peptídeo Lrot3.6. A principal motivação do estudo dessas espécies foi em razão da ausência de registros de seus transcriptomas e devido a trabalhos prévios com plantas do gênero *Lippia* que demonstravam ação antimicrobiana e a presença de AMPs (TAVARES, 2015).

Os resultados obtidos por Tavares (2015), relacionados ao potencial antimicrobiano do peptídeo Lrot3.6, demonstraram que ele possui um amplo espectro de ação, sendo eficaz na inibição do crescimento tanto de bactérias gram-positivas, como estirpes de *S. aureus*, quanto para gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* (TAVARES, 2015).

2.10 NANOTECNOLOGIA

Em 1959, Richard Feynman foi o vencedor do Prêmio Nobel por propor a ideia de nanotecnologia, sugerindo o desenvolvimento de máquinas moleculares. Em 1979, o termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez em uma publicação científica, por Norio Taniguchi, em que ele descrevia as tecnologias usadas na construção de novos materiais em escala nanométrica por meio da manipulação de átomo a átomo, que poderia produzir até mesmo máquinas nanométricas (*nanodevices*), como nanorrobôs e regeneradores de tecido (ZHANG e WEBSTER, 2009; FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012).

Desde então, a comunidade científica investiga os múltiplos papéis que essa tecnologia pode desempenhar para benefício de diversas áreas da sociedade. A capacidade de manipular as propriedades dos materiais por colocá-los à escala nanométrica e assim alcançar características desejadas é o que mais intrigou na introdução do conceito de nanotecnologia (ZHANG e WEBSTER, 2009).

Dessa forma, nanotecnologia pode ser definida como uma engenharia de fabricação de materiais à escala atômica e molecular. Categoricamente, inclui partículas que correspondem a bilionésima parte do metro (10^{-9} m). No seu mais estrito refere-se, segundo a *National Nanotechnology Initiative* (NNI), a estruturas que apresentem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 a 100 nm. Contudo, a comunidade científica defende que, em termos de tamanho, as nanopartículas se estendem até 1.000 nm (FAROKHZAD e LANGER, 2009; MOUSA e BHARALI, 2011). Devido a circunstâncias especiais prevalentes para certos dispositivos médicos e farmacêuticos, o termo “nano” é estendido para estruturas especializadas com diâmetros médios entre 100 e 1.000 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Desde que emergiu, a nanotecnologia demonstra inovações e vasta aplicação em diversas áreas do conhecimento, como engenharia, química, física, biologia, informática. Sendo multidisciplinar, busca o desenvolvimento de diferentes nanomateriais para suas variadas aplicações (FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012; DÚRAN e MARCATO, 2013).

Os nanomateriais podem se apresentar em diferentes organizações estruturais, tais como nanopartículas, nanocristais, nanotubos, nanofibras, nanofilmes, entre outros. Após a redução dos materiais à nanoescala, esses aumentam sua área superficial e a relação área/superfície é capaz de proporcionar propriedades físico-química superiores, tais como propriedades mecânicas, ópticas, elétricas, catalíticas e magnéticas, que normalmente esses materiais não apresentariam (FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012). Devido a essas características otimizadas, os nanomateriais podem ser explorados em diversas áreas do conhecimento (ZHANG e WEBSTER, 2009).

Uma delas é a nanobiotecnologia, que é um dos ramos de estudos da nanotecnologia que aplica nanomateriais em ciências biológicas, gerando conhecimento e produtos nas áreas biotecnológicas, farmacêuticas, médicas, entre outras (FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012). Dentre essas aplicações, é área da medicina que se revela a mais promissora, em particular no desenvolvimento de

nanopartículas para entrega controlada de fármacos, terapia genética personalizada e nanodiagnóstico (SANTOS et al., 2014). Dessa forma, a nanomedicina é a utilização de nanomateriais para diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, auxiliando na melhoria de vida dos pacientes (MUTHU et al., 2014).

2.10.1 NANOFÁRMACOS: NANOSSISTEMAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS E MOLÉCULAS BIOATIVAS

Entre as pesquisas em nanomedicina, concentram-se aquelas que visam a produção de nanofármacos, formulações que envolvem materiais nanoestruturados para construir sistemas que transportem e entreguem fármacos de forma controlada. A aplicação da nanotecnologia para entrega de fármacos e moléculas biológicas em nanomedicina, também conhecida como *drug delivery*, promete mudar o panorama de produção de produtos farmacêuticos e também das indústrias de biotecnologia (FAROKHZAD e LANGER, 2009; ROJAS-AGUIRRE et al., 2016).

Essa nova forma de entrega de fármacos, que envolve nanotecnologia, tornou-se promissora devido às características que são capazes de alcançar, diferente dos fármacos convencionais. Entre elas estão: a possibilidade de entrega de drogas insolúveis em água; entrega direcionada do fármaco a célula ou microrganismo alvo; passagem da droga às barreiras endoteliais; co-entrega de duas ou mais drogas ou modalidade terapêutica para terapia de combinação (FAROKHZAD e LANGER, 2009). Além dessas vantagens, tem-se ainda: a redução da dosagem; assegura o efeito farmacêutico da substância ativa; minimiza os efeitos colaterais; proteção de moléculas ou substâncias ativas contra degradação; melhoria na estabilidade e ainda permite uma liberação controlada e prolongada dos fármacos nos locais alvo, ao longo do período de dias e até semanas (LIU et al., 2007).

Nanoestruturas possuem grande potencial para produzirem um sistema eficaz de entrega de fármacos e moléculas bioativas. Muitos nanossistemas biodegradáveis estão sendo investigados para aplicações de administração de fármacos, tais como lipossomas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, entre outros (BRANDELLI, 2012).

2.10.2 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Entre as diversas nanoestruturas estão as nanopartículas poliméricas, sistemas carreadores de fármacos que possuem diâmetro inferior a 1 μm . Inclui as nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 4), que diferem entre si devido a sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas são formadas por um núcleo oleoso revestido por um envoltório polimérico, em que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo oleoso ou adsorvido na parede polimérica. Já as nanoesferas são formadas apenas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003).

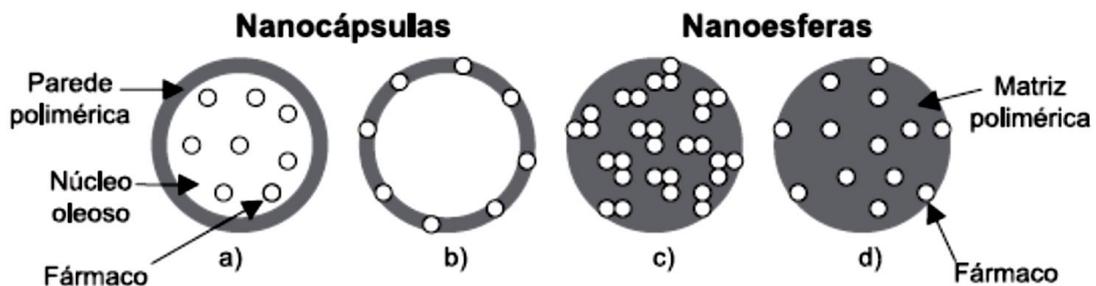


Figura 4: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas. a) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; b) Fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; c) Fármaco retido à matriz polimérica em nanoesferas; d) Fármaco adsorvido à matriz polimérica da nanoesfera. Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.

Dentre suas várias aplicações terapêuticas, uma das mais promissoras é a vetorização de antibióticos, formando os antibióticos nanoestruturados, alternativa para o tratamento de doenças infecciosas. Antibióticos nanoestruturados são nanomateriais que possuem atividade antimicrobiana ou sistemas capazes de promover a eficácia e a segurança da entrega e administração do antibiótico (EDSON e KWON, 2016). Normalmente são formulados em nanopartículas poliméricas, para uso total de suas propriedades antimicrobianas. Os polímeros podem ser classificados em naturais e sintéticos. Entre os polímeros naturais mais empregados destaca-se a quitosana (SCHAFFAZICK et al., 2003; FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012).

A quitosana é um biopolímero catiônico obtido por meio da desacetilação da quitina, um polissacarídeo estrutural presente no exoesqueleto de artrópodes, endoesqueleto de cefalópodes e parede celular de alguns fungos (LADAVIERE,

2016). Consiste em dois tipos de unidades repetitivas, *N*-acetil-D-glicosamina, e D-glicosamina (Figura 5), unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (AHMED e ALJAEID, 2016).

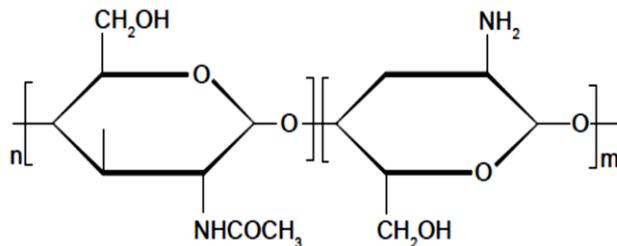


Figura 5: Estrutura química das unidades repetitivas de quitosana. À esquerda tem-se a unidade *N*-acetil-D-glicosamina, e à direita tem-se a D-glicosamina. Fonte: AHMED e ALJAEID, 2016.

É insolúvel em água, mas é solúvel em soluções diluídas de ácido acético, cítrico e tartárico, a pH inferior a 6,5. É catiônica devido à presença do grupamento amino, que se torna livre em soluções aquosas diluídas de ácido, convertendo a forma ionizável $R-NH_3^+$ (AHMED e ALJAEID, 2016).

A quitosana atraiu um grande interesse econômico nos últimos anos devido às suas combinações únicas de características, tais como ser biodegradável, biocompatível, sua capacidade de complexação a metais e sua atividade antimicrobiana. Suas propriedades permitiram que ela fosse aplicada em diferentes áreas, tais como em indústrias biotecnológicas, farmacêuticas, de cosméticos e alimentos (DU et al., 2009).

No que se refere à sua atividade antimicrobiana, está relacionada principalmente a carga positiva que possui, devido à presença dos grupamentos amino livres, protonados quando em contato com os fluidos biológicos. Jung et al. (1999) propuseram dois possíveis mecanismos que explicam a atividade antimicrobiana da quitosana: o primeiro, em que ela se liga a porções ácidas nos fosfolípidios e assim restringe o movimento para entrada de substâncias no microrganismo; e o segundo, em que elas penetram no interior das células e se ligam ao DNA, inibindo sua replicação e paralisando o crescimento, demonstrando dessa forma um efeito bacteriostático para uma diversidade de organismos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas e também fungos.

Para a formação de nanopartículas de quitosana diversos métodos podem ser aplicados. No entanto, o método de gelificação iônica, particularmente empregando o TPP (trifosfato de sódio) como agente reticulante, é o método mais

amplamente descrito na literatura (RAMPINO et al., 2013; LADAVIERE, 2016; RAJITHA et al., 2016). Possui a vantagem de ser um método simples, que não envolve solventes orgânicos a altas temperaturas, tornando-o seguro para nanoencapsulação de agentes terapêuticos termosensíveis, como proteínas, peptídeos, hormônios e vacinas (AHMED e ALJAEID, 2016). A formação das nanopartículas consiste na interação eletrostática (*cross-linking*) (Figura 6) entre o grupamento amino da quitosana, carregado positivamente, aos fosfatos presentes nas moléculas de TPP, carregados negativamente. Essas interações formam nanoesferas que podem promover a nanoencapsulação de fármacos e agentes biológicos, permitindo a utilização desses nanossistemas como *drug delivery* (KASPAR et al., 2013; AHMED e ALJAEID, 2016).

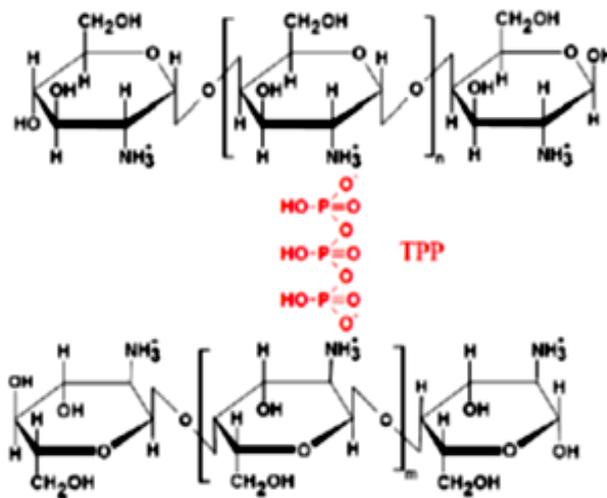


Figura 6: Interação eletrostática (*cross-linking*) entre quitosana e TPP. Fonte: KASPAR et al., 2013.

2.11 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NANOENCAPSULADOS

Na era da resistência microbiana aos antibióticos, AMPs são consideradas moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-infecciosos, devido às inúmeras vantagens que possuem em relação aos antibióticos usuais. No entanto, existem muitas limitações em relação ao uso de AMPs como formulações terapêuticas, a maioria relacionada a sua biodisponibilidade. Entre elas está sua fraca estabilidade, sujeitos a ocorrência de hidrólise e proteólise, inativação

em alguns fluidos biológicos e curta vida útil no sistema circulatório (BRANDELLI, 2012; SANDRESCHI et al., 2016).

Nesse contexto, a nanoencapsulação demonstra-se uma alternativa promissora para armazenamento e administração de peptídeos bioativos, uma vez que possui a capacidade de proteger o peptídeo de proteólise, interações indesejadas a fluidos biológicos, permite uma liberação controlada, duradoura e direcionada da molécula (SANDRESCHI et al., 2016).

Peptídeos nanoencapsulados podem ser desenvolvidos por adsorção em nanocarreadores, encapsulação ou bioconjugação em nanopartículas. Peptídeos sozinhos também são capazes de formar estruturas nanométricas como nanoesferas, nanofibrilas e nanoadesivos, por meio de sua auto-organização, inserindo-se aminoácidos específicos capazes de guiar sua organização (YADAV et al., 2011).

Estudos recentes já demonstraram a possibilidade de se nanoencapsular peptídeos antimicrobianos com resultados satisfatórios frente a cepas de importância médica, como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, confirmando o quanto essas formulações podem ser uma boa alternativa para o tratamento de doenças infecciosas (WATER et al., 2015; PIRAS et al., 2015b; GARCIA-ORUE et al., 2016; CRUZ et al., 2017).

Water et al. (2015) nanoencapsularam o peptídeo antimicrobiano catiônico plectasin em ácido poli D-lático coglicólico (PLGA). Obtiveram uma alta eficiência de encapsulação e liberação do peptídeo durante 24 h. Além disso, o peptídeo nanoencapsulado foi mais eficiente contra cepas de *S. aureus* que o plectasin livre.

Piras et al. (2015b) utilizaram quitosana para nanoencapsular o peptídeo antimicrobiano catiônico temporin B. Com a nanoencapsulação conseguiram reduzir a citotoxicidade do peptídeo em células mamárias e promoveram o prolongamento da liberação durante quatro dias contra cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

Garcia-Orue et al. (2016) nanoencapsularam o AMP humano LL-37 em nanovesículas lipídicas. O nanossistema se mostrou ativo contra cepas de *E. coli in vitro*, e *in vivo* foi capaz de auxiliar na cicatrização, mantendo a bioatividade do AMP LL-37.

Cruz et al. (2017) desenvolveram nanopartículas de PLA e de PLGA para encapsular o AMP sintético GIBIM-P5S9K. Ambas as formulações, GIBIM-P5S9K-PLA e GIBIM-P5S9K-PLGA, foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de

0,5 μM e 1 μM , diferentemente do peptídeo livre que foi ativo a partir da concentração de 10 μM .

O desenvolvimento de novos medicamentos para combate a infecções devido à resistência bacteriana é indispensável. Nesse cenário, pesquisas sobre formulações de peptídeos antimicrobianos nanoencapsulados demonstram-se uma alternativa promissora, devido às vantagens que podem oferecer como: garantir ou até mesmo potencializar a atividade antimicrobiana dos AMPs, proteção, além de permitirem uma liberação controlada e prolongada da molécula e possuírem ação específica (YADAV et al., 2011). Por isso, é de suma importância estudos que busquem o desenvolvimento de novas formulações contendo AMPs nanoencapsulados, formulações essas que sejam capazes de garantir o efeito antimicrobiano do peptídeo e que minimizem os efeitos tóxicos. Nesse sentido que propôs-se o presente projeto, em que foi avaliada a ação antimicrobiana de peptídeos sintéticos nanoencapsulados frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas de importância médica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, bem como os possíveis efeitos citotóxicos em cultura *in vitro* de células HEK293.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de quitosana livre e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6, caracterizando-as quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta.
- Determinar a eficiência de encapsulação do peptídeo Lrot3.6.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do peptídeo Lrot3.6 livre e nanoencapsulado, contra a gram-negativa *E. coli* ATCC 25922, e as gram-positivas *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos peptídeos livres e nanoencapsulados em células HEK293.

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE E SOLUBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Lrot3.6

Para o presente trabalho o peptídeo Lrot3.6 foi sintetizado pela empresa *GenOne Biotechnologies*, Brasil, pelo método de síntese química em fase sólida. Apresentou índice de pureza de 95,66%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). O peptídeo foi liofilizado e enviado à Universidade Federal de Juiz de Fora – Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Genética e Biotecnologia. A solubilização do peptídeo foi realizada em solução contendo água ultra pura (MilliQ), Tween 20 0,5% (v/v) e DMSO 0,5% (v/v), obtendo uma concentração estoque de 1,6 mg/mL. Alíquotas do peptídeo solubilizado foram acondicionadas em freezer a -20°C.

4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES

Para o preparo de nanopartículas de quitosana livres utilizou-se como reagentes: quitosana de baixo peso molecular (50.000 – 190.000 Da), com grau de desacetilação 75-85% (Sigma-Aldrich), ácido acético (Sigma-Aldrich) e tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich).

O método utilizado foi o de gelificação iônica (CALVO et al., 1997), que consiste na formação de nanoesferas por meio da interação eletrostática entre grupamentos amino catiônicos da quitosana (cátion NH_3^+) e os fosfatos do TPP, carregados negativamente. Esse método possibilita a formação de estruturas em formato de esferas nos pontos potenciais de reticulação iônica, em que há o contato entre grupamentos catiônicos da quitosana e aniônicos do TPP (FAN et al., 2012).

Para a síntese de nanoesferas de quitosana duas soluções principais foram preparadas: a solução I, contendo quitosana, com concentração de 2,06 mg/mL, e ácido acético a 2% (v/v); e a solução II, contendo TPP, com concentração de 1 mg/mL, e água ultra pura (MilliQ).

Inicialmente preparou-se 30 mL da solução I, a fim de solubilizar a quitosana (2,06 mg/mL) em solução diluída de ácido acético (2%). Essa solução foi

mantida em intensa agitação magnética, a temperatura ambiente, durante 24 h. Após esse período, o pH da solução foi ajustado para 4 utilizando-se NaOH 5M (filtro esterilizado).

A solução II foi preparada adicionando-se TPP (1 mg/mL) a 15 mL de água ultra pura (MilliQ). A solução foi mantida em constante agitação durante 30 min, até ocorrer a total solubilização do sal. O pH da solução foi ajustado para 9 utilizando-se NaOH 5M (filtro esterilizado).

Para a formação das nanoesferas de quitosana pelo método de gelificação iônica, 3 mL da solução II de TPP foi gotejada em 5 mL da solução I de quitosana, que foi mantida em constante agitação magnética durante todo o processo. Para o gotejamento foi utilizada seringa estéril de 10 mL, acoplada a haste do agitador magnético a uma distância de aproximadamente 10 cm. Findado o processo, a suspensão de nanopartículas foi mantida sob agitação por mais 60 min.

Posteriormente foram realizadas diluições em água ultra pura, baseadas nas concentrações do peptídeo livre. Antes de cada ensaio antimicrobiano as suspensões de nanopartículas de quitosana foram submetidas a centrifugação (Eppendorf MiniSpin Plus™) a 12.100 g, por 1 min, e utilizou-se o sobrenadante para o ensaio.

4.3 SÍNTESE DE NANOESFERAS DE QUITOSANA ESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO Lrot3.6

Para a síntese do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado foi utilizada a mesma metodologia da síntese de nanopartículas de quitosana livres, descrita no tópico 4.2, com a complementação da adição de aproximadamente 1,347 mL do peptídeo na solução I – após solubilização da quitosana e correção do pH –, previamente ao gotejamento por TPP. Com isso, formou-se uma solução de peptídeo nanoencapsulado de 256 µg/mL, que foi posteriormente submetida a diluição seriada, com água ultra pura (MilliQ), formando soluções estoque de concentrações 256, 128, 64, 32 e 16 µg/mL.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 foram caracterizadas quanto ao tamanho e índice de polidispersão através de espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico (DLS), e potencial Zeta pelo método de mobilidade eletroforética, com a utilização do equipamento Zetasizer®, Nano-ZS da Malvern. As leituras foram realizadas em triplicata, no Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal, da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG.

4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação do peptídeo Lrot3.6 nanoestruturado foi determinada por método indireto, realizada em duas etapas: a primeira, centrifugação das amostras e a segunda, quantificação do peptídeo pelo método espectrofotométrico de determinação de proteínas totais descrito por Lowry et al. (1951) (NARAYANAN et al., 2014; ZAVAREZE et al., 2014; RAO et al., 2016; DUBEY et al., 2016; HOLDRICH et al., 2017; TAJU et al., 2017; BHATTACHARYYA et al., 2017).

Após a síntese das nanoesferas de quitosana estruturadas com o peptídeo, 4 mL da amostra foi aplicada em coluna Amicon® 10 kDa e centrifugada (Eppendorf 5810 R) a 5.000 g, a 4°C, por 20 min. Dessa forma, a porção do peptídeo (1,78 kDa) que não foi encapsulada passaria pela coluna, ficando na parte inferior, e a porção encapsulada ficaria retida na parte superior da coluna. O mesmo processo foi realizado com as nanopartículas de quitosana livres.

Para quantificar as concentrações do peptídeo em ambas porções da coluna utilizou-se o método de dosagem de proteínas proposto por Lowry et al. (1951). Para a reação, foram pipetados 10 µL da amostra, 390 µL de água destilada, 2 mL de mistura reativa e 200 µL de reagente de Folin diluído. Em seguida, 200 µL de cada amostra foram adicionados em placa de 96 poços e submetidos a leitura da absorbância no Varioskan® Flash (Thermo Scientific) a 660 nm. As amostras analisadas foram o sobrenadante e o precipitado coletados na coluna, tanto do

peptídeo nanoencapsulado quanto da nanopartícula livre, e também o peptídeo livre, todos adicionados em duplicata.

A eficiência de encapsulação foi determinada pela diferença entre a concentração total do peptídeo usada e a concentração do peptídeo livre, coletada na parte inferior da coluna. As concentrações foram determinadas baseadas em uma curva padrão utilizando-se concentrações crescentes do peptídeo (10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL) e também por meio de uma curva padrão de albumina, com concentrações conhecidas (10, 20, 30 e 40 µg/mL). O cálculo da eficiência de encapsulação (E.E.%) foi dado pela seguinte equação (BHATTACHARYYA et al., 2017):

$$E.E. (\%) = \frac{W_{total} - W_{livre}}{W_{total}} \times 100 \quad (1)$$

onde W_{total} corresponde a concentração total do peptídeo e W_{livre} a concentração de peptídeo livre.

4.6 MICRORGANISMOS

Para realização dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* do peptídeo livre e nanoencapsulado foram utilizadas duas cepas bacterianas gram-positivas e uma gram-negativa, ambas catalogadas no *American Type Culture Collection* (ATCC). As amostras de bactérias foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana da UFJF, plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido e armazenadas em geladeira até o uso. As amostras de gram-positivas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. A gram-negativa usada foi a *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.7 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO PADRÃO

Antes de iniciar os ensaios antimicrobianos foi elaborada uma curva de crescimento padrão bacteriano, a fim de se analisar o crescimento normal das

bactérias. O protocolo para realização da curva de crescimento bacteriano foi adaptado de Malvezzi (2010).

Primeiramente, as bactérias foram repicadas em meio LB sólido. Colônias isoladas das ATCCs foram usadas para confecção de novas placas, que cresceram em estufa a 37°C de um dia para o outro. Após isso, foi realizado um pré-inóculo, utilizando duas colônias para *E. coli* e seis colônias para *S. aureus* e para *S. epidermidis* em 2 mL de meio LB. As culturas foram mantidas no shaker durante 16 h, a 37°C, sem agitação. A seguir, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 4 mL de LB, totalizando 5 mL de inóculo, deixado por 5 h no shaker, a 37°C, sem agitação. Depois desse período, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (Eppendorf MiniSpin Plus™) a 9.000 g por 10 min. O pellet foi ressuspensão em solução salina 0,9% e as suspensões bacterianas foram diluídas também em solução salina 0,9% até alcançarem uma densidade óptica (OD) correspondente a 0,6 de absorbância, a 625 nm.

Após preparo das suspensões bacterianas, foi realizada uma microdiluição em placa de 96 poços. Cada amostra de bactéria foi adicionada em triplicata. Foram usados 40 µL da suspensão preparada e 160 µL de meio LB, totalizando 200 µL em cada poço. A fim de acompanhar o crescimento bacteriano e montar a curva, foram realizadas leituras da absorbância turbidimétrica a 625 nm, 37°C, durante 24 h, em intervalos de uma hora, no Varioskan® Flash, da Thermo Scientific. O valor da absorbância de cada hora foi obtido pela média dos valores de OD de cada triplicata.

4.8 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Para avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo Lrot3.6 livre e nanoencapsulado contra as bactérias *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *E. coli* ATCC 25922, foram realizados bioensaios *in vitro* pelo método de microdiluição em placa, segundo padronização da CLSI (2015).

As bactérias foram previamente plaqueadas em meio LB sólido e mantidas em estufa, por 24 h. Em seguida, retirou-se duas colônias de *E. coli* e seis colônias de *S. aureus* e de *S. epidermidis*, e adicionou-se em tubos cônicos tipo Falcon contendo 3 mL de LB. Os inóculos foram mantidos por agitação de 100 rpm (Agitador Orbital MAXQ™ 4000, Thermo Scientific), a 37°C, até o momento em que atingiram a OD

(625 nm) considerada ideal de 0,08 a 0,1, correspondente a 1×10^8 UFC (unidades formadoras de colônia), padronizado segundo CLSI (2015).

Atingida a OD ideal, a suspensão foi diluída em meio LB para se obter uma concentração final de 5×10^4 UFC, utilizada em, no máximo, 15 min. Para a montagem do bioensaio em microplaca de 96 poços, cada poço foi inoculado com 50 μ L da suspensão bacteriana e 50 μ L do tratamento, totalizando 100 μ L em cada poço.

Baseado em Tavares (2015), para análise da concentração mínima inibitória (MIC) foram testadas as concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 μ g/mL de cada tratamento, que se seguem.

4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Controle negativo (relativo 1): meio LB e tampão de diluição do peptídeo, contendo DMSO e Tween 20, ambos a 0,5 % (v/v).
- Controle negativo (relativo 2): inóculo e tampão, a fim de analisar se há influência do tampão na inibição do crescimento bacteriano.
- Controle negativo (absoluto): inóculo e meio LB.
- Controle positivo (absoluto): foi utilizado o cloranfenicol nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 μ g/mL. A escolha do antibiótico seguiu recomendações da CLSI (2015), que considera que para ensaios de antimicrobianos alternativos, que ainda não se conhece o efeito, utiliza-se como controle positivo antibióticos do grupo C, como o cloranfenicol, que apresenta espectro de ação tanto para gram-positivas quanto para gram-negativas, podendo ser o único antibiótico utilizado como controle positivo neste ensaio.
- Peptídeo livre, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 μ g/mL, utilizado como um controle positivo.

- Peptídeo nanoencapsulado, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL.
- Nanopartícula de quitosana livre, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, baseadas nas concentrações do peptídeo livre.

4.9 ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO

Após montagem da microplaca, para análise do efeito dos tratamentos sobre o crescimento bacteriano, foram realizadas leituras da absorbância turbidimétrica a 625 nm, em 0, 24 e 48 h, no Varioskan® Flash, da Thermo Scientific. A placa foi mantida, entre os intervalos de leitura, no shaker (Agitador Orbital MAXQ™ 4000, Thermo Scientific), com agitação de 100 rpm, a 37°C. Os tratamentos em suas diferentes concentrações foram adicionados em triplicata. O valor da absorbância de cada hora foi obtido pela média dos valores de OD de cada triplicata. Em seguida, montou-se uma curva para cada concentração testada.

4.10 ENSAIO PARA ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA

Após 24 h de exposição da placa do ensaio antimicrobiano descrito no tópico 4.8, retirou-se uma alíquota de 10 µL de cada grupo experimental analisado e adicionou-se a 100 µL de meio LB líquido, em microplaca de 96 poços. Essa placa foi mantida em shaker (Agitador Orbital MAXQ™ 4000, Thermo Scientific), com agitação de 100 rpm, a 37°C, e realizadas leituras da absorbância a 625 nm nos intervalos de 0, 24 e 48 h.

4.11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade induzida pelos tratamentos foi realizada em células HEK293 (Rim Embrionário Humano 293), utilizando-se apenas as menores concentrações testadas nos testes antimicrobianos, 8 µg/mL e 16 µg/mL, ambas

aplicadas em octoplicata para cada tratamento. Os tratamentos avaliados foram as nanopartículas livres, o peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado. Os testes foram adaptados da norma ISO 10993-5 (2009).

4.11.1 CULTURA DE CÉLULAS HEK293 *in vitro*

As células HEK293 foram obtidas de linhagens armazenadas no Laboratório de Genética Humana e Terapia Celular, da UFJF. Para cultivo das células, elas foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de antibiótico, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em placa de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C, em atmosfera umidificada, com CO₂ a 5%.

As células confluentes foram tripsinizadas por cerca de 3 min para se desprenderem do fundo da garrafa. Em seguida, houve a inativação da tripsina adicionando-se DMEM-F12 acrescido de 10% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada (Eppendorf 5810 R) em tubo cônico tipo Falcon de 50 mL, a 1.500 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 2 mL de DMEM-F12. A quantificação das células foi realizada por contagem em câmara de Neubauer, obtendo uma concentração de cerca de 5×10^6 células. Dilui-se as células em uma concentração de 2×10^3 em 200 µL de DMEM. Em placa de 96 poços, adicionou-se 200 µL de DMEM e 1 µL das células diluídas em cada poço. A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em atmosfera umidificada, com CO₂ a 5%.

4.11.2 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AOS TRATAMENTOS

Após 24 h de incubação, as células foram expostas aos tratamentos analisados: peptídeo livre, nanopartícula livre e peptídeo nanoestruturado. As amostras foram adicionadas previamente ao DMEM, na quantidade ideal para cada concentração. Após isso, retirou-se o meio que estava nos poços em cultura, e adicionou-se 200 µL do meio DMEM contendo as amostras, em cada poço. As células

HEK293 foram mantidas em contato com os tratamentos por 24 h e 48 h. A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em atmosfera umidificada, com CO₂ a 5%.

4.11.3 VIABILIDADE CELULAR POR MTT

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi avaliado pelo método de MTT (MOSMANN, 1983). Esse método colorimétrico consiste na quantificação da redução do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em um composto de coloração púrpura, os cristais de formazan. A reação é catalisada por enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, que reduzem o MTT com o FADH₂ como agente redutor. Dessa forma, a formação dos cristais de formazan por células submetidas ao tratamento são um indicativo de viabilidade celular.

Após 24 e 48 h do período de exposição dos peptídeos livres, nanoencapsulados e das nanopartículas livres *in vitro*, as células foram lavadas três vezes usando PBS 1X, com o objetivo de remover nanopartículas e peptídeos. Em seguida, adicionou-se 20 µL de solução estoque de MTT (Sigma-Aldrich), em uma concentração de 5 mg/mL, a 180 µL de DMEM-F12. Posteriormente, adicionou-se 200 µL a cada poço e a placa foi incubada durante 4 h, a 37°C, em atmosfera umidificada com CO₂ a 5%. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 200 µL de isopropanol-ácido (3,3 mL HCl a 37% em 1L de isopropanol) e a placa foi incubada por 1 h, a 37°C, para dissolver os cristais de formazan. Após isso, foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no Varioskan® Flash (Thermo Scientific). Para cálculo da viabilidade celular, foi considerada a média da absorbância do grupo controle como 100%, e assim se baseou o cálculo percentual de viabilidade dos demais grupos.

4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram representados como média e consideraram o desvio padrão. As análises, bem como os gráficos gerados, foram realizadas no programa GraphPad Prism 7®. Os dados apresentaram distribuição normal, realizada pelo teste de Bartlett. O nível de significância foi determinado pela ANOVA, em

seguida os tratamentos foram comparados ao controle positivo pelo teste de Tukey, para os ensaios antimicrobianos, e ao controle negativo para o MTT. As variáveis relacionadas à caracterização das nanopartículas foram avaliadas pelo teste *t* de amostras não-pareadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES E NANOESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO Lrot3.6 E DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PEPTÍDEO Lrot3.6 NAS NANOESFERAS DE QUITOSANA

As nanopartículas desenvolvidas neste trabalho foram caracterizadas quanto a seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta. Para a realização de um estudo comparativo entre as nanopartículas livres e aquelas estruturadas com o peptídeo Lrot3.6, ambas foram submetidas a análise dessas características. Além disso, foi determinada a eficiência de encapsulação do peptídeo Lrot3.6 nas nanoesferas de quitosana. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Principais características das nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 sintetizadas neste trabalho: raio hidrodinâmico médio, índice de polidispersão médio, potencial Zeta médio e eficiência de encapsulação

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI médio	Potencial Zeta médio (mV)	Eficiência de Encapsulação (E.E.%)
Peptídeo Lrot3.6	-	-	+ 18,7 ± 1,5	-
Nanopartícula de quitosana livre	196 ± 1,8	0,356 ± 0,01	+ 36,5 ± 2,1	-
Nanopartícula de quitosana estruturada com o peptídeo Lrot3.6	228 ± 5,9	0,398 ± 0,03	+ 35,7 ± 2,2	93,55

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a determinação do tamanho médio e índice de polidispersão das nanopartículas, foi realizado por espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico (DLS). O tamanho médio das nanopartículas livres foi de 196 nm ($196 \pm 1,8$ nm), com índice de polidispersão (PDI) médio de 0,356 ($0,356 \pm 0,01$). Graficamente, obteve-se comportamento bimodal, com partículas menores de 8 nm até partículas com aproximadamente 1000 nm, no entanto a maioria esteve dentro da faixa de pico da média, como pode ser observado na Figura 7.

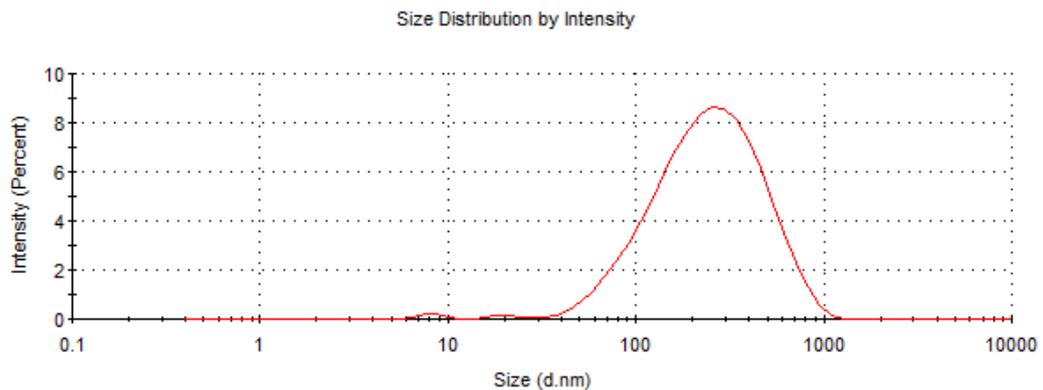


Figura 7: Distribuição do raio hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de quitosana livres. Fonte: Elaborado pelo autor.

Já em relação a distribuição do tamanho das nanoesferas de quitosana com o peptídeo Lrot3.6, o tamanho médio foi de 228 nm ($228 \pm 5,9$ nm), com índice de polidispersão (PDI) médio de 0,398 ($0,398 \pm 0,03$). As nanoesferas apresentaram tamanhos de até 5071 nm, como observado na Figura 8.

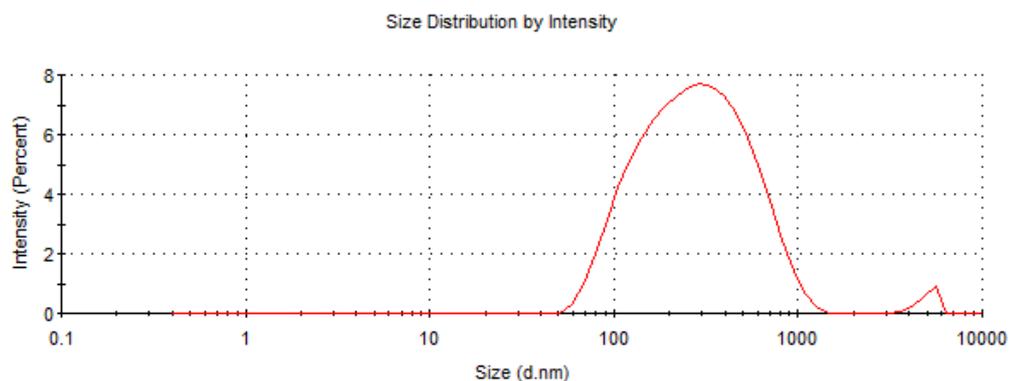


Figura 8: Distribuição do raio hidrodinâmico (nm) da nanopartícula estruturada com o peptídeo Lrot3.6. Fonte: Elaborado pelo autor.

Obteve-se uma diferença significativa de tamanho entre as nanopartículas livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 ($p < 0,05$, pelo teste t não-pareado), com as nanopartículas estruturadas com o peptídeo apresentando maior tamanho, indicativo de encapsulação.

Também foram analisados os valores do potencial Zeta médio do peptídeo Lrot3.6 livre, das nanopartículas de quitosana sem o peptídeo e das nanoesferas de quitosana com o peptídeo Lrot3.6. Não foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$, pelo teste t não-pareado) em relação ao potencial Zeta entre as nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6.

No que se refere a eficiência de encapsulação do peptídeo Lrot3.6 nas nanopartículas de quitosana, foi determinada utilizando-se uma curva padrão do próprio peptídeo e uma curva padrão de albumina. Em ambos os cálculos obteve-se exatamente a mesma eficiência de encapsulação, correspondente a 93,55%.

5.2 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Para se estabelecer o crescimento normal das bactérias, bem como definir o tempo de incubação das suspensões bacterianas antes do preparo da microplaca nos ensaios antimicrobianos, foi realizada uma curva padrão de crescimento bacteriano, que está representada na Figura 9. Foi estabelecido o período de até 5 h de incubação previamente a montagem da microplaca, visto que todas as bactérias (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228), nesse intervalo, encontraram-se em fase logarítmica de crescimento.

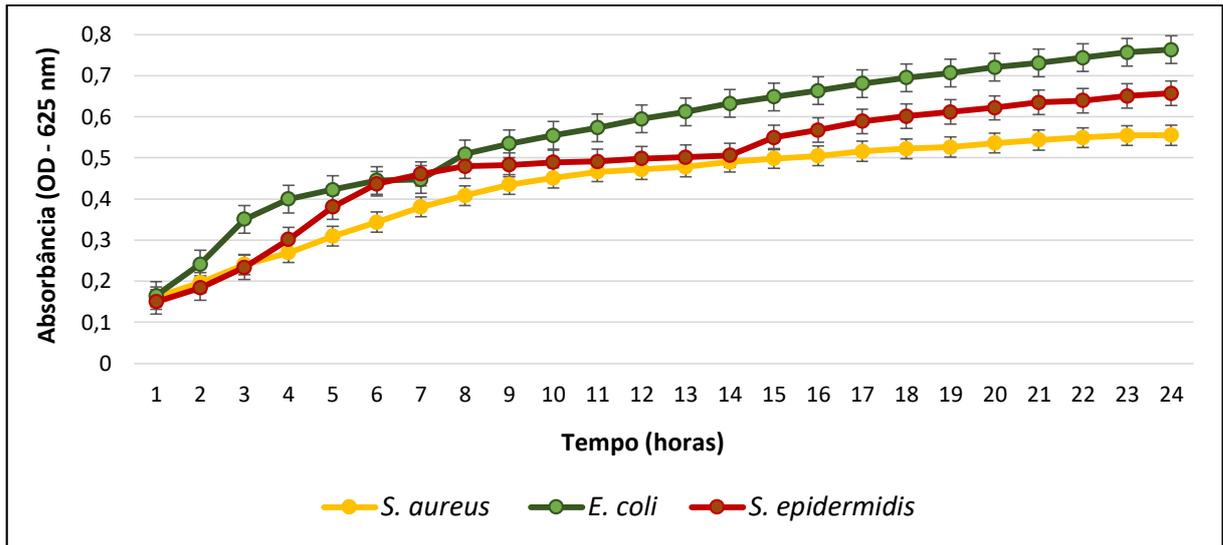


Figura 9: Curva de crescimento padrão das bactérias *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram realizados ensaios antimicrobianos no intuito de se conhecer a dinâmica de interação entre os peptídeos livres, nanoencapsulados e das nanopartículas livres frente às bactérias gram-positivas e gram-negativa testadas, bem como determinar a concentração mínima inibitória (MIC) em cada um dos tratamentos.

A metodologia utilizada foi a de microdiluição em placa (CLSI, 2015) testando-se as concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL do peptídeo Lrot3.6 livre, da nanopartícula livre – visto que a quitosana possui efeito antimicrobiano já descrito – e também do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração, com as três ATCCs: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Em cada ensaio, utilizou-se três controles negativos: controle negativo absoluto (meio LB e inóculo), controle negativo relativo 1 (meio LB e tampão de diluição do peptídeo) e controle negativo relativo 2 (tampão do peptídeo e inóculo). O controle negativo absoluto foi realizado para validar o crescimento bacteriano, comparando-o à curva de crescimento padrão bacteriano descrita no tópico 5.3. O controle negativo 1 foi realizado para desconto da absorbância do tampão de diluição do peptídeo, e o controle negativo 2 para avaliar se o tampão estaria influenciando na inibição do crescimento bacteriano, já que possui em sua composição dois detergentes, o Tween 20 e o DMSO, ambos a 0,5% (v/v). As Figura 10, Figura 11 e

Figura 12 representam o crescimento de cada bactéria em seu respectivo controle negativo.

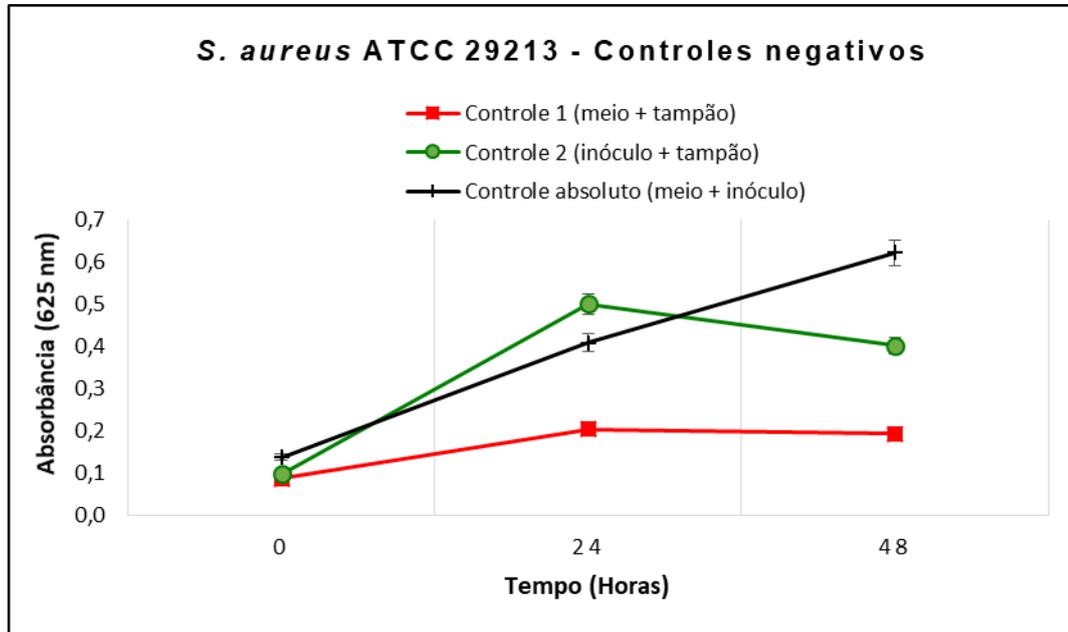


Figura 10: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213.
Fonte: Elaborado pelo autor.

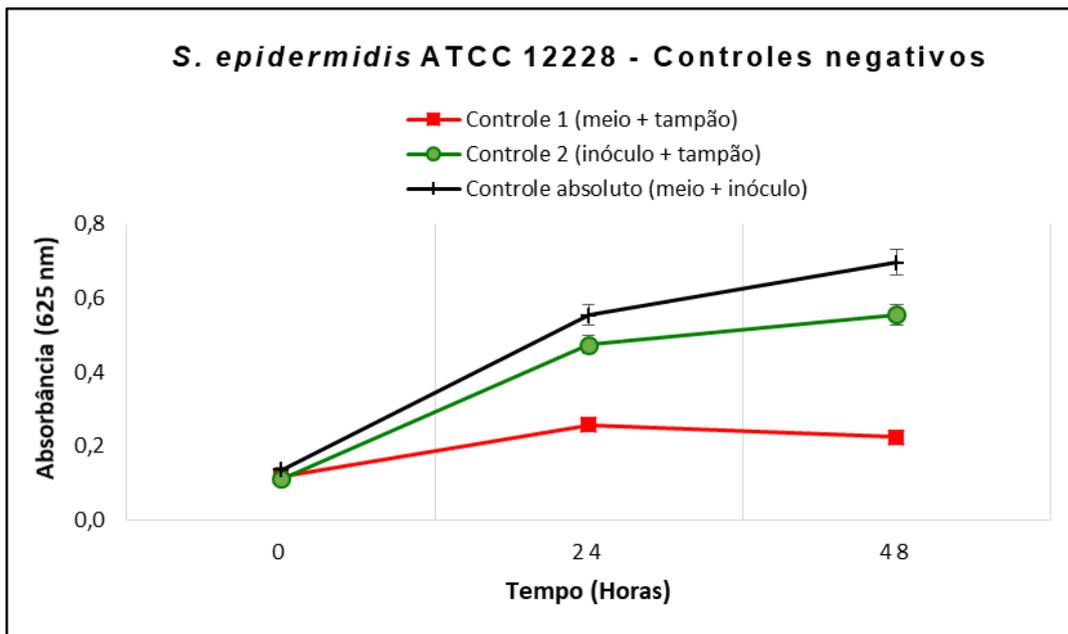


Figura 11: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228.
Fonte: Elaborado pelo autor.

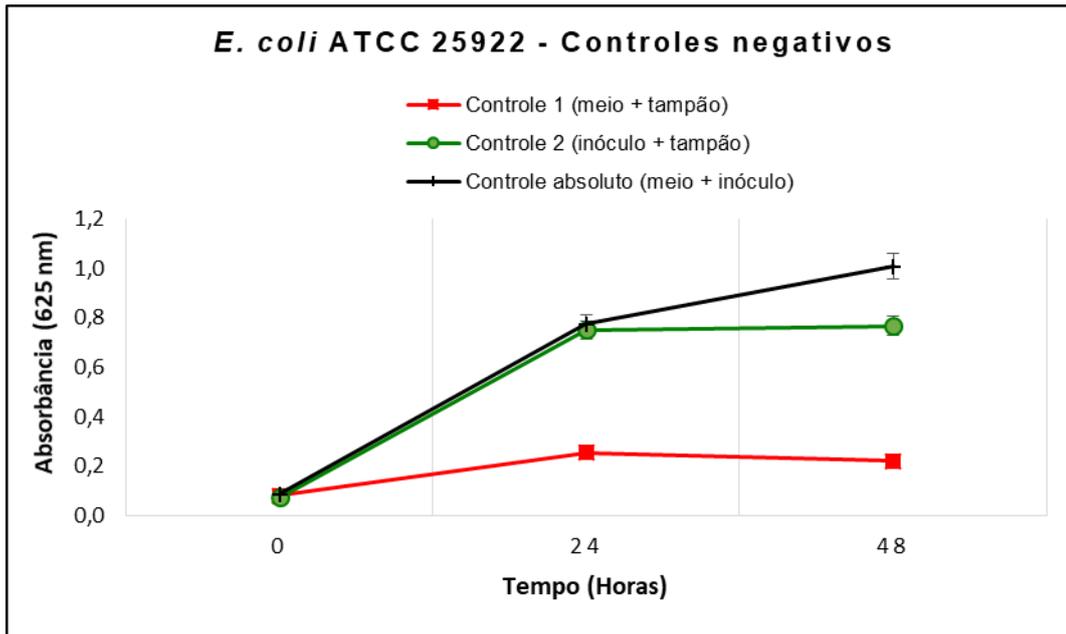


Figura 12: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as bactérias apresentaram crescimento normal no controle absoluto, confirmando a viabilidade de cada uma delas para a realização dos ensaios. Apenas *S. aureus* ATCC 29213 apresentou uma queda no crescimento após as 24 h no controle negativo relativo 2, provavelmente devido à influência do tampão de diluição do peptídeo.

Em relação aos bioensaios *in vitro*, realizados para avaliar a ação antimicrobiana dos tratamentos testados com as três estirpes bacterianas, as análises foram realizadas em triplicatas, em 24 e 48 h, e submetidas à análise estatística pelo teste de Tukey, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

Todos os tratamentos foram comparados ao controle positivo, cloranfenicol, na mesma concentração testada. Foi analisada também a diferença estatística entre o peptídeo Lrot3.6 livre e o peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado. Os resultados foram expressos em gráficos (Págs. 93-98) e tabelas.

5.2.1 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

A Tabela 5 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 5: Valores médios de absorvância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228 em 24 h e 48 h

Hora	Concentrações				
	testadas ($\mu\text{g/mL}$)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	0,349 _a	0,461 _b	0,311 _a	0,357 _a
	16	0,339 _a	0,497 _b	0,403 _a	0,438 _a
	32	0,250 _a	0,589 _c	0,396 _b	0,290 _a
	64	0,304 _a	0,276 _a	0,413 _b	0,348 _a
	128	0,345 _a	0,217 _a	0,344 _a	0,318 _a
48	8	0,380 _a	0,611 _b	0,307 _a	0,378 _a
	16	0,367 _a	0,619 _b	0,352 _a	0,288 _a
	32	0,272 _a	0,613 _c	0,428 _b	0,263 _a
	64	0,310 _a	0,332 _a	0,536 _b	0,362 _a
	128	0,375 _a	0,219 _a	0,333 _a	0,377 _a

Letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$, teste de Tukey) do controle (cloranfenicol) na mesma concentração. Fonte: Elaborado pelo autor.

A nanopartícula livre apresentou um MIC de 64 $\mu\text{g/mL}$, em 24 e 48 h. Já o peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram MIC na menor concentração, 8 $\mu\text{g/mL}$, com o peptídeo nanoencapsulado não apresentando diferença estatística em relação ao cloranfenicol em todas as concentrações.

Nas concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo livre, tanto em 24 h quanto em 48 h, foi observado um aumento da densidade turbidimétrica e consequente diferença estatística em relação ao cloranfenicol.

O peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre eles apenas na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, tanto em 24 h quanto em 48 h (Pág. 94). Nas demais concentrações não apresentaram diferença estatística.

5.2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

A Tabela 6 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *S. aureus* ATCC 29213.

Tabela 6: Valores médios de absorvância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213 em 24 h e 48 h

Hora	Concentrações				
	testadas (µg/mL)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	0,277 _a	0,392 _b	0,227 _a	0,256 _a
	16	0,287 _a	0,388 _a	0,254 _a	0,228 _a
	32	0,227 _a	0,502 _b	0,325 _a	0,287 _a
	64	0,261 _a	0,241 _a	0,358 _a	0,227 _a
	128	0,302 _b	0,210 _b	0,249 _b	0,150 _a
48	8	0,228 _a	0,433 _b	0,183 _a	0,344 _a
	16	0,274 _a	0,463 _b	0,200 _a	0,204 _a
	32	0,194 _a	0,618 _b	0,336 _a	0,213 _a
	64	0,222 _a	0,301 _a	0,312 _a	0,221 _a
	128	0,241 _b	0,218 _b	0,202 _b	0,123 _a

Letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$, teste de Tukey) do controle (cloranfenicol) na mesma concentração. Fonte: Elaborado pelo autor.

No ensaio de *S. aureus*, a nanopartícula de quitosana livre apresentou um MIC de 64 µg/mL, tanto em 24 h quanto em 48 h. Apesar de não apresentar diferença estatística em relação ao cloranfenicol na concentração de 16 µg/mL em 24 h, a mesma permitiu o crescimento em 48 h, demonstrando não ser a menor concentração capaz de inibir efetivamente o crescimento bacteriano.

O peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram MIC de 8 µg/mL, não apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao cloranfenicol. O peptídeo nanoencapsulado na concentração de 128 µg/mL foi melhor que o cloranfenicol, apresentando níveis de absorvância menores e maior inibição do crescimento bacteriano.

O peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) apenas na concentração de 64 µg/mL, em 24 h (Pág. 96). Nas demais concentrações não apresentaram diferença estatística significativa.

5.2.3 *Escherichia coli* ATCC 25922

A Tabela 7 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *E. coli* ATCC 25922.

Tabela 7: Valores médios de absorbância (O.D. 625 nm) obtidos nos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922 em 24 h e 48 h

Hora	Concentrações				
	testadas ($\mu\text{g/mL}$)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	0,379 _a	0,470 _a	0,265 _b	0,286 _a
	16	0,367 _a	0,520 _d	0,298 _c	0,199 _b
	32	0,284 _a	0,495 _d	0,391 _c	0,137 _b
	64	0,301 _a	0,207 _b	0,385 _c	0,218 _b
	128	0,389 _a	0,235 _b	0,289 _{bc}	0,291 _c
48	8	0,306 _a	0,493 _b	0,230 _a	0,261 _a
	16	0,287 _a	0,626 _b	0,316 _a	0,267 _a
	32	0,238 _a	0,650 _b	0,298 _a	0,226 _a
	64	0,243 _a	0,242 _a	0,321 _a	0,217 _a
	128	0,296 _a	0,244 _a	0,256 _a	0,334 _a

Letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$, teste de Tukey) do controle (cloranfenicol) na mesma concentração. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em *E. coli* o MIC da nanopartícula livre foi de 64 $\mu\text{g/mL}$, tanto em 24 h quanto em 48 h, superando o efeito do cloranfenicol em relação a inibição do crescimento bacteriano nas 24 h, destacando-se juntamente com o peptídeo nanoencapsulado (64 $\mu\text{g/mL}$), sendo os melhores tratamentos nessa concentração.

O peptídeo livre apresentou MIC de 8 $\mu\text{g/mL}$, superando o cloranfenicol nas concentrações de 8, 16 e 128 $\mu\text{g/mL}$, em 24 h. Nas concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um pequeno aumento na absorbância em 24 h, no entanto em 48 h se iguala novamente ao controle positivo.

O peptídeo nanoencapsulado apresentou MIC em 8 $\mu\text{g/mL}$. A partir da concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ apresentou efeito inibitório superior ao do cloranfenicol em

24 h, sendo considerado nas concentrações de 16 e 32 µg/mL o melhor tratamento dentre todos.

O peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações de 16, 32 e 64 µg/mL em 24 h (Págs.97-98), com o peptídeo nanoencapsulado apresentando maior efeito inibitório do crescimento bacteriano em relação ao peptídeo livre.

5.3 ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA

Após determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano nos ensaios antimicrobianos, realizou-se o ensaio para análise da ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h. Foram testadas apenas as concentrações a partir do MIC, descrito no tópico 5.2.

As análises basearam-se no crescimento bacteriano após 24 h de exposição aos tratamentos pelo ensaio antimicrobiano e reposição de meio com nutrientes essenciais para as bactérias. Se elas ainda estivessem viáveis voltariam a crescer, sendo observado um aumento da absorbância turbidimétrica. Se estivessem inviáveis não cresceriam mais, apresentando a mesma absorbância ou então valores ainda menores.

A determinação da caracterização da ação bactericida ou bacteriostática foi realizada pela comparação da análise da absorbância da placa exposta no dia anterior, bem como da diferença estatística ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento exposto na placa anterior (Págs. 99-107). Caso houvesse diferença estatística e observado crescimento, a ação seria bacteriostática. Caso não houvesse diferença estatística e não fosse observado crescimento, seria bactericida.

5.3.1 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Os resultados em relação a ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos para *S. epidermidis* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em *S. epidermidis* ATCC 12228

Hora	Concentração (µg/mL)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	Bacteriostático	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bacteriostático	-	Bactericida	Bacteriostático
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
48	8	Bacteriostático	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bacteriostático	-	Bactericida	Bacteriostático
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida

(-) Não corresponde a concentração mínima inibitória (MIC = 64 µg/mL) dos ensaios antimicrobianos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O cloranfenicol apresentou ação bactericida a partir da concentração de 32 µg/mL, em 24 h e em 48 h, nas menores concentrações (8 e 16 µg/mL) foi bacteriostático. Já o peptídeo livre apresentou ação bactericida em todas as concentrações, tanto em 24 h quanto em 48 h.

A nanopartícula livre apresentou ação bacteriostática, tanto em 24 h quanto em 48 h. O peptídeo nanoencapsulado apresentou o mesmo comportamento em 24 h e 48 h, ação bacteriostática nas concentrações de 8 e 16 µg/mL e bactericida nas demais.

5.3.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Os resultados em relação a ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos para *S. aureus* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em *S. aureus* ATCC 29213

Hora	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Tratamento			
		Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	Bacteriostático	-	Bactericida	Bactericida
	16	Bacteriostático	-	Bacteriostático	Bactericida
	32	Bacteriostático	-	Bacteriostático	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
48	8	Bacteriostático	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bacteriostático	-	Bacteriostático	Bacteriostático
	32	Bacteriostático	-	Bacteriostático	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático	Bactericida

(-) Não corresponde a concentração mínima inibitória (MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$) dos ensaios antimicrobianos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O cloranfenicol apresentou o mesmo comportamento em 24 h e 48 h, ação bacteriostática nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, nas demais ação bactericida.

A nanopartícula livre apresentou ação bacteriostática, tanto em 24 h quanto em 48 h. O peptídeo livre, em 24 h, foi bactericida nas concentrações de 8 e 128 $\mu\text{g/mL}$. Nas demais concentrações apresentou efeito bacteriostático. Em 48 h, apresentou ação bactericida apenas na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$, nas demais concentrações foi bacteriostático.

O peptídeo nanoencapsulado foi bactericida em todas as concentrações em 24 h. Em 48 h foi bacteriostático nas menores concentrações, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$, e bactericida nas demais.

5.3.3 *Escherichia coli* ATCC 25922

Os resultados em relação a ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos para *E. coli* estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 h e 48 h em *E. coli* ATCC 25922

Hora	Concentração (µg/mL)	Nanopartícula		Peptídeo	Peptídeo
		Cloranfenicol	Livre	Livre	Nanoencapsulado
24	8	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida
48	8	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida

(-) Não corresponde a concentração mínima inibitória (MIC = 64 µg/mL) dos ensaios antimicrobianos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O cloranfenicol e o peptídeo livre apresentaram efeito bactericida para *E. coli* em todas as concentrações.

O peptídeo nanoencapsulado apresentou ação bacteriostática apenas na menor concentração em 24 e 48 h, nas demais apresentou efeito bactericida.

A nanopartícula livre, em 24 h, apresentou efeito bacteriostático na concentração de 64 µg/mL e bactericida em 128 µg/mL. Em 48 h, ambas concentrações apresentaram efeito bactericida.

5.3.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA

A Tabela 11 apresenta, resumidamente, a concentração mínima bactericida (MBC) para cada bactéria, relacionada ao cloranfenicol, peptídeo Lrot3.6 livre e peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado.

Tabela 11: Concentração mínima bactericida (MBC) relacionada ao cloranfenicol, peptídeo Lrot3.6 livre e peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado para as estirpes: *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* 25922

Bactéria	Cloranfenicol	Peptídeo livre	Peptídeo Nanoencapsulado
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32 µg/mL	8 µg/mL	32 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	64 µg/mL	8 µg/mL	32 µg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *in vitro*

Para avaliar a toxicidade dos tratamentos realizou-se o ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de MTT, utilizando como modelo biológico células HEK293. As análises foram realizadas após 24 h e 48 h de exposição das células ao peptídeo livre, a nanopartícula livre e ao peptídeo nanoencapsulado, nas menores concentrações, 8 e 16 µg/mL. Foram testadas apenas essas concentrações, pois nos ensaios antimicrobianos o MIC para o peptídeo livre e para o peptídeo nanoencapsulado, para todas as bactérias, foi a concentração de 8 µg/mL e em ambas as concentrações, 8 e 16 µg/mL, houve efeito inibitório para todas as bactérias, independente se a ação foi bactericida ou bacteriostática.

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey, comparando-se todos os tratamentos ao controle negativo, correspondente apenas às células acrescidas de meio DMEM, próprio para o crescimento celular. Dessa forma, a proliferação celular das células expostas aos tratamentos foi comparada ao crescimento normal das células. Os resultados do MTT em 24 h e 48 h estão representados nas Figura 13 e Figura 14, respectivamente.

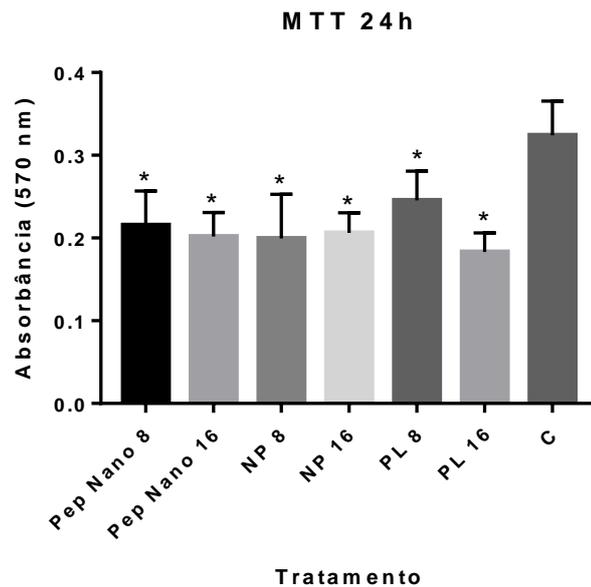


Figura 13: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 24 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

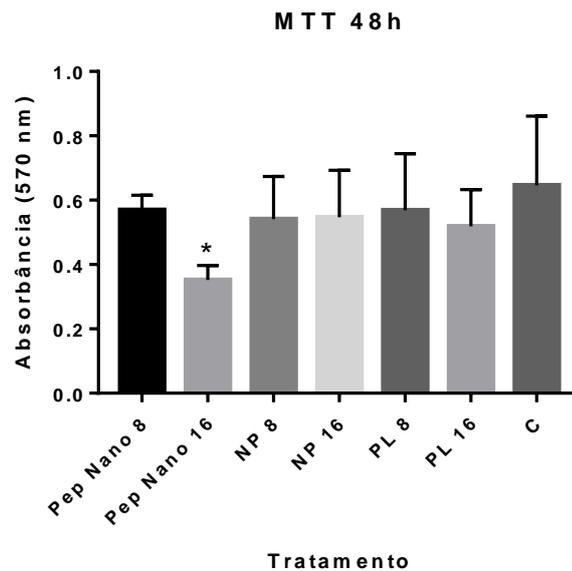


Figura 14: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 48 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi calculada a viabilidade celular a partir do controle como 100%, e assim se baseou o cálculo percentual de viabilidade dos demais grupos (Figura 15 e Figura 16).

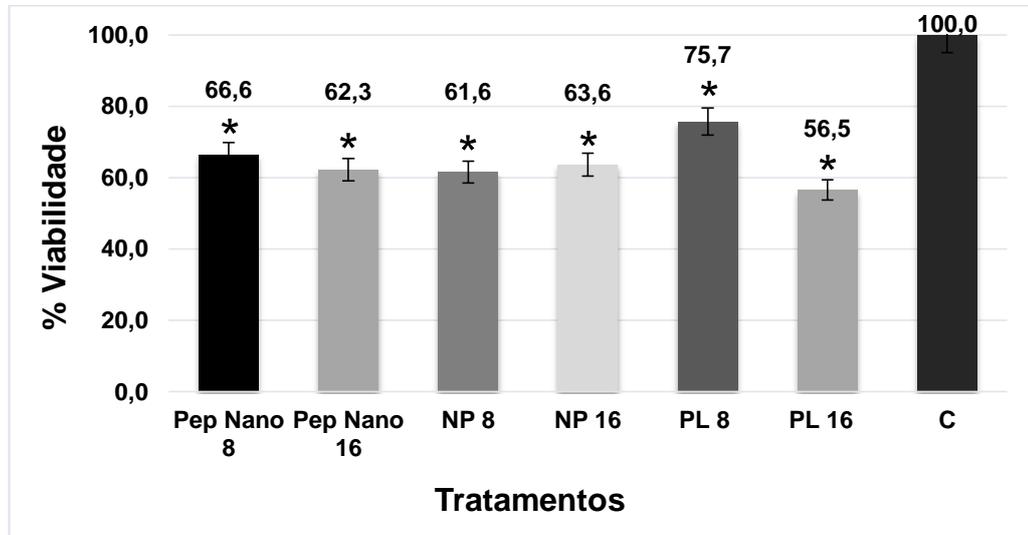


Figura 15: Viabilidade celular relativa às 24 h. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

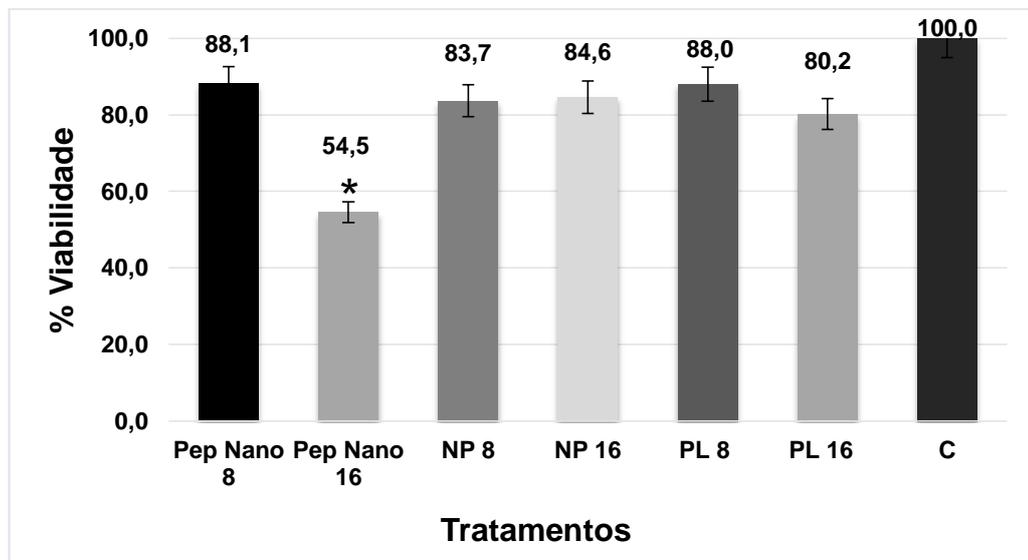


Figura 16: Viabilidade celular relativa às 48 h. Pep Nano 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; Pep Nano 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NP 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NP 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; C: controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises estatísticas em relação ao MTT demonstraram que em 24 h todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, demonstrando que em um primeiro momento todos influenciaram a proliferação normal de células HEK293. Já em 48 h, apenas o peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), demonstrando não alterarem o processo de proliferação celular em células HEK293.

Em relação a viabilidade celular, todos os tratamentos em 24 h e 48 h apresentaram viabilidade celular superior a 50%, sendo os valores de absorbância em 48 h maiores que 80% na maioria dos tratamentos.

6 DISCUSSÕES

É indispensável a busca por novos métodos terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas, principalmente que sejam capazes de contornar a resistência bacteriana. Nesse contexto, nanoformulações baseadas em AMPs oferecem boas perspectivas para o tratamento de infecções bacterianas (SANDRESCHI et al., 2016).

Trabalhos anteriores demonstraram o potencial uso da quitosana como polímero para encapsulação de peptídeos antimicrobianos. Piras et al. (2015a) desenvolveram uma nanoformulação contendo nanopartículas de quitosana para *delivery* do peptídeo antimicrobiano catiônico RSI, obtendo uma eficiência de encapsulação em torno de 98%. Além disso, a quitosana apresenta características vantajosas para ser utilizada como carreador de drogas, como ser biodegradável, biocompatível e, ademais, também apresenta efeito antimicrobiano, o que pode potencializar o efeito da nanoformulação, agindo de forma sinérgica (AHMED e ALJAEID, 2016).

A síntese de nanopartículas de quitosana realizada neste trabalho foi pelo método de gelificação iônica, que consiste na interação eletrostática (*cross-linking*) entre grupos amino da quitosana, carregados positivamente (NH_3^+), e grupos fosfato do TPP, carregados negativamente. O ponto isoelétrico da quitosana é 6,5, por isso seus grupamentos amino se protonam mais facilmente em meio ácido, conferindo assim carga positiva a molécula (AHMED e ALJAEID, 2016). Mattu et al. (2013) demonstraram que o pH das soluções de quitosana influenciam diretamente no tamanho e formação das nanoesferas. Quanto menor o valor do pH da quitosana, menor o tamanho da partícula, já que as cadeias de quitosana se tornam mais extensas e disponibilizam melhor o NH_3^+ para reticulação com o fosfato do TPP.

Piras et al. (2015a) constataram que para a encapsulação de peptídeos catiônicos em moléculas de quitosana deve-se aumentar o pH da mesma. O aumento do pH reduz a repulsão entre as cargas da quitosana e do peptídeo, ambos catiônicos. O peptídeo interage com os grupamentos CH_3 da quitosana, por interações hidrofóbicas, e o ajuste do pH da solução auxilia na neutralização das cargas, sendo aspecto fundamental para a manutenção da interação entre as moléculas. Dessa forma, estipulou-se, neste trabalho, o pH da solução de quitosana como 4.

Os aspectos anteriormente descritos são necessários para se promover uma efetiva encapsulação de peptídeos catiônicos em nanopartículas de quitosana. Neste trabalho obteve-se uma alta taxa de encapsulação, de 93,55%. A eficiência de encapsulação resultante deste trabalho foi em conformidade, e até mesmo superior, a outros trabalhos que também utilizaram nanopartículas de quitosana para encapsulação de AMPs. Piras et al. (2015a) obtiveram uma taxa de encapsulação de 98% com o peptídeo RSI, valor próximo ao alcançado neste trabalho. Por sua vez, Piras et al. (2015b) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 75% com o peptídeo temporin B, valor inferior ao obtido neste trabalho.

Segundo Singh e Lillard Jr. (2009), o tamanho e sua uniformidade de distribuição são parâmetros importantes quando se utiliza nanopartículas para entrega de drogas. Eles são capazes de determinar a distribuição *in vivo*, a toxicidade e a capacidade de direcionamento do nanossistema.

As nanopartículas podem ser sintetizadas de forma a se obter as características ideais de liberação para a melhor entrega ou encapsulamento do agente terapêutico. Entre essas características inclui-se o tamanho, que varia de acordo com a molécula a ser encapsulada (SINGH e LILLARD JR., 2009).

Em relação ao tamanho médio das nanopartículas livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 obtidas neste trabalho, 196 nm e 228 nm, respectivamente, foram semelhantes a resultados alcançados em outros trabalhos de nanoencapsulação de peptídeos antimicrobianos (WATER et al., 2015; PIRAS et al., 2015a; GARCIA-ORUE et al., 2016; CRUZ et al., 2017), em que o tamanho das partículas variou de cerca de 200 nm a 300 nm.

Além disso, obteve-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) de tamanho entre a nanopartícula de quitosana livre e nanoencapsulada com o peptídeo Lrot3.6. O aumento do tamanho da nanoesfera é um indicativo de encapsulação. Diversos trabalhos (KATAS et al., 2013; MATTU et al., 2013; PIRAS et al., 2015a; PIRAS et al., 2015b; ZHANG et al., 2016; DING et al., 2017) que utilizaram nanopartículas de quitosana para nanoencapsulação de proteínas e peptídeos obtiveram tamanhos menores para as nanopartículas livres em relação às nanoencapsuladas.

Masarudin et al. (2015) afirmam que o PDI é um valor utilizado para indicar a uniformidade de distribuição de tamanhos das nanopartículas, e seu valor varia de 0 a 1. Quanto maior o valor, maior a heterogeneidade de tamanhos da amostra. Os valores obtidos neste trabalho para o PDI foram valores intermediários, 0,356 para a

nanopartícula de quitosana livre e 0,398 para as nanopartículas nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6. Dessa forma, a análise dos valores dos índices de polidispersão (PDI) das suspensões de nanopartículas sintetizadas neste trabalho indicam que elas foram polidispersas, apresentando característica bimodal.

O potencial Zeta corresponde a carga superficial das partículas e está relacionado a manutenção da estabilidade das suspensões coloidais (AHMED e ALJAEID, 2016). Potenciais Zeta maiores ou menores que +30 mV e -30 mV são consideradas suspensões estáveis e estabilizadas por suas repulsões eletrostáticas, evitando assim a aglomeração (KASPAR et al., 2013). Os valores de potencial Zeta obtidos para as nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 foram maiores que +30 mV, indicando que as suspensões de nanopartículas de quitosana formadas foram estáveis. Já o peptídeo Lrot3.6 livre, apresentou potencial Zeta de +18,7, indicando, dessa forma, ser uma molécula instável.

Observou-se que os potenciais Zeta das nanopartículas de quitosana livres e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6 não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao da nanopartícula de quitosana livre. Esse resultado difere daqueles alcançados por Piras et al. (2015a) e Piras et al. (2015b), que após a encapsulação de peptídeos antimicrobianos utilizando nanopartículas de quitosana obtiveram valores menores de potencial Zeta, estatisticamente diferentes. Piras et al. (2015) sugerem que essa mudança de valor seja devida ao rearranjo conformacional e de cargas entre o AMP e as nanopartículas de quitosana. O peptídeo interage com os grupamentos CH_3 da quitosana, por interações hidrofóbicas, e o ajuste do pH da solução de quitosana auxilia na neutralização das cargas. Nos referidos trabalhos, o pH da solução de quitosana foi igual a 5, diferente deste trabalho que foi atribuído o pH 4. Com o pH maior há uma maior neutralização das cargas e diferente arranjo da molécula de quitosana durante o processo de gelificação iônica. Diferentes arranjos da quitosana promoverão diferentes formas de interação entre as nanopartículas e o AMP, o que pode explicar o resultado obtido neste trabalho.

Em relação aos ensaios antimicrobianos, a nanopartícula de quitosana livre apresentou inibição do crescimento de todas as bactérias apenas nas maiores concentrações, de 64 e 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Apenas na *E. coli* apresentou ação bactericida, sendo considerada na concentração de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em 24 h, um dos melhores tratamentos, com menores níveis de absorbância. Em *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram ação bacteriostática. Dyvia et al. (2017) afirmam que para a ação

antimicrobiana, a quitosana se liga a porções ácidas nos fosfolipídios da parede celular bacteriana, causando ruptura da célula e alterando a permeabilidade da membrana para a entrada de substâncias no microrganismo. A quitosana também pode entrar na célula, se ligar ao DNA e causar inibição da replicação celular, apresentando, dessa forma, ação bacteriostática sobre as bactérias.

Segundo Kong et al. (2010) a atividade antimicrobiana da quitosana em bactérias gram-positivas difere da ação em gram-negativas, devido a diferença relacionada a composição de suas superfícies celulares. Em gram-positivas a quitosana se liga ao LTA e em gram-negativas se liga ao LPS. Chung et al. (2004) perceberam que a carga negativa das bactérias gram-negativas era superior à carga das gram-positivas, levando a mais quitosana adsorvida e maior efeito inibitório contra gram-negativas. Essas proposições podem ser realizadas em relação ao efeito das nanopartículas de quitosana neste trabalho. Como a nanopartícula livre atuou decrescendo seus níveis de absorvância à medida que aumentava sua concentração, notou-se neste caso uma relação dose-resposta. Isso pode ter acontecido pois, com o aumento da concentração tem-se o aumento da quantidade de nanopartículas, e, conseqüentemente, há o aumento de grupamentos amino para interagir com os LPS da membrana gram-negativa, impedindo a entrada de substâncias na célula. Isso explica o efeito bactericida observado apenas em *E. coli*, única bactéria gram-negativa testada.

O peptídeo Lrot3.6 livre, em *E. coli* e *S. epidermidis*, apresentou ação bactericida em todas as concentrações, apresentando ação bacteriostática apenas em *S. aureus*. Observou-se também que houveram concentrações intermediárias em *E. coli* e *S. epidermidis* que apresentaram aumento da absorvância turbidimétrica e conseqüente diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao cloranfenicol, permitindo o crescimento bacteriano. Isso pode ser explicado devido a hidrofobicidade do peptídeo Lrot3.6.

Yin et al. (2012) demonstraram que peptídeos com a presença de muitos aminoácidos hidrofóbicos em sua composição possuem uma maior tendência a agregação e auto-associação do que aqueles com menos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Essa agregação pode comprometer a ação antimicrobiana dos AMPs, por não permitir a exposição da porção catiônica dos mesmos, que é fundamental para a interação dos peptídeos com a membrana e conseqüente mecanismo de ação. Nas menores concentrações foi percebido efeito inibitório pois há uma menor

quantidade de peptídeos, dessa forma supõe-se uma menor probabilidade de associação. Em contrapartida, maiores concentrações também favoreceram os efeitos inibitórios, pois há uma grande quantidade de peptídeos que podem recobrir a membrana e agir bem mais rapidamente em relação a ruptura da membrana celular. Como explica o modelo de tapete, em que os peptídeos interagem eletrostaticamente com a célula e inserem-se paralelamente na superfície da membrana como um tapete. Micelas peptídicas complexadas com componentes da membrana (LTA para gram-negativas e LPS para gram-negativas) agem como um detergente que perturba a estrutura da bicamada lipídica. Como resultado, há a formação de poros na membrana, causando lise abrupta de bactérias, e consequente efeito bactericida (KANG et al., 2014). No entanto, testes adicionais devem ser realizados para afirmar categoricamente essa hipótese.

O peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado, para *S. epidermidis*, apresentou um MIC de 8 µg/mL e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do peptídeo livre na concentração de 32 µg/mL, em que o peptídeo livre não apresentou inibição do crescimento bacteriano e o peptídeo nanoencapsulado demonstrou inibição do crescimento bacteriano. Isso pode ser explicado devido a liberação prolongada do peptídeo, o que também explica sua ação bacteriostática em 8 e 16 µg/mL. O perfil de liberação depende da solubilidade e difusão na matriz polimérica da quitosana. Além disso, devido ao fato das nanopartículas deste trabalho se tratarem de polieletrólitos, a taxa de liberação pode ser influenciada por interações iônicas entre o peptídeo Lrot3.6 e compostos do meio de cultura dos testes *in vitro* (SINGH e LILLARD JR., 2009).

Em *S. aureus*, o peptídeo nanoencapsulado não diferiu estatisticamente do peptídeo livre na maioria das concentrações. No entanto, apresentou ação bactericida em todas as concentrações em 24 h, e a partir de 32 µg/mL em 48 h, em detrimento a ação bacteriostática do peptídeo Lrot3.6 livre. Isso é um indício de liberação prolongada do peptídeo, com liberação de quantidades suficientes de peptídeo para ação antimicrobiana ao longo do tempo. A ação bactericida é importante em casos específicos, como em casos graves de bacteremia por *S. aureus* (KASPER e FAUCI, 2015).

Em relação a *E. coli*, a nanoencapsulação demonstrou otimização dos efeitos antimicrobianos, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao peptídeo livre nas concentrações de 16, 32 e 64 µg/mL em 24 h, com o peptídeo nanoencapsulado apresentando maior efeito inibitório do crescimento bacteriano.

Esses resultados corroboram com outros trabalhos de AMPs nanoencapsulados, como Water et al. (2015) e Cruz et al. (2017), em que o peptídeo nanoencapsulado foi mais eficiente que o peptídeo livre. Chung et al. (2004) demonstrou em seu estudo que as bactérias gram-negativas se sobressaem em relação aos efeitos antimicrobianos da quitosana, devido a maior carga negativa e, por isso, maior facilidade de apresentarem quitosana adsorvida em sua superfície. Esse fato, somado ao efeito antimicrobiano do peptídeo Lrot3.6, indica um provável efeito sinérgico entre a quitosana e o AMP, e explica a otimização dos efeitos antimicrobianos. Apresentou ação bacteriostática apenas em 8 µg/mL, talvez por não ter liberado a quantidade ideal de peptídeo necessária a ação bactericida nas 48 h analisadas.

Os primeiros resultados do peptídeo Lrot3.6 nanoestruturado em nanopartículas de quitosana em relação a *E. coli* mostraram-se satisfatórios, demonstrando ser uma potencial nanoformulação para combate a essa bactéria, que está na lista de bactérias em crise em relação a resistência bacteriana, e necessidade de produção e desenvolvimento de novos medicamentos (WHO, 2017).

Quanto ao efeito citotóxico em células HEK293, percebeu-se que nas primeiras 24 h de exposição todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$), demonstrando que em um primeiro momento todos os tratamentos promoveram a diminuição da proliferação celular. Em 24 h, mesmo apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle, as células apresentaram viabilidade celular próxima ou superior a 60% em todos os tratamentos. Em relação a nanopartícula livre e peptídeos nanoencapsulados, o pH inicial estava ácido, 5,6, o que pode explicar essa diminuição da proliferação celular.

Em 48 h, apenas o peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL diferiu estatisticamente do controle ($p < 0,05$), os demais grupos não apresentaram diferença estatística, com viabilidade superior a 80%. Ao final das 48 h o pH dos tratamentos subiu de 5,6 para 8, tornando-se básico. Junior (2010) afirma que quando as células vão iniciar o processo de proliferação celular, caracteristicamente o pH citoplasmático torna-se alcalino. Dessa forma, o aumento do pH das soluções e visível aumento da viabilidade em 48 h demonstram que os tratamentos não foram citotóxicos, permitindo a proliferação normal das células em 48 h. Nas primeiras 24 h estavam iniciando o aumento do pH e rearranjo das condições fisiológicas ideais para a proliferação celular, dessa forma demonstraram um decréscimo na viabilidade celular, no entanto, ainda acima de 50% em todos os

tratamentos. No entanto, teste adicionais devem ser realizados para análise do efeito dos tampões utilizados tanto no MTT quanto ao tampão de diluição do peptídeo.

Os resultados obtidos em relação a formulação do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado em nanopartículas de quitosana, produzida neste trabalho, demonstraram que a nanoencapsulação de AMPs pode ser uma alternativa promissora para o combate à infecções bacterianas. No geral, apesar do peptídeo Lrot3.6 apresentar maiores MBCs em relação ao peptídeo Lrot3.6 livre, percebeu-se com os ensaios antimicrobianos que a interação entre o AMP e a nanoesfera parece ter diminuído a agregação dos peptídeos, visto que a nanoformulação apresentou atividade em concentrações intermediárias em detrimento ao peptídeo livre (*S. epidermidis*, nas concentrações de 32 e 64 µg/mL, em 24 h e 48 h, e *E. coli* nas concentrações de 32 e 64 µg/mL, em 24 h), demonstrando uma vantagem da nanoformulação em relação ao peptídeo Lrot3.6 livre.

Corroborando com Yadav et al. (2011), a formulação produzida neste trabalho apresentou diversas vantagens em relação aos medicamentos usuais: amplo espectro de ação; garantiram a atividade antimicrobiana do peptídeo Lrot3.6 durante os ensaios; diminuiu a agregação do peptídeo; permitiu uma liberação prolongada; indicou a ocorrência de efeito sinérgico com a quitosana; e não foi citotóxico, na menor concentração (8 µg/mL) após 48 h de exposição.

Além dessas características, observadas nos bioensaios *in vitro* realizados neste trabalho, sabe-se que existem muitas limitações em relação ao uso de AMPs como formulações terapêuticas, a maioria relacionada a sua biodisponibilidade. Entre elas está sua fraca estabilidade, sujeitos a ocorrência de hidrólise e proteólise, inativação em alguns fluidos biológicos e curta vida útil no sistema circulatório (BRANDELLI, 2012; SANDRESCHI et al., 2016). A nanoencapsulação de AMPs permite a superação desses problemas relacionados a utilização dessas moléculas sozinhas *in vivo*. Dessa forma, o nanossistema desenvolvido neste trabalho poderá ser de extrema importância para mais ensaios *in vitro* e futuros ensaios *in vivo*, uma vez que o peptídeo Lrot3.6 livre pode estar sujeito a degradação enzimática, baixa permeabilidade em tecidos e fraca estabilidade, estando sujeito a agregação e auto-associação, e a encapsulação permitirá a proteção da molécula, sendo, possivelmente, uma das principais vantagens da encapsulação do peptídeo *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

O nanossistema produzido neste trabalho demonstrou ser uma promissora alternativa para melhoria da atividade de AMPs, segundo resultados alcançados em ensaios *in vitro*.

Os parâmetros utilizados para a síntese de nanopartículas de quitosana neste trabalho foram bem estabelecidos, conseguindo-se partículas em conformidade com a literatura, cerca de 200 nm, potencial Zeta maiores que +30 mV e uma alta taxa de encapsulação, de 93,55%.

Em relação aos ensaios antimicrobianos, o peptídeo Lrot3.6 livre demonstrou ser muito eficiente, com MIC de 8 µg/mL para todas as bactérias testadas. A nanopartícula livre também apresentou efeito antimicrobiano, com MIC de 64 µg/mL para todas bactérias testadas.

A nanoencapsulação do peptídeo favoreceu principalmente a inibição do crescimento de *E. coli*, bactéria em que o tratamento mais se destacou e demonstrou otimização do efeito antimicrobiano em relação ao peptídeo livre e possível efeito sinérgico entre a quitosana e o peptídeo Lrot3.6. Também favoreceu a ação contra *S. aureus*, em que foi possível perceber ação bactericida em detrimento a ação bacteriostática do peptídeo livre em algumas concentrações. No geral, observou-se também a liberação prolongada do peptídeo em até 48 h.

O nanossistema não foi citotóxico após 48 h de exposição, e nas concentrações em que apresentou MIC nos ensaios antimicrobianos, 8 µg/mL, tanto o peptídeo livre quanto o nanoencapsulado apresentaram quase 90% de viabilidade, demonstrando ser uma promissora formulação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

8 PERSPECTIVAS

Os primeiros resultados em relação a nanoencapsulação do peptídeo Lrot3.6 em nanoesferas de quitosana demonstraram-se satisfatórios, apresentando atividade a baixas concentrações, efeito prolongado e baixa toxicidade. Dessa forma, torna-se importante a continuação dos estudos, com mais ensaios *in vitro* e, principalmente, com ensaios *in vivo* para determinação da dinâmica de interação dessa nanoformulação com os fluidos biológicos.

Além disso, devem ser realizados estudos para a melhor compreensão da interação entre o peptídeo Lrot3.6 e as nanopartículas de quitosana, utilizando modelagem computacional, para que haja, dessa forma, a possibilidade de produção de uma nanoformulação biocompatível para o combate à infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 10, p. 483-507, 2016.

ANVISA. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília, 2013.

ANVISA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2016-2020). Brasília, 2016.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 1543-1575, 2013.

BATONI, G.; MAISETTA, G.; BRANCATISANO, F. L.; ESIN, S.; CAMPA, M. Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits. *Current Medicinal Chemistry*, v.18, p. 256-279, 2011.

BAUM, H. V.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, p. 503–511, 2005.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.

BHATTACHARYYA, A.; MUKHERJEE, D.; MISHRA, R.; KUNDU, P. P. Preparation of polyurethane – alginate/chitosan core shell nanoparticles for the purpose of oral insulin delivery. *European Polymer Journal*, 2017.

BRANDELLI, A. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 731-741, 2012.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 238-250, 2005.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014. 823p.

CALVO, P.; REMUÑAN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, n.1, p. 125-132, 1997.

CHUNG, Y.C., SU, Y.P., CHEN, C.C., JIA, G., WANG, H.L., WU, J.C.G., LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 25, p. 932–936, 2004.

CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 10rd. Wayne, PA.

CRUZ, J.; FLÓREZ, J.; TORRES, R.; URQUIZA, M.; GUTIÉRREZ, J. A.; GUZMÁN, F.; ORTIZ, C. C. Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, v. 28, 2017.

DING, R.; XIE, F.; HU, Y.; FU, S.; WU, J.; FAN, J.; HE, W.; HE, Y.; YANG, L.; LIN, S.; WEN, Q. Preparation of endostatin-loaded chitosan nanoparticles and evaluation of the antitumor effect of such nanoparticles on the Lewis lung cancer model. *Drug Delivery*, v. 24, n. 1, p. 300–308, 2017.

DYVIA, K.; VIJAYAN, S.; GEORGE, T. K.; JISHA, M. S. Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity. *Fibers and Polymers*, v.18, n.2, p. 221-230, 2017.

DU, W.; NIU, S. S.; XU, Y.; XU, Z.; FAN, C. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, v.75, p. 385–389, 2009.

DUBEY, S.; AVADHANI, K.; MUTALIK, S.; SIVADASAN, S. M.; MAITI, B.; GIRISHA, S. K.; VENUGOPAL, M. N.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, O.; KARUNASAGAR, I.; MUNANG'ANDU, H. M. *Edwardsiella tarda* OmpA Encapsulated in Chitosan Nanoparticles Shows Superior Protection over Inactivated Whole Cell Vaccine in Orally Vaccinated Fringed-Lipped Peninsula Carp (*Labeo fimbriatus*). *Vaccines*, v. 40, n. 4, p. 1-14, 2016.

DURAI, R.; NG P. C. H.; HOQUE, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Update. AORN Journal, v. 91, n. 5, p. 599-609, 2010.

DÚRAN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. International Journal of Food Science and Technology, v. 48, p. 1127–1134, 2013.

EDSON, J. A.; KWON, Y. J. Design, challenge, and promise of stimuli-responsive nanoantibiotics. Nano Convergence, v. 3, n. 26, p. 1-13, 2016.

EIFF, C. V.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infectious Diseases, v. 2, p. 677-685, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Official Journal of the European Union, L 275/38, de 20/10/2011.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, China, v. 90, p. 21-27, 2012.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 1, n. 1, p. 1-32, 2012.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. ACS Nano, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. Revista Medicina (São Paulo), v. 87, n. 4, p. 272-276, 2008.

FRÈRE, J.; RIGALI, S. The alarming increase in antibiotic resistant bacteria. Drug Target Review, v. 3, 2016.

GALLO, R. L.; MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; ZAIYOU, M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. Journal Allergy Clinical Immunology, v. 110, n. 6, p. 823-831, 2002.

GARCIA-ORUE, I.; GAINZA, G.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; AGUIRRE, J. J.; PEDRAZ, J. L.; IGARTUA, M.; HERNANDEZ, M. H. LL37 loaded nanostructured lipid carriers (NLC): A new strategy for the topical treatment of chronic wounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; d'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GORDON, Y. J.; ROMANOWSKI, E. G.; MCDERMOTT, A. M. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Current Eye Research*, v. 30, p. 505–515, 2005.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALE, J. D. F.; HANCOCK, R. E. W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 5, n. 6, p. 951-959, 2007.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ Journals*, v. 3, n. 17, p. 657-660, 1998.

HOLDRICH, M.; LIU, S.; EPE, M.; LAMMERHOFER, M. Taylor dispersion analysis, resonant mass measurement and bioactivity of pepsin-coated gold nanoparticles. *Talanta*, v. 167, p. 67-74, 2017.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ Journals*, v. 352, p. 1-19, 2016.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression. *Journal of Dermatological Science*, v. 42, p. 203-214, 2006.

JIANG, W.; SAXENA, A.; SONG, B.; WARD, B. B.; BEVERIDGE, T. J.; MYNENI, S. C. B. Elucidation of functional groups on Gram-Positive and Gram-Negative bacterial surfaces using Infrared Spectroscopy. *American Chemical Society*, v. 20, p. 11433-11442, 2004.

JUNG, B.; KIM, C.; CHOI, K.; LEE, Y. M.; KIM, J. Preparation of Amphiphilic Chitosan and Their Antimicrobial Activities. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 72, p. 1713–1719, 1999.

JUNIOR, J. F. Carcinoma Neuroendócrino Metastático do Pâncreas – Relato de Caso e Revisão da Literatura. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v. 7, n. 21, p. 24-30, 2010.

KANG, S. J.; PARK, S. J.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B. J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 12, n. 12, p. 1477-1486, 2014.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 123-140, 2004.

KASPAR, O.; JAKUBEC, M.; STEPANEK, F. Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. *Powder Technology*, v. 240, p. 31-40, 2013.

KASPER, D. L.; FAUCI, A. S. *Doenças infecciosas de Harrison*. Porto Alegre: AMGH Editora, 2015. 1165 p.

KATAS, H.; RAJA, M. A. G.; LAM, K. L. Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA. *International Journal of Biomaterials*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 423-435, 2010.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, p. 51–63, 2010.

KORB, A.; NAZARENO, E. R.; MENDONÇA, F. A.; DALSENTER, P. R. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2013.

LAABEI M.; UHLEMANN. A. C.; LOWY F. D.; AUSTIN E. D.; YOKOYAMA M.; OUADI K.; FEIL H.; THORPE H. A.; WILLIAMS B.; PERKINS M.; PEACOCK S. J.; CLARKE, S. R.; DORDEL, J.; HOLDEN. M.; VOTINTSEVA, A. A.; BOWDEN, R.; CROOK, D.

W.; YOUNG, B. C.; WILSON, D. J.; RECKER, M.; MASSEY, R. C. Evolutionary Trade-Offs Underlie the Multifaceted Virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLOS Biology*, v. 13, n. 9, 2015.

LADAVIERE, L. B. C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2016.

LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer*, v. 120, p. 2527-2537, 2007.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p.1265-1273, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADIGAN, M. T.; JOHN, MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MALVEZZI, C. K. Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo de extratos brutos e suas associações. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Lorena.

MASARUDIN, M. J.; CUTTS, S. M.; EVISON, B. J.; PHILLIPS, D. R.; PIGRAM, P. J. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. *Nanotechnology, Science and Applications*, v. 8, p. 67-80, 2015.

MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan Nanoparticles as Therapeutic Protein Nanocarriers: the Effect of pH on Particle Formation and Encapsulation Efficiency. *Polymer composites*, p. 1-8, 2013.

MOREIRA, C. G.; PALMER, K.; WHITELEY, M.; SIRCILI, M. P.; TRABULSI, L. R.; CASTRO, A. F. P.; SPERANDIO, V. Bundle-Forming Pili and EspA are involved in biofilm formation by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 11, p. 3952–3961, 2006.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUSA, S. A.; BHARALI, D. J. Nanotechnology-Based Detection and Targeted Therapy in Cancer: Nano-Bio Paradigms and Applications. *Cancers*, v. 3, p. 2888-2903, 2011.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

MUTHU, M. S.; LEONG, D. T.; MEI, L.; FENG, S. S. Nanotheranostics - Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics. *Theranostics*, v. 4, n. 6, p. 660-677, 2014.

NAMVAR, A. E.; BASTARAHANG, S.; ABBASI, N.; GHEHI, G. S.; FARHADBAKHTIARIAN, S.; AREZI, P.; HOSSEINI, M.; BARAVATI, S. Z.; JOKAR, Z.; CHERMAHIN, S. G. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control*, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2014.
NARAYANA, J. L.; CHEN, J. Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides*, v. 72, p. 88-94, 2015.

NARAYANAN, K.; SUBRAHMANYAM, V. M.; RAO, J. V. A Fractional Factorial Design to Study the Effect of Process Variables on the Preparation of Hyaluronidase Loaded PLGA Nanoparticles. *Enzyme Research*, v. 14, p. 1-10, 2014.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NGUYEN, T. L.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, p. 582-587, 2001.

OLIVEIRA, A. C.; DAMASCENO, Q. S.; RIBEIRO, S. M. C. P. Infecções relacionadas à Assistência em Saúde: desafios para a prevenção e controle. *Revista Mineira de Enfermagem*, v.13, n. 3, p. 445-450, 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 555-567, 2009.

PIRAS, A. M.; SANDRESCHI, S.; MAISETTA, G.; ESIN, S.; BATONI, G.; CHIELLINI, F. Chitosan Nanoparticles for the Linear Release of Model Cationic Peptide. *Journal of Pharmacy Research*, 2015a.

PIRAS, A. M.; SANDRESCHI, S.; MAISETTA, G.; GAZZARI, M.; ESIN, S.; BATONI, G.; CHIELLINI, F. Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity *in vitro* against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers Microbiology*, v. 6, 2015b.

RAAD, I.; ALRAHWAN, A.; ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, p. 1182–1187, 1998.

RAJITHA, P.; GOPINATH, D.; BISWAS, R.; SABITHA, M.; JAYAKUMAR, R. Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CÈSARO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013.

RAO, P. S.; BAJAJ, R. K.; MANN, B.; ARORA, S.; TOMAR, S. K. Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 10, p. 3834-3843, 2016.

RATTI, R.P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 9-16, 2009.

ROJAS-AGUIRRE, Y.; AGUADO-CASTREJÓN, K.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química*, v. 27, p. 286-291, 2016.

SALTER, M. A.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 159–167, 2000.

SANDRESCHI; PIRAS; BATONI; CHIELLINI. Perspectives on polymeric nanostructures for the therapeutic application of antimicrobial peptides. *Nanomedicine*, v. 11, n.13, p. 1729–1744, 2016.

SANTOS, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; SILVA, R. M.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo da Saúde*, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SANTOS, A.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J. M.; RODRIGUES, S. M.; RIBEIRO, D. M.; PRIOR, J. V. Perspectivas de utilização de nanomateriais em nanodiagnóstico. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, vol. 3, n. 1, p. 3-14, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*, v. 36, p. 308–314, 2012.

SINGH, R.; LILLARD JR., J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 3, p. 215-223, 2009.

SOARES, G. M. S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M. CORTELLI, S. C.; DUARTE, P. M.; FERES, M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*, v. 20, n. 20, p. 295-309, 2012.

TAJU, G.; KUMAR, D. V.; MAJEED, S. A.; VIMAL, S.; TAMIZHVANAN, S.; KUMAR, S. S., SIVAKUMAR, S.; BASHA, A. N.; HARIBABU, P.; KANNABIRAN, K.; HAMMED, A. S. S. Delivery of viral recombinant VP28 protein using chitosan tripolyphosphate nanoparticles to protect the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* from white spot syndrome virus infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 1-11, 2017.

TAVARES, L. S. T. Desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos a partir do transcriptoma foliar de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v. 119, S3–S10, 2006.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; JUNIOR, V. G. F. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

VANDECANDELAERE, I.; NIEUWERBURGH, F. V.; DEFORCE, D.; COENYE, T. Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, 2017.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

WATER, J. J.; SMART, S.; FRANZIK, H.; FOGED C.; NIELSEN, H. M. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015.

WHO. Health care-associated infections. 2014.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, Discovery, and development of new antibiotics. 2017.

WEESE, J. S.; GIGUÈRE, S.; GUARDABASSI, L.; MORLEY, P. S.; PAPICH, M.; RICCIUTO, D. R.; SYKES, J. E. ACVIM Consensus Statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, p. 487-498, 2015.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, v. 32, p. 173–187, 2011.

YIN, L. M.; EDWARDS, M. A.; LI, J.; YIP, C. M.; DEBER, C. M. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 10, p. 7738–7745, 2012.

YOUSEFI, M.; DADASHPOUR, M.; HEJAZI, M.; HASANZADEH, M.; BEHNAM, B.; DE LA GUARDIA, M.; SHADJOU, N.; MOKHTARZADEH, A. Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria. *Materials Science and Engineering*, v. 74, p. 568-581, 2017.

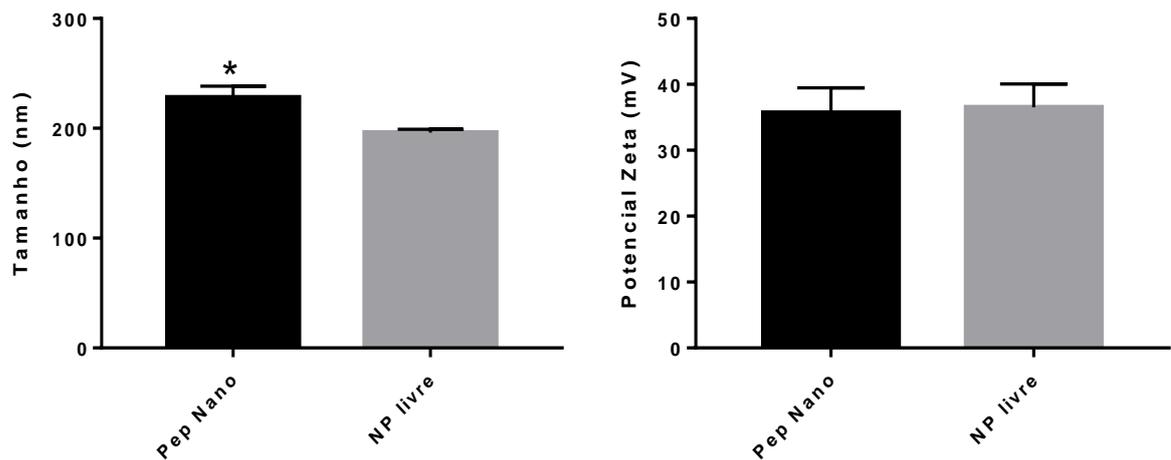
ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; EL HALAL, L. M.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, L. M.; CASTRO, L. A. S.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HÉRNANDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT, Food Science and Technology*, v. 59, p. 841-848, 2014.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, v. 4, p. 66-80, 2009.

ZHANG, H.; JUNG, J.; ZHAO, Y. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins–Zn complex loaded-chitosan nanoparticles of different particle sizes. *Carbohydrate Polymers*, v. 137, p. 82-91, 2016.

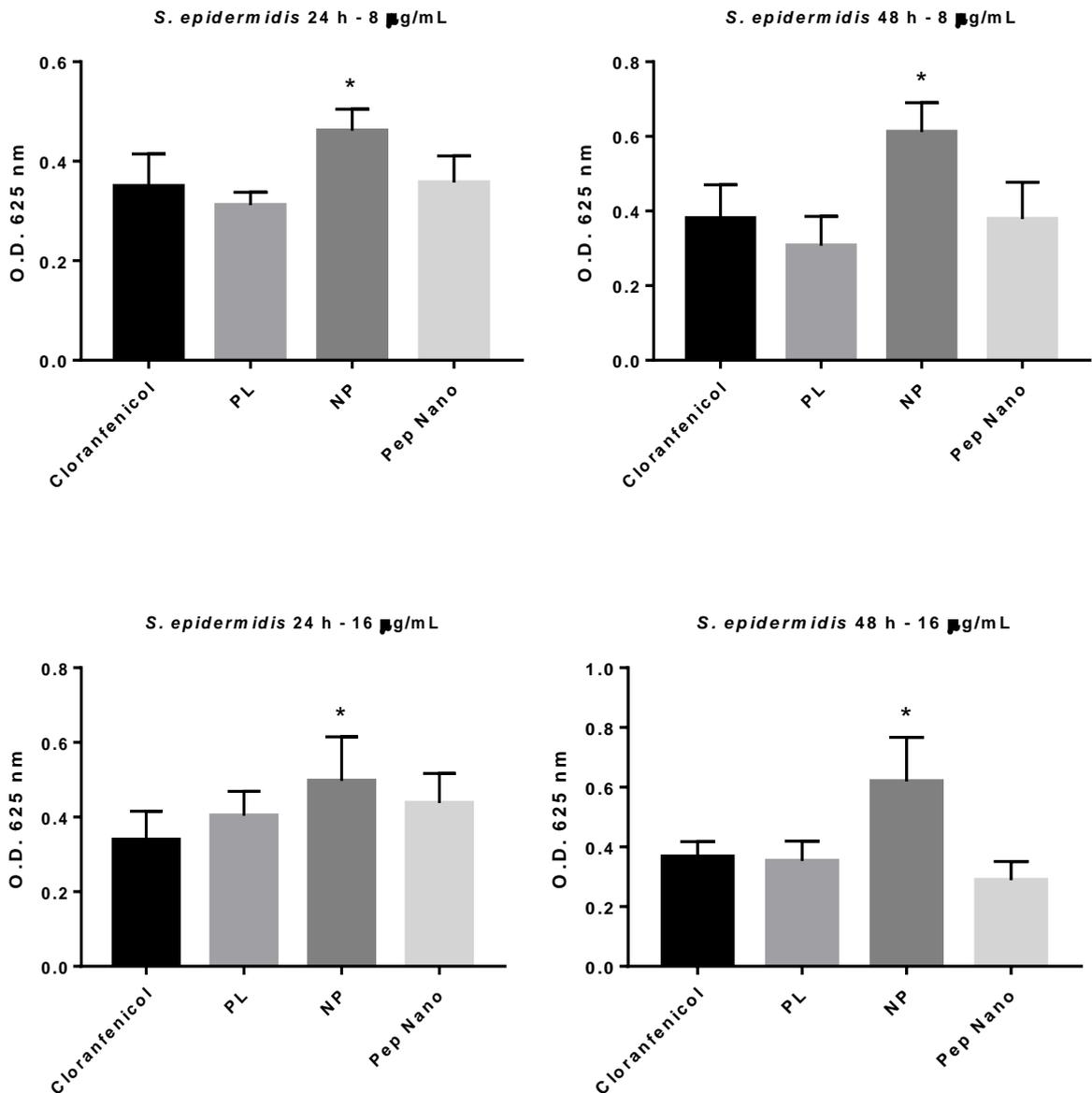
APÊNDICES

APÊNDICE A – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas ao tamanho e potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livre e estruturadas com o peptídeo Lrot3.6.

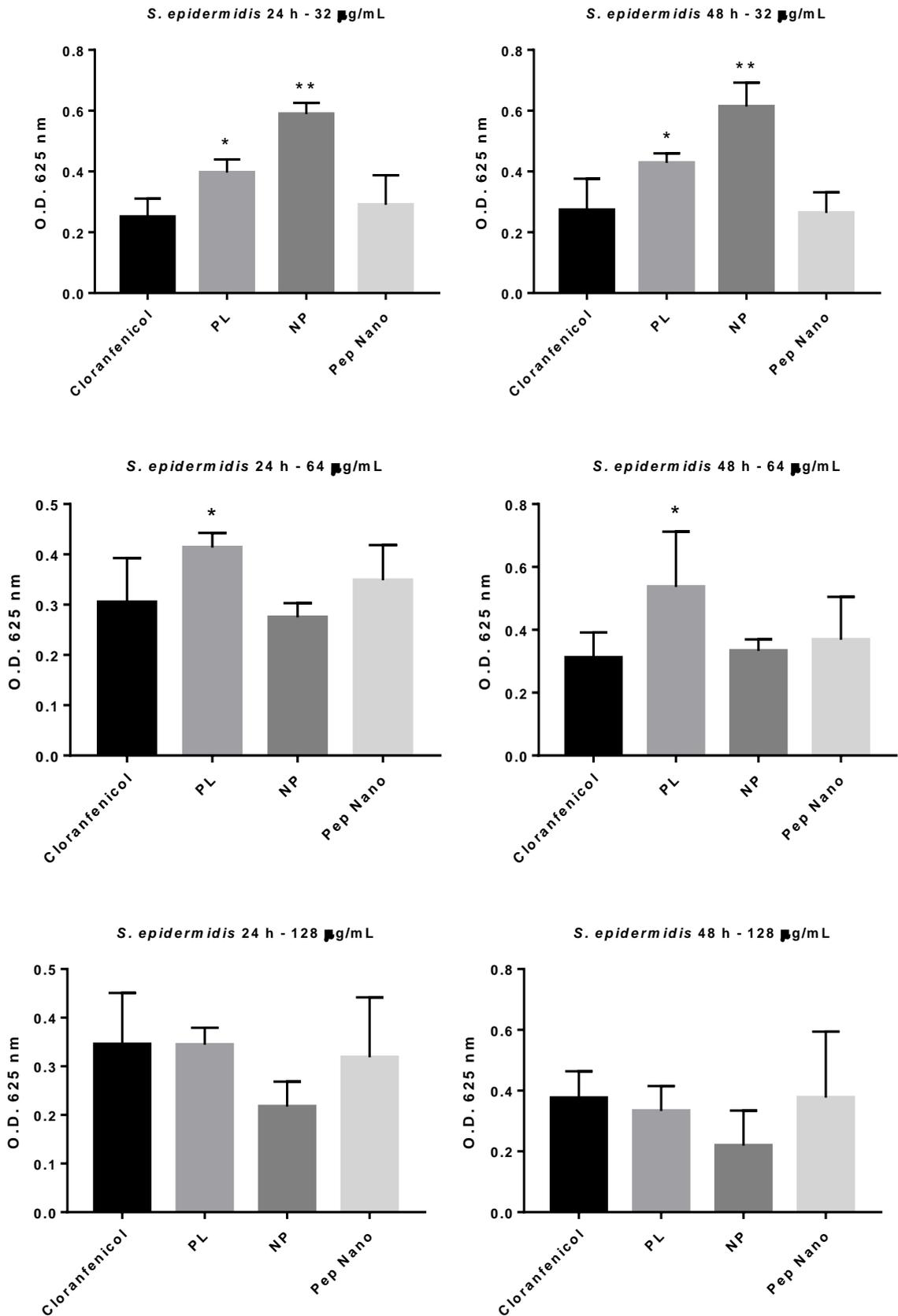


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste t . Pep Nano: Peptídeo Nanoencapsulado. NP livre: Nanopartícula de quitosana livre.

APÊNDICE B – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.

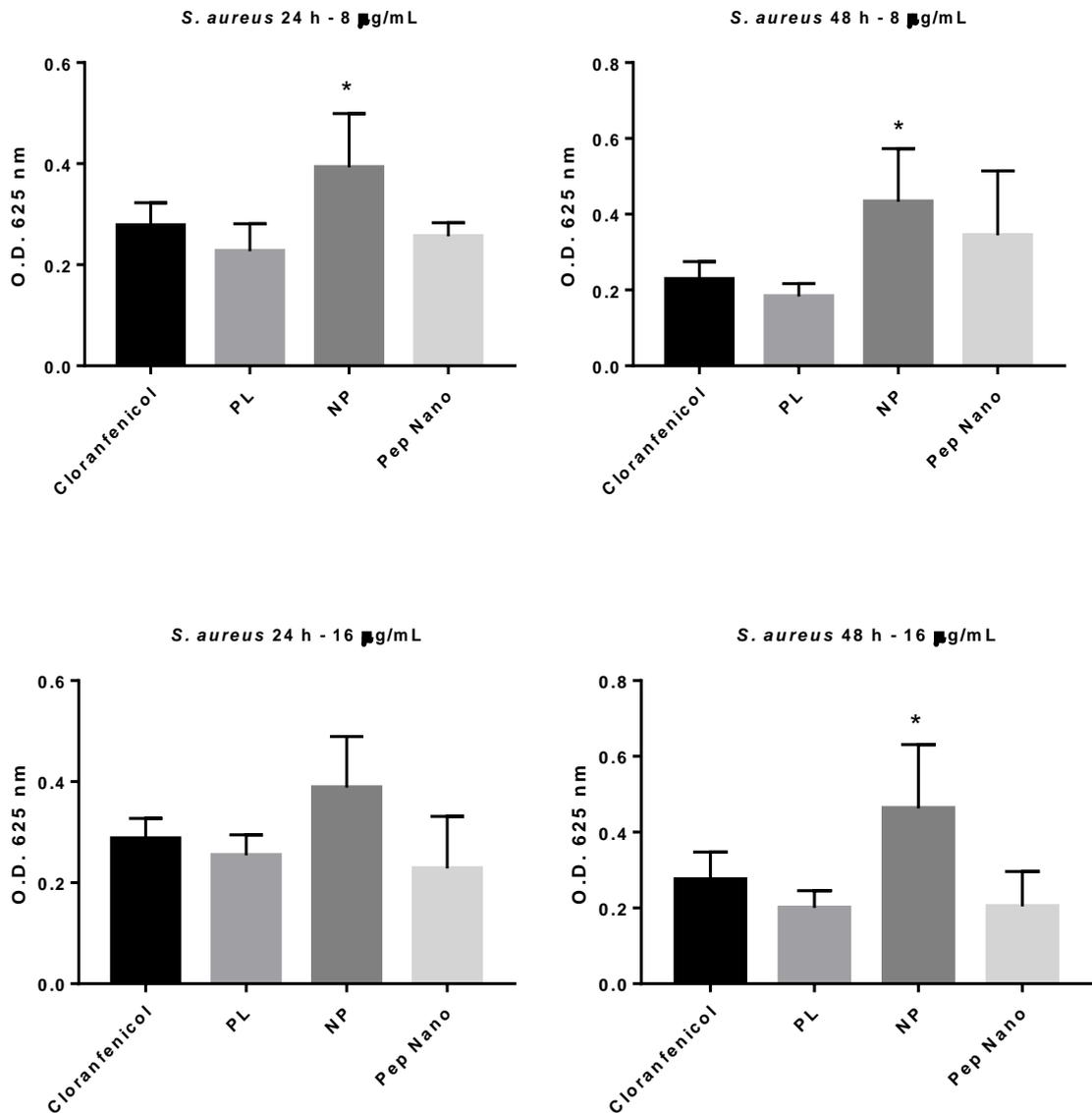


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

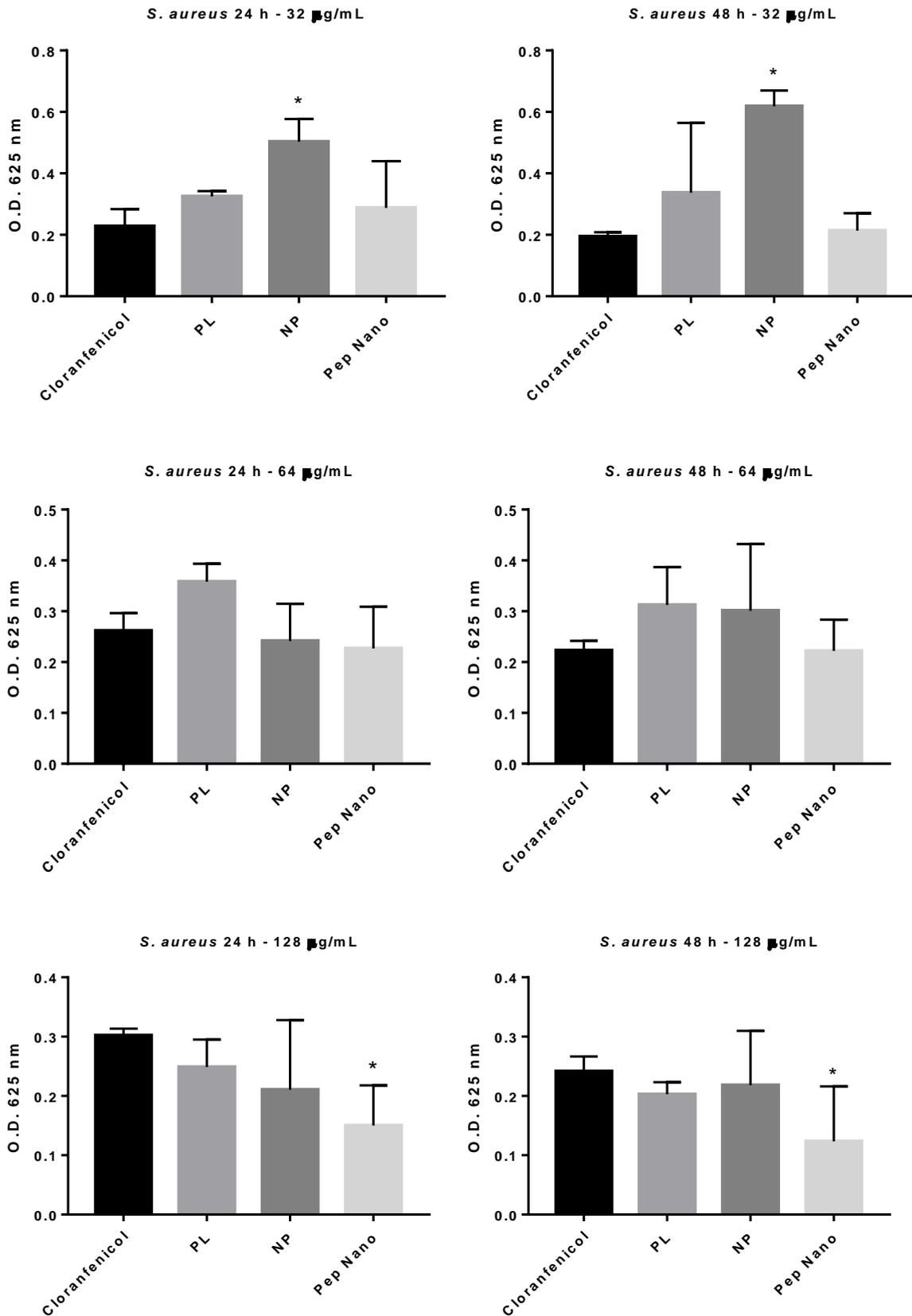


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

APÊNDICE C – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.

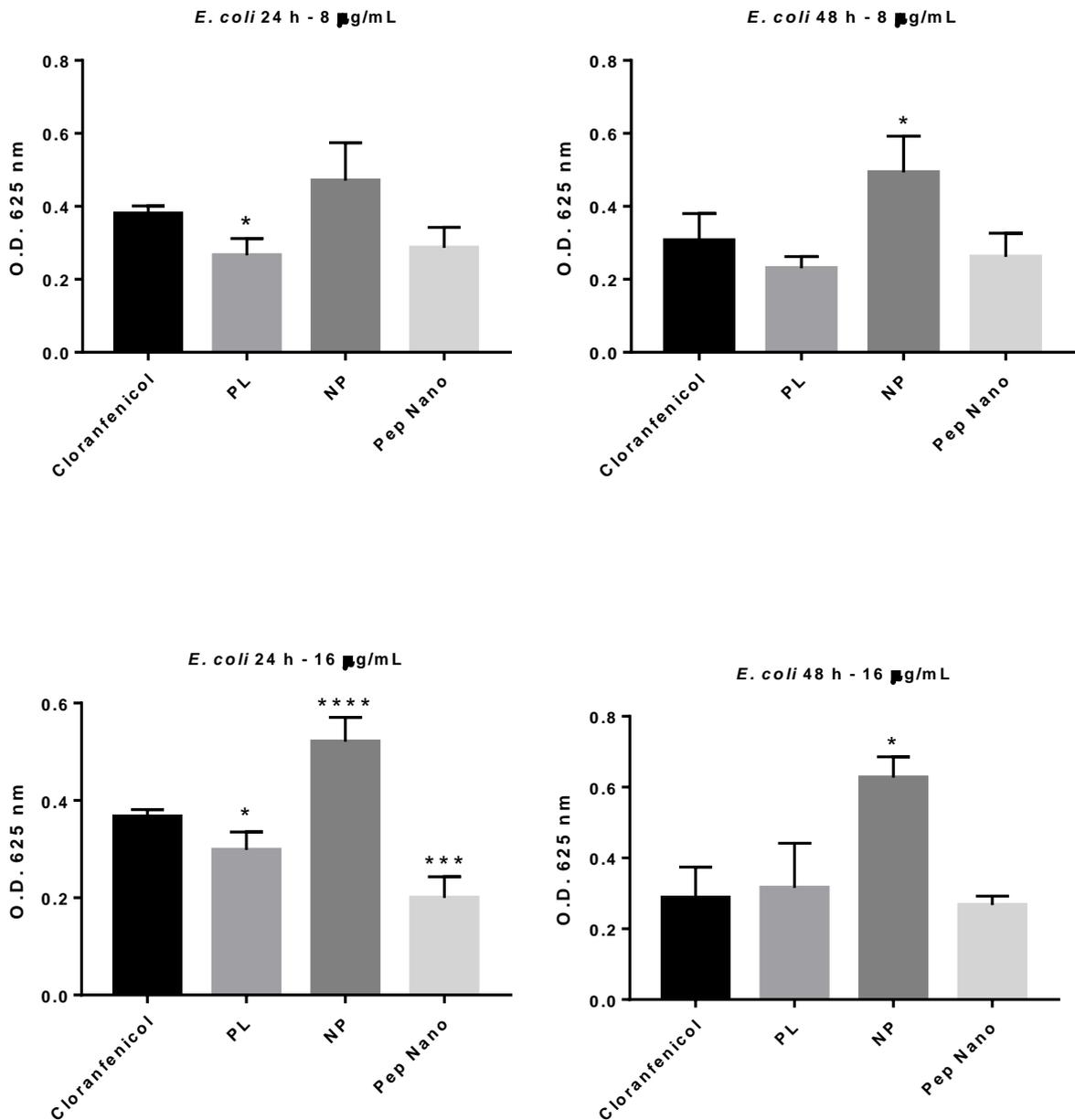


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

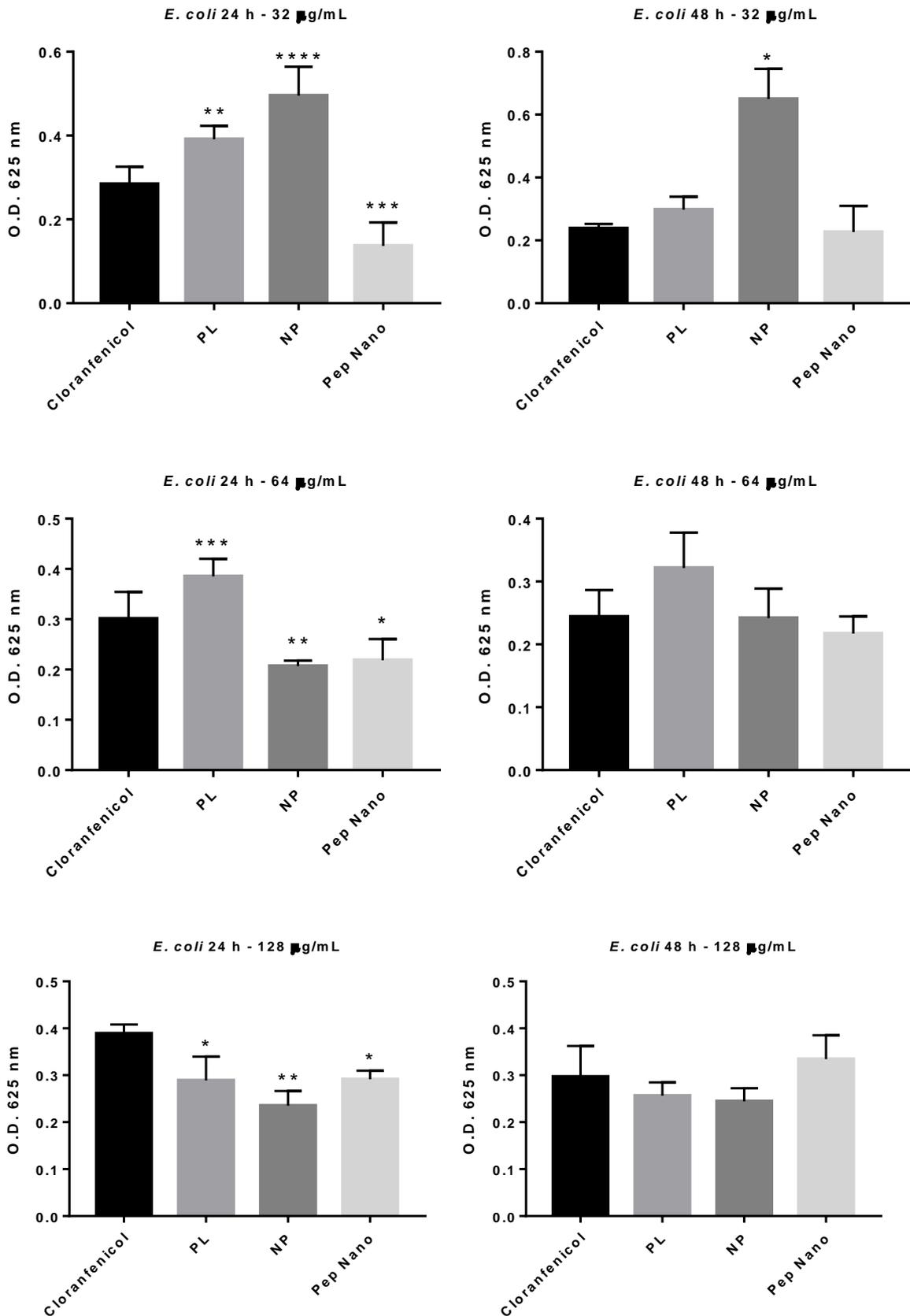


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

APÊNDICE D – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.

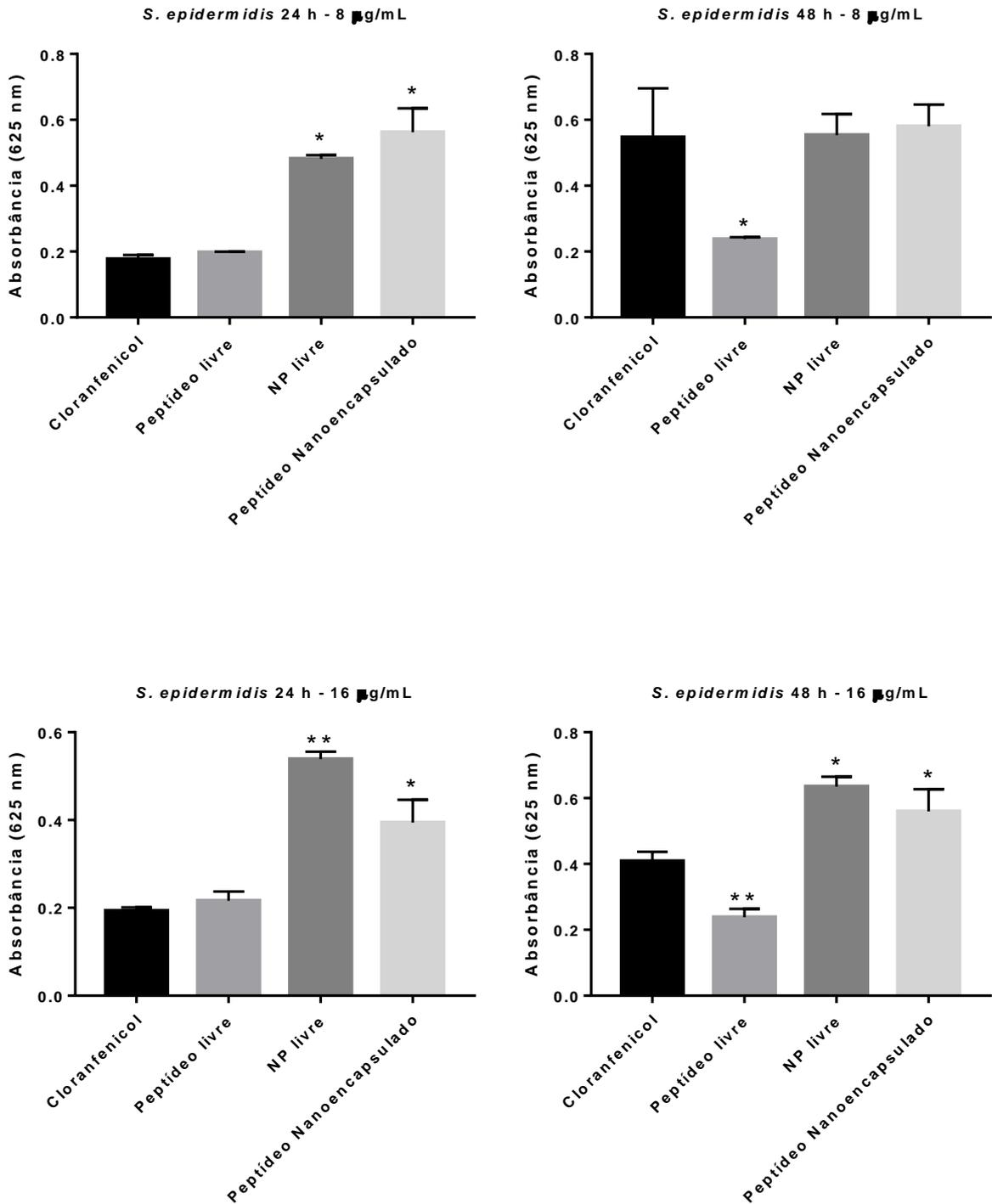


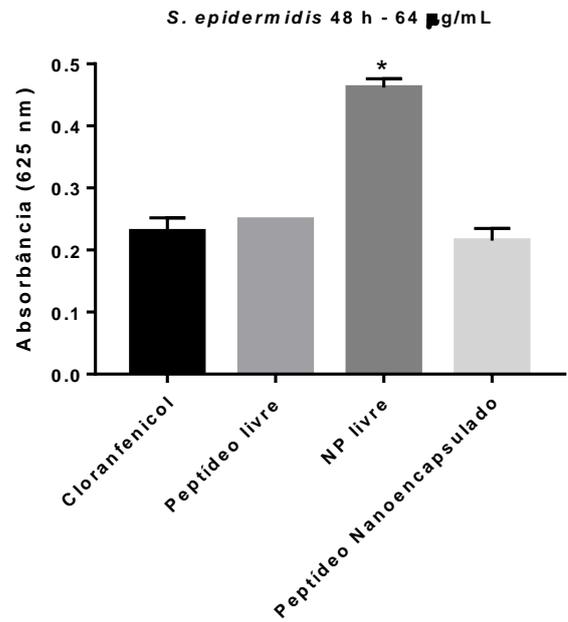
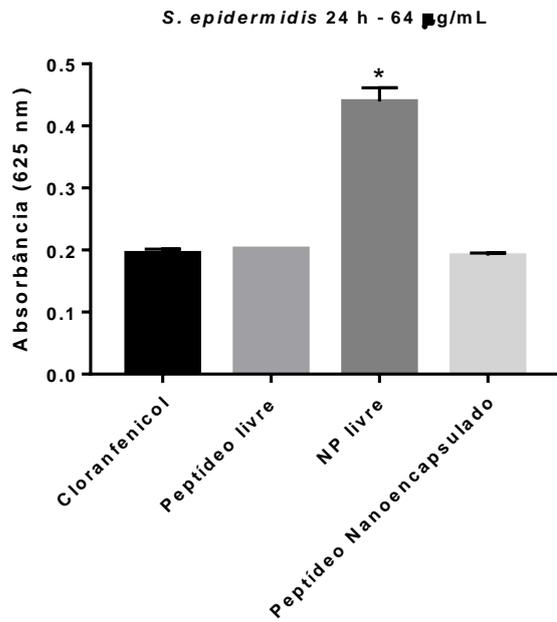
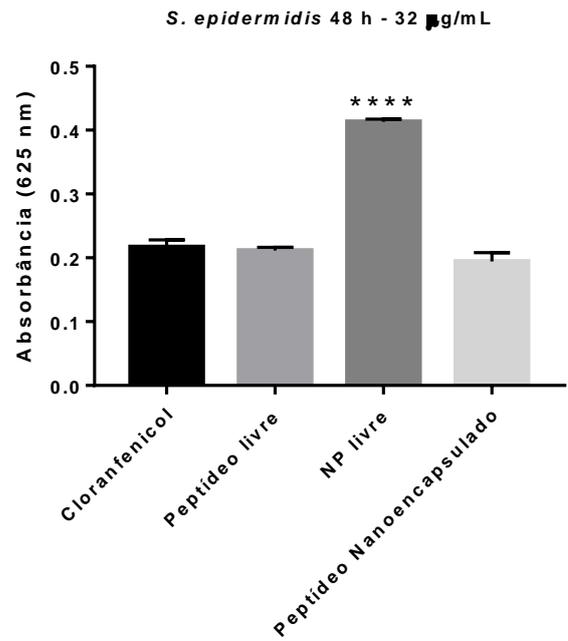
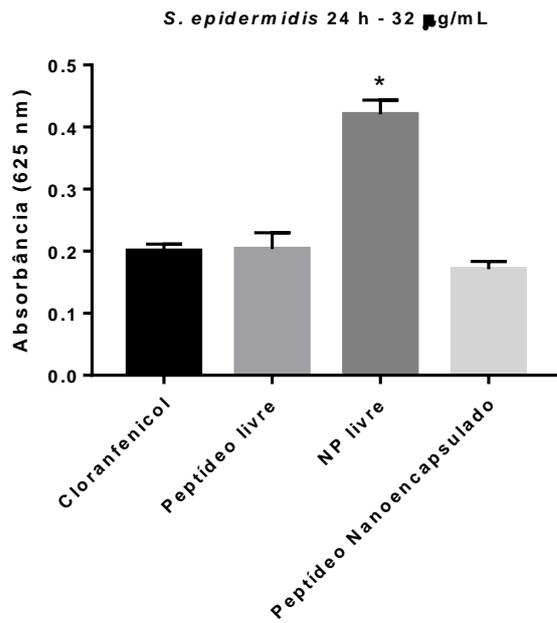
* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

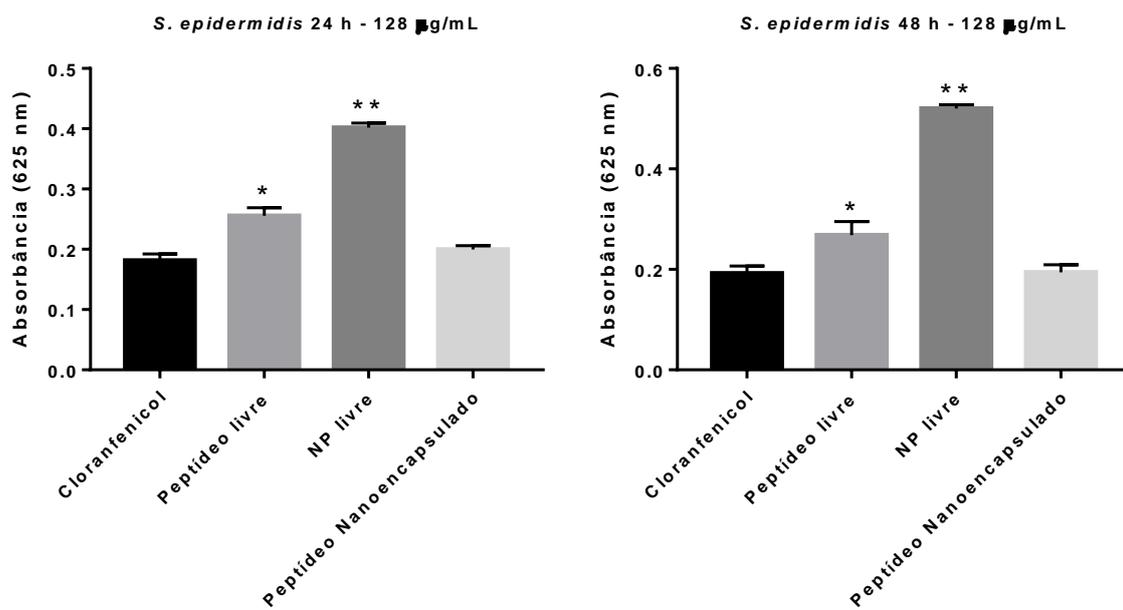


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

APÊNDICE E – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de *S. epidermidis* ATCC 12228, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.

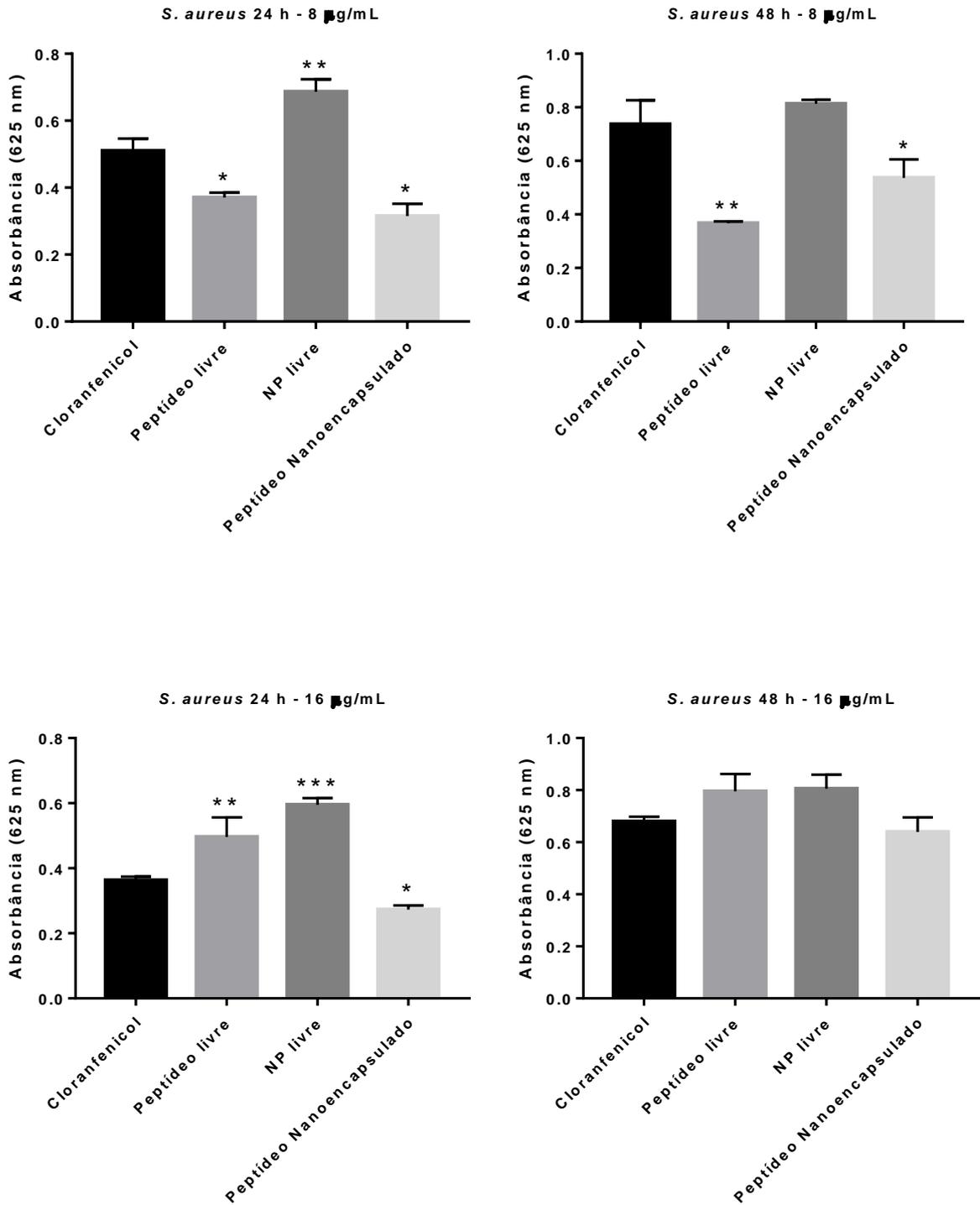


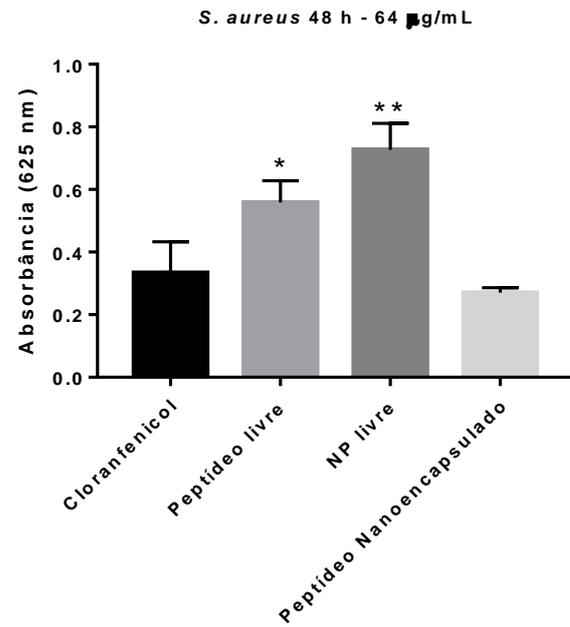
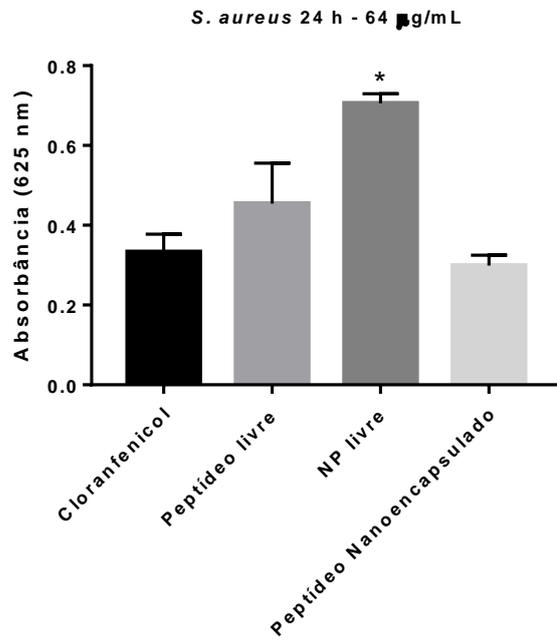
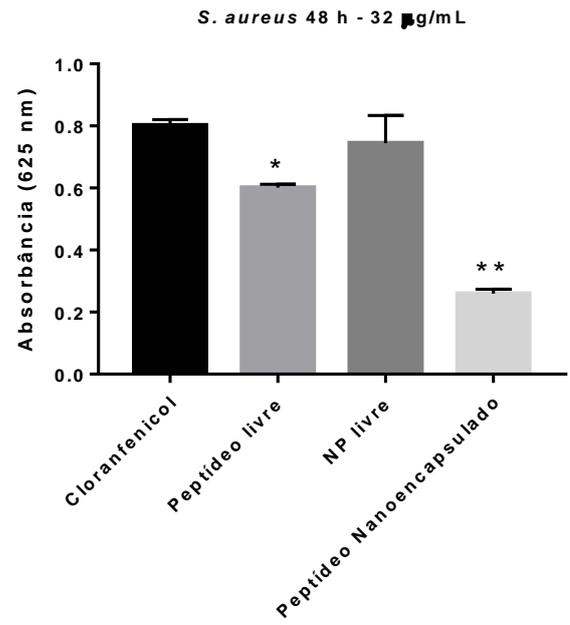
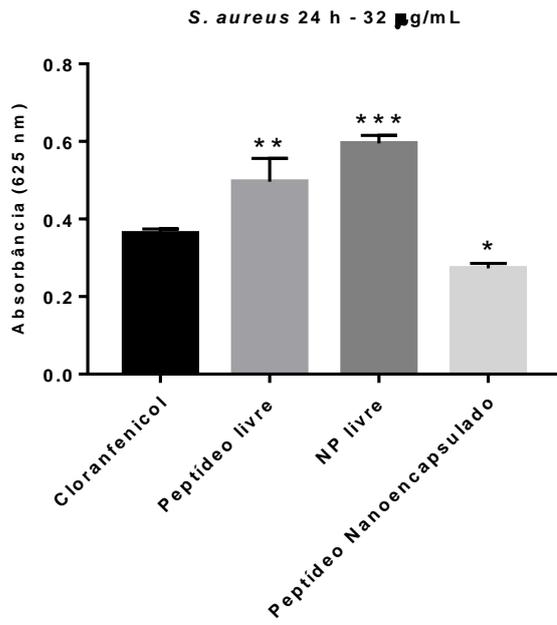


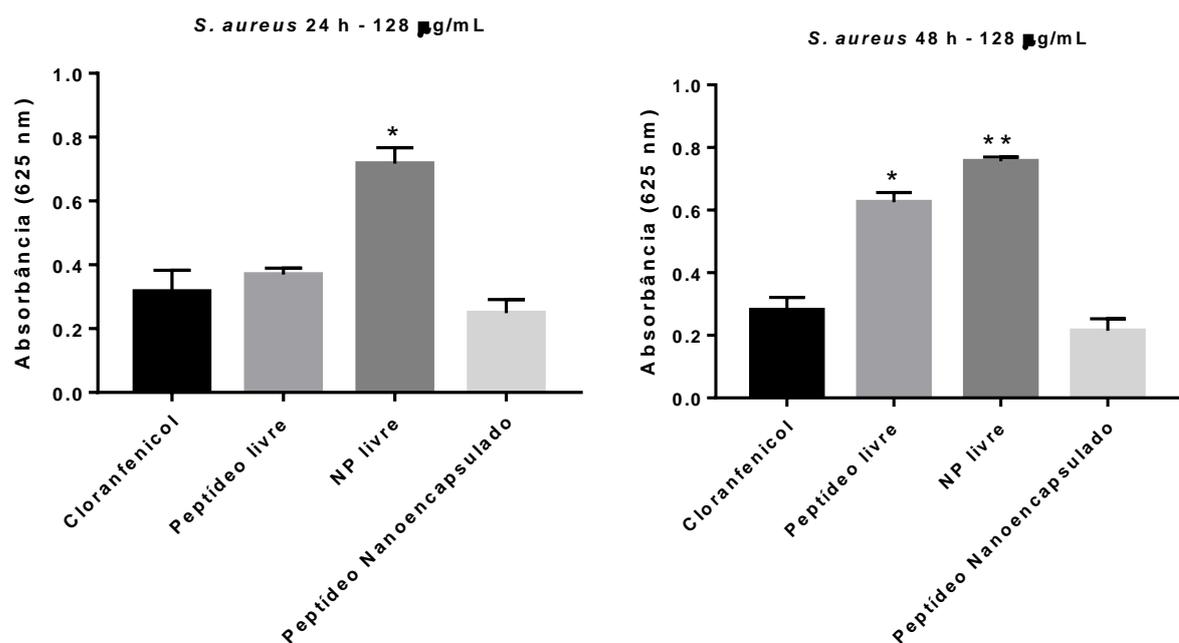


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.

APÊNDICE F – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de *S. aureus* ATCC 29213, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.

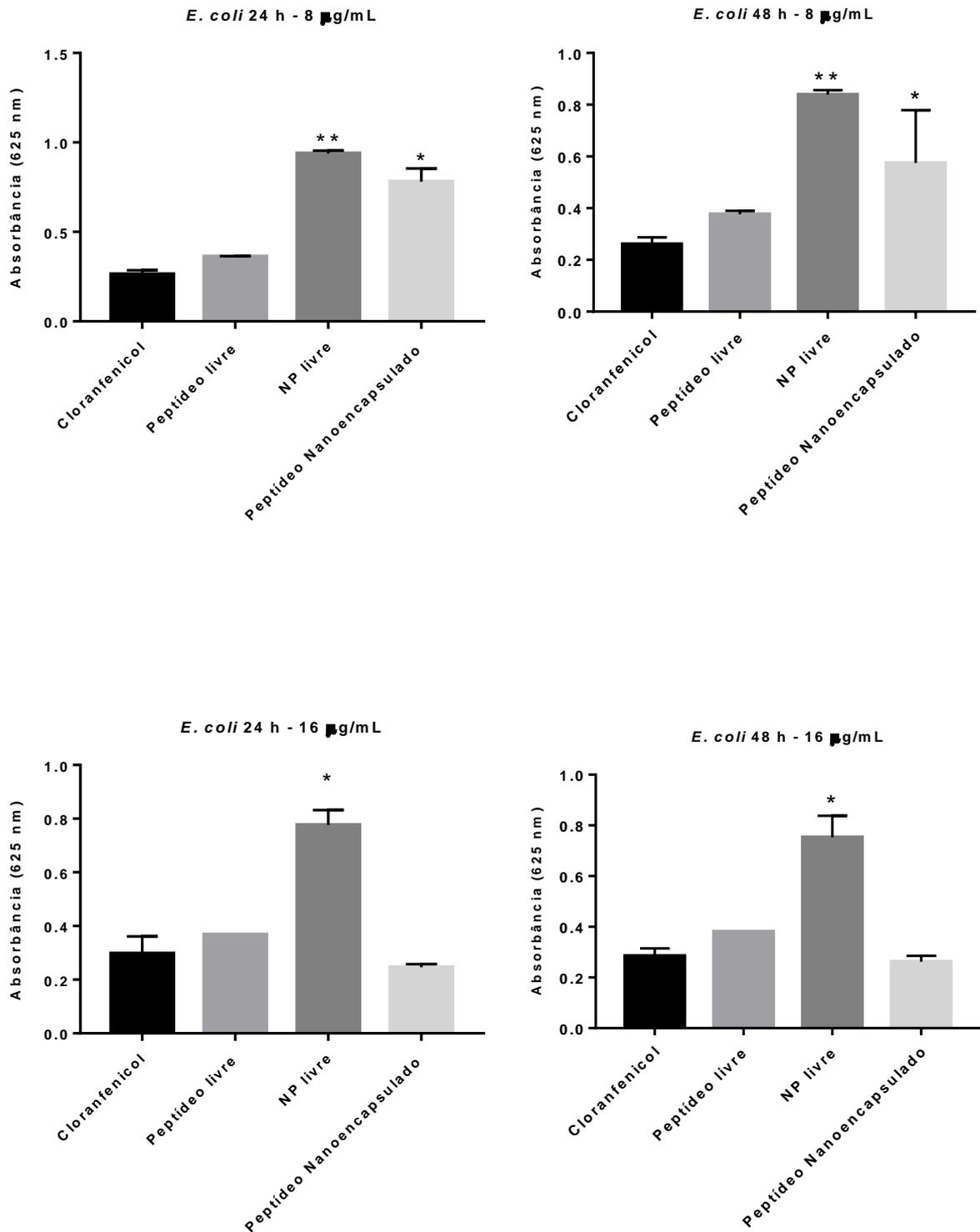


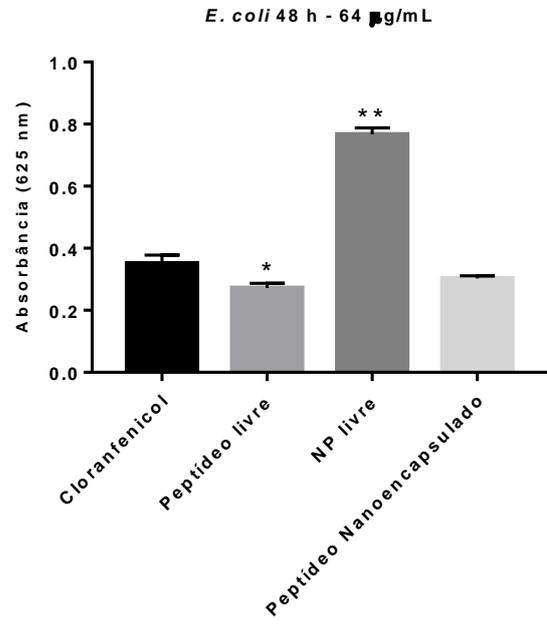
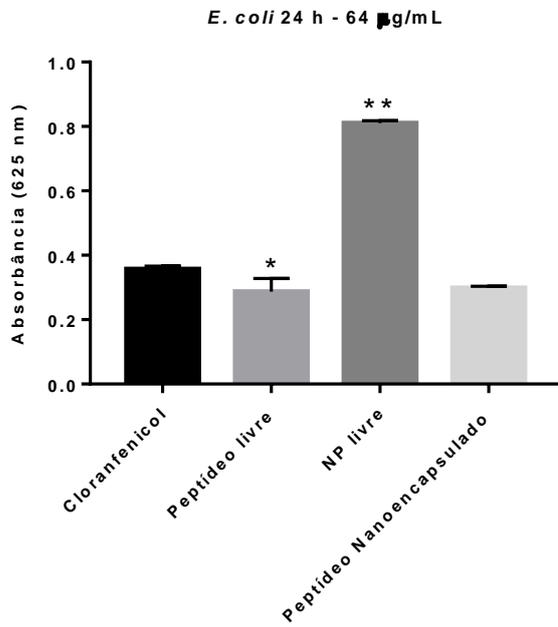
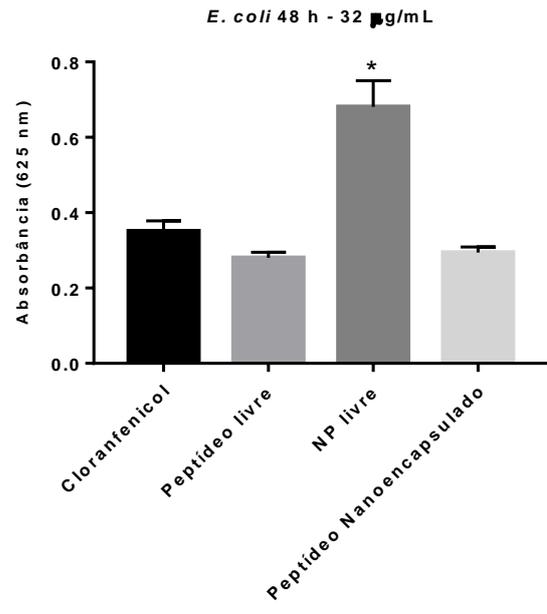
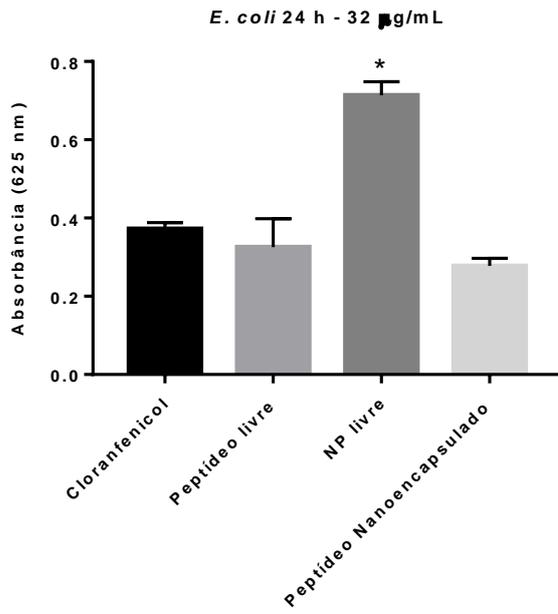


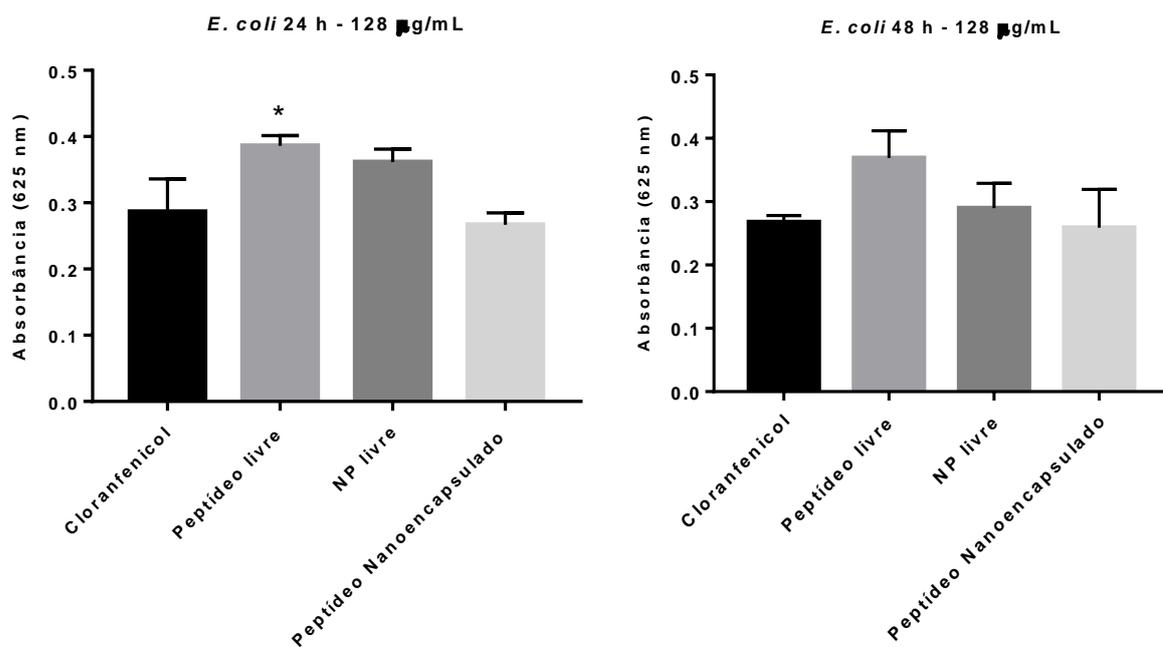


* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.

APÊNDICE G – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de *E. coli* 25922, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 h e 48 h.







* Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.