

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***

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira

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, da Universidade Federal de Juiz de Fora, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Humberto de Mello Brandão
Embrapa Gado de Leite

Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
ORIENTADOR
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

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, testando o peptídeo livre, 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 e 0,398. Os potenciais Zeta foram $36,5 \pm 2,1$ mV e $35,7 \pm 2,2$ mV. Apresentou uma eficiência de encapsulação de 93,55%. Em relação aos ensaios antimicrobianos, o peptídeo 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 as 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 potencialização 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 horas. Além disso, o nanossistema, em 48 horas, não foi citotóxico.

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 new 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, assaying the free, 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 action or bacteriostatic treatment and evaluation of the cytotoxicity of MTT treatments. Statistical analyzes were performed using the Tukey test ($p < 0.05$). The polydispersity indices were 0.356 and 0.398. Zeta potentials were $36.5 \pm 2.1 \text{ mV}$ and $35.7 \pm 2.2 \text{ mV}$. It has an encapsulation efficiency of 93.55%. Regarding the antimicrobial assays, the free peptide proved to be very efficient, with 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 the bacteria tested. The nanoencapsulation of the peptide favored mainly the inhibition of the growth of *E. coli*, a bacterium in which the treatment most stood out and showed potentiation of the antimicrobial effect in relation to the free peptide and possible synergistic effect between the chitosan and the peptide Lrot3.6. It also favored action against *S. aureus*, in which it was possible to detect bactericidal action in detriment to the bacteriostatic action of the free peptide in some concentrations. In general, prolonged release of the peptide was also observed within 48 hours. In addition, the nanosystem, within 48 hours, was not cytotoxic.

Keywords: Infections. AMPs. Nanotechnology. Nanoencapsulated AMPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos quatro grupos de AMPs classificados segundo sua estrutura secundária. (A) α -hélice; (B) folhas β ; (C) linear; (D) cíclicos (loop).....	31
Figura 2: Representações dos modelos de interação de AMPs com a membrana plasmática. (A) <i>Membrane thinning</i> ; (B) <i>Barrel-stave</i> ; (C) Poro toroidal; (D) <i>Aggregate</i> ; (E) Carpete. ME: membrana externa; MI: membrana interna; MC: membrana citoplasmática.....	33
Figura 3: 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	37
Figura 4: 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	38
Figura 5: Interação eletrostática (<i>cross-linking</i>) entre quitosana e TPP	39
Figura 6: Curva de crescimento padrão das bactérias <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	55
Figura 7: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>S. aureus</i> ATCC 29213	56
Figura 8: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	57
Figura 9: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	57
Figura 10: Ensaio antimicrobiano <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 em 24 e 48 h, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$. Concentração em que o peptídeo nanoencapsulado foi estatisticamente diferente do peptídeo livre, apresentando maior inibição do crescimento bacteriano. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....	60

- Figura 11: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228, em 24 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....60
- Figura 12: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228, em 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....61
- Figura 13: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213, em 24 e 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....64
- Figura 14: Ensaio antimicrobiano *E. coli* ATCC 25922 em 24 h, nas concentrações de 16 e 32 µg/mL. Destaque para o peptídeo nanoencapsulado, como o melhor tratamento nessas concentrações, superando o cloranfenicol. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....66
- Figura 15: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922, em 24 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....67
- Figura 16: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922, em 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.....67
- Figura 17: 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. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 µg/mL; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 µg/mL; NPB 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: controle.....72
- Figura 18: 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. NPP 8:

peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 µg/mL; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 µg/mL; NPB 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: controle.....73

Figura 19: Viabilidade celular em 24 h. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 µg/mL; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 µg/mL; NPB 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: controle73

Figura 20: Viabilidade celular em 48 h. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 µg/mL; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 µg/mL; NPB 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: controle74

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	32
Tabela 4: Mecanismos de ação de AMPs disruptivos de membrana (continuação) .	33
Tabela 5: Valores de tamanho e índice de polidispersão (PDI) da nanopartícula livre e da nanopartícula estruturada com o peptídeo Lrot3.6.....	53
Tabela 6: Valores dos potenciais Zeta do peptídeo Lrot3.6, nanopartícula livre e nanoesferas com o peptídeo.....	53
Tabela 7: Resultados dos ensaios antimicrobianos de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	59
Tabela 8: Resultados dos ensaios antimicrobianos de <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	62
Tabela 9: Resultados dos ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	65
Tabela 10: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 e 48 h em <i>E. coli</i>	69
Tabela 11: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 e 48 h em <i>S. aureus</i>	70
Tabela 12: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 e 48 h em <i>S. epidermidis</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitros
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
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

mg/mL	Miligramas por mililitro
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
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 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.5 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
2.6 <i>Escherichia coli</i>	28
2.7 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)	29
2.8 NANOTECNOLOGIA.....	34
2.8.1 NANOFÁRMACOS: NANOSSISTEMAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS E MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	36
2.8.2 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	36
2.9 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NANOENCAPSULADOS.....	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4 METODOLOGIA	43
4.1 SÍNTESE E SOLUBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Lrot3.6.....	43
4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES	43
4.3 SÍNTESE DE NANOESFERAS DE QUITOSANA ESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO Lrot3.6	44
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	45
4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (E.E.).....	45
4.6 MICRORGANISMOS	46
4.7 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO PADRÃO.....	47
4.8 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	47
4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	48
4.9 ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO.....	49
4.10 ENSAIO PARA ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA.....	49
4.11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	49
4.11.1 CULTURA DE CÉLULAS HEK293 <i>in vitro</i>	50

4.11.2 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AOS TRATAMENTOS	50
4.11.3 VIABILIDADE CELULAR POR MTT	51
4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIVRES E NANOESTRUTURADAS.....	52
5.1.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES E NANOESTRUTURADAS	52
5.1.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DO PEPTÍDEO Lrot3.6, DAS NANOPARTÍCULAS LIVRES E DAS NANOPARTÍCULAS ESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO	53
5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (E.E.).....	54
5.3 CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO DAS BACTÉRIAS.....	54
5.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	55
5.4.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	58
5.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	61
5.4.3 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	64
5.5 ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA	67
5.5.1 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	68
5.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	69
5.5.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	71
5.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	72
6 DISCUSSÕES	75
7 CONCLUSÕES.....	82
8 PERSPECTIVAS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICES.....	98
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	98

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 e 48 h.....	99
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 e 48 h.	101
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 e 48 h.	103
APÊNDICE E – Gráficos representando as análises estatísticas relacionadas aos ensaios para avaliação bactericida/bacteriostática de <i>E. coli</i> ATCC 25922, nas concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, em 24 e 48 h.	105
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 e 48 h.	108
APÊNDICE G – 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 e 48 h.	111

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* 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 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 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 por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da mesma.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	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: Guimarães 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).

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 *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 subcutâneo, 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 beta-lactâmico sintético meticilina, resistente às beta-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 beta-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).

2.5 *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%; queratite 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).

Na 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).

2.6 *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 inofensivas 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/meningite. 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, o que 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).

2.7 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, como carga, hidrofobicidade e anfipaticidade, 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 hidrofóbicos. Cerca de 10% dos peptídeos antimicrobianos identificados até então são aniônicos, 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 ser divididos em quatro grupos: peptídeos α -hélice; folhas β , com duas ou mais pontes dissulfeto; peptídeos lineares, ricos em triptofano, prolina e histidina; e peptídeos cíclicos (*loop*), formados por uma ponte dissulfeto (Figura 1). Entre os peptídeos de 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 pontes dissulfeto. Em contraste, peptídeos lineares, como a indolicidina, e peptídeos cíclicos (*loop*), 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).

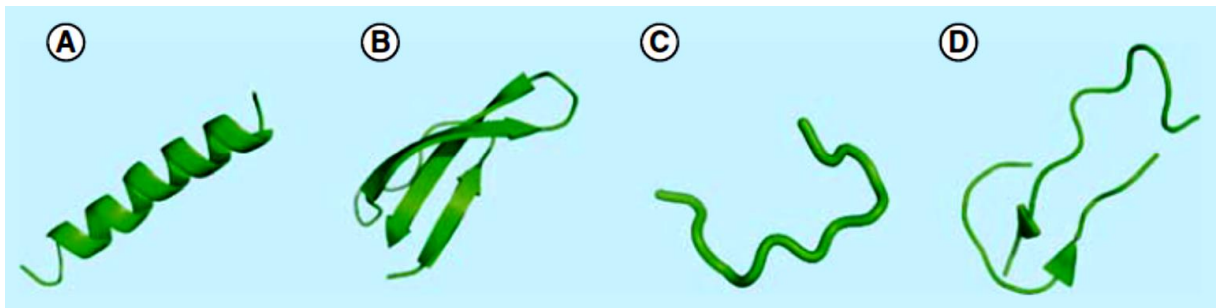


Figura 1: Representação dos quatro grupos de AMPs classificados segundo sua estrutura secundária. (A) α -hélice; (B) folhas β ; (C) linear; (D) cíclicos (*loop*). Fonte: KANG et al., 2014.

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. Apesar da diferença entre os grupos, ambos acabam por interagir com a membrana plasmática de alguma forma, seja para atingir seu alvo final intracelular (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 polianiônicas 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 2). 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.

Fonte: Adaptado de Bahar e Ren, 2013

Tabela 4: Mecanismos de ação de AMPs disruptivos de membrana (continuação)

Modelo de interação	Mecanismo de ação
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.

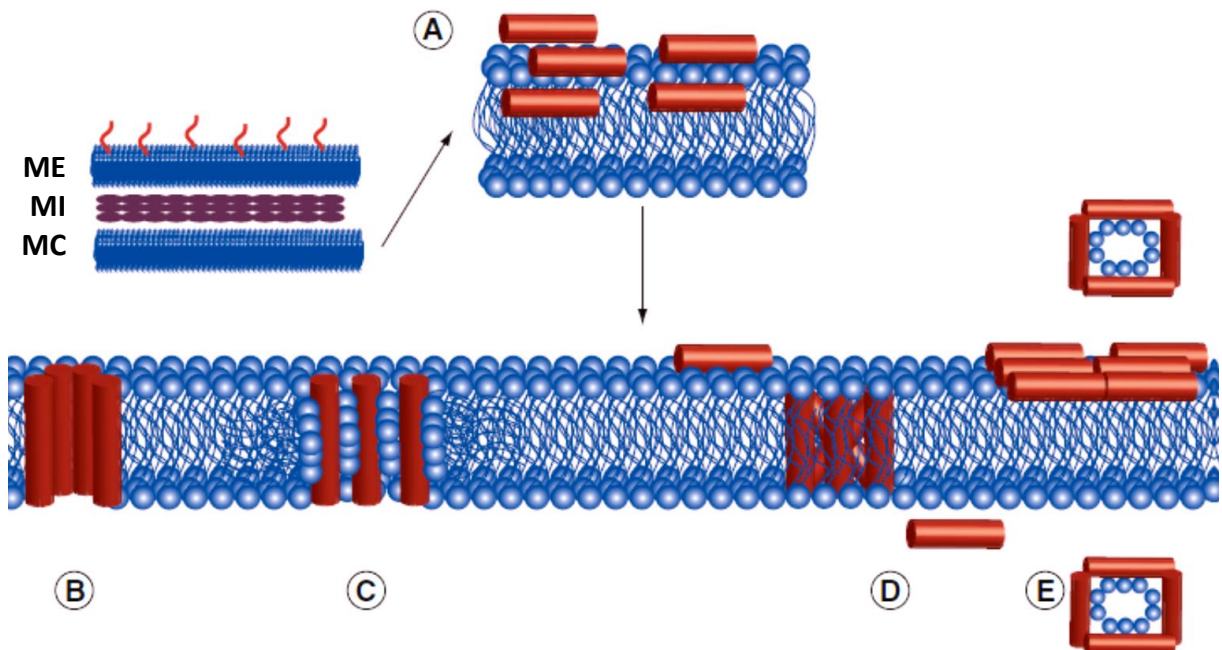


Figura 2: Representações dos modelos de interação de AMPs com a membrana plasmática. (A) *Membrane thinning*; (B) *Barrel-stave*; (C) Poro toroidal; (D) *Aggregate*; (E) *Carpete*. ME: membrana externa; MI: membrana interna; MC: membrana citoplasmática. Fonte: Adaptado de HALE e HANCOCK, 2007.

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 demonstram 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).

2.8 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).

2.8.1 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).

2.8.2 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 3), 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).

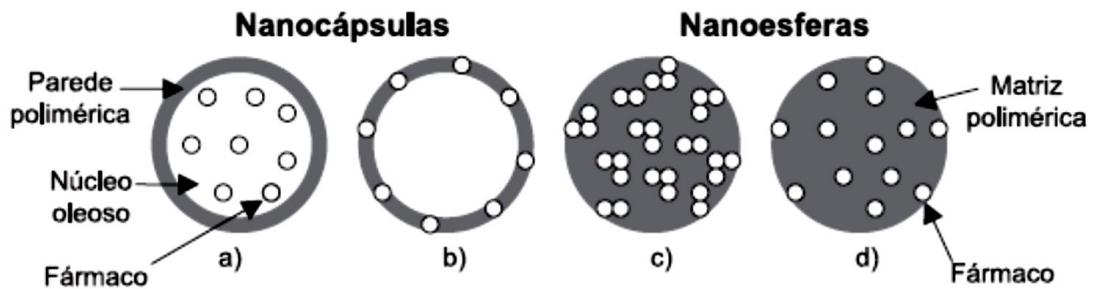


Figura 3: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas. a) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; b) Fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; c) Fármaco retido à matriz polimérica em nanoesferas; d) Fármaco adsorvido à matriz polimérica 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 4), unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (AHMED e ALJAEID, 2016).

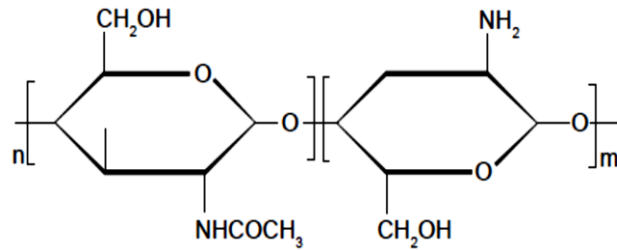


Figura 4: Estrutura química das unidades repetitivas de quitosana. À esquerda tem-se a unidade N-acetil-D-glicosamina, e à direita tem-se a D-glicosamina. Fonte: AHMED e ALJAEID, 2016.

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 fosfolipídios 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 (tripolifosfato 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 5) 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).

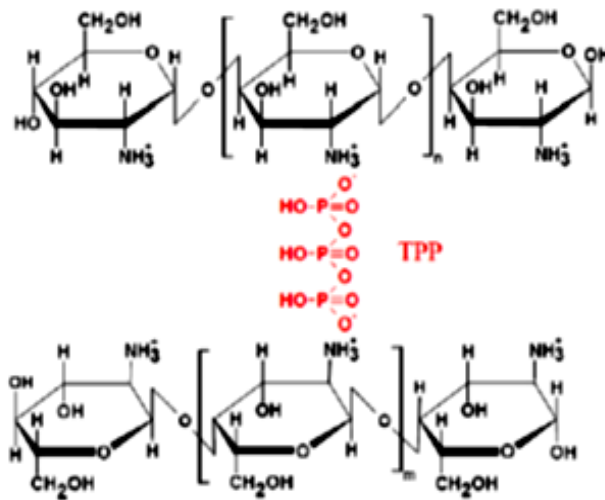


Figura 5: Interação eletrostática (*cross-linking*) entre quitosana e TPP. Fonte: KASPAR et al., 2013.

2.9 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

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, estrutura secundária em α -hélice, seu peso molecular é de aproximadamente 1781 Da, e seu tamanho estimado em 1,5 nm. Para o presente trabalho o peptídeo 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 armazenadas em tubos eppendorfs e 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.

Após o fim do gotejamento, a formação de nanopartículas pôde ser observada devido a mudança de cor da solução, que tornou-se esbranquiçada. Essa solução foi mantida em agitação magnética moderada por mais 60 min, para que as moléculas de quitosana e TPP continuassem interagindo e formando as nanopartículas.

Posteriormente foram realizadas diluições em água ultra pura, baseadas nas concentrações do peptídeo livre. Antes de cada ensaio antimicrobiano, as soluções de nanopartículas de quitosana foram submetidas a centrifugação a 14.500 rpm, por 1 minuto, 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 1.347,4 µL 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. Também foram submetidas a centrifugação prévia aos ensaios antimicrobianos, sendo utilizado o sobrenadante.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas livres e nanoestruturadas 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 (E.E.)

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 a 4.000 rpm, 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 foi o seguinte:

$$E.E. (\%) = \frac{[] \text{ total do peptídeo} - [] \text{ peptídeo livre}}{[] \text{ total do peptídeo}} \times 100$$

Sendo [] = concentração.

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 novo. 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. Os tubos falcon foram mantidos no shaker *overnight*, 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 a 10.000 rpm por 10 min. O pellet foi ressuspenso 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 falcon contendo 3 mL de LB. Os inóculos foram mantidos por agitação de 100 rpm, 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 µL da suspensão bacteriana e 50 µL do tratamento, totalizando 100 µL em cada poço. Para análise da concentração mínima inibitória (MIC) foram testadas as concentrações de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL de cada tratamento, que se seguem.

4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Nanopartícula de quitosana livre, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL, baseadas nas concentrações do peptídeo livre.
- Peptídeo livre, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL.
- Peptídeo nanoencapsulado, nas concentrações finais de 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL.
- 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: foi utilizado o cloranfenicol nas concentrações de 8, 16, 32, 64, 128 e 1280 µg/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.

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, 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, 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 baseados na norma ISO 10993-5 (2009), com algumas modificações.

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 em tubo falcon de 50 mL, a 1.500 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido 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 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®. 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*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIVRES E NANOESTRUTURADAS

As nanopartículas desenvolvidas foram caracterizadas quanto a seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta utilizando-se o aparelho Zetasizer®, Nano-ZS da Malvern. Para a realização de um estudo comparativo entre as nanopartículas livres e aquelas estruturadas com o peptídeo, ambas foram submetidas a análise dessas características.

5.1.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIVRES E NANOESTRUTURADAS

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) de 0,356. Obteve-se, em menor intensidade, partículas menores, com 8 nm, até partículas com aproximadamente 5046 nm, no entanto a maioria esteve dentro da faixa de pico da média.

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) de 0,398. As nanoesferas apresentaram tamanhos de até 5071 nm, porém em menor intensidade.

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

Os resultados em relação ao tamanho e índice de polidispersão (PDI) estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de tamanho e índice de polidispersão (PDI) da nanopartícula livre e da nanopartícula estruturada com o peptídeo Lrot3.6

Amostra	Tamanho (nm)	PDI
Nanopartícula de quitosana livre	196	0,356
Nanopartícula de quitosana estruturada com o peptídeo Lrot3.6	228	0,398

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DO PEPTÍDEO Lrot3.6, DAS NANOPARTÍCULAS LIVRES E DAS NANOPARTÍCULAS ESTRUTURADAS COM O PEPTÍDEO

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

Os valores, expressos em mV, estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores dos potenciais Zeta do peptídeo Lrot3.6, nanopartícula livre e nanoesferas com o peptídeo

Amostra	Potencial Zeta (mV)
Peptídeo Lrot3.6	+ 18,7 ± 1,5
Nanopartícula de quitosana livre	+ 36,5 ± 2,1
Nanopartícula de quitosana estruturada com o peptídeo Lrot3.6	+ 35,7 ± 2,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (E.E.)

A eficiência de encapsulação do peptídeo Lrot3.6 nas nanopartículas de quitosana foi determinada por meio de dosagem dos peptídeos encontrados em ambas porções da coluna Amicon® 10 kDa, após centrifugação. Devido ao pequeno tamanho do peptídeo, aproximadamente 1,78 kDa, aqueles que estivessem livres passariam pelo filtro e seriam detectados na porção inferior da coluna. Já os peptídeos nanoencapsulados se encontrariam na parte superior da coluna, devido ao maior peso molecular da quitosana, de 50 a 190 kDa.

Dessa forma, por dosagem pelo método espectrofotométrico descrito por Lowry et al. (1951), determinou-se a concentração de peptídeos do sobrenadante e do precipitado coletados na coluna, baseados em curvas padrões obtidas por concentrações crescentes do próprio peptídeo e também de uma curva padrão de albumina. Além do peptídeo nanoencapsulado, quantificou-se o peptídeo livre e também a nanopartícula livre, após centrifugação na Amicon® 10 kDa, para ajustes na quantificação.

Assim sendo, obteve-se o valor da eficiência de encapsulação subtraindo a concentração total do peptídeo utilizada para a metodologia de encapsulação daquela encontrada na parte inferior da coluna Amicon®, correspondente a concentração não encapsulada. Após isso, dividiu-se pela concentração total do peptídeo e multiplicou-se por 100, para se obter o valor em porcentagem. Para isso, estimou-se as concentrações de cada tratamento baseadas na absorbância alcançada na dosagem de proteínas.

Em ambos os cálculos, utilizando a curva padrão do próprio peptídeo e a curva padrão de albumina, obteve-se exatamente a mesma eficiência de encapsulação, correspondente a 93,55%.

5.3 CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO DAS BACTÉRIAS

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 6. 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.

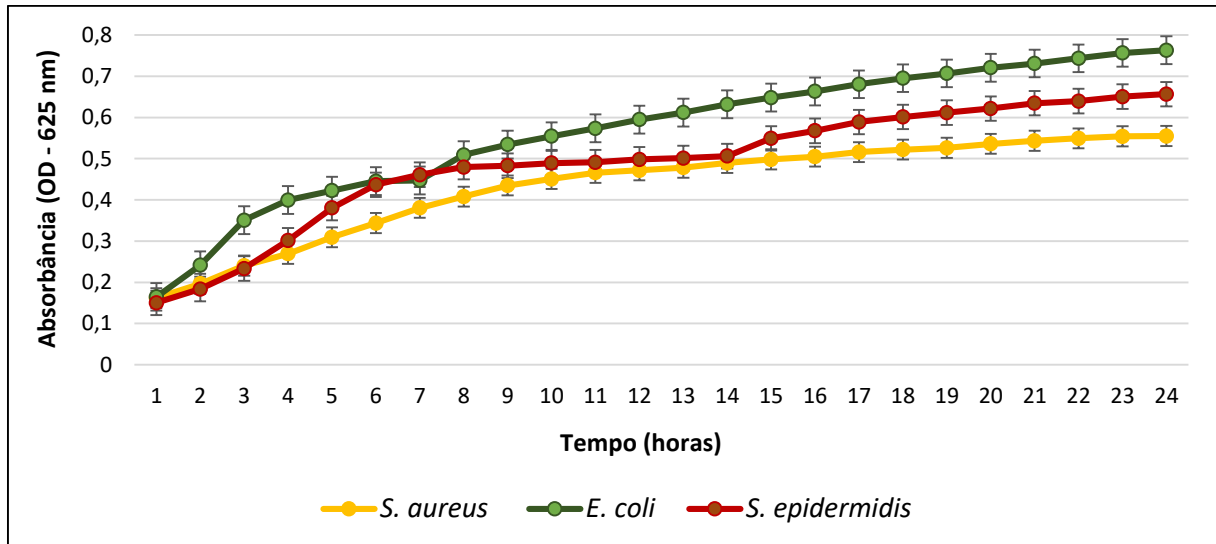


Figura 6: Curva de crescimento padrão das bactérias *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

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 7, Figura 8 e Figura 9 representam o crescimento de cada bactéria em seu respectivo controle negativo.

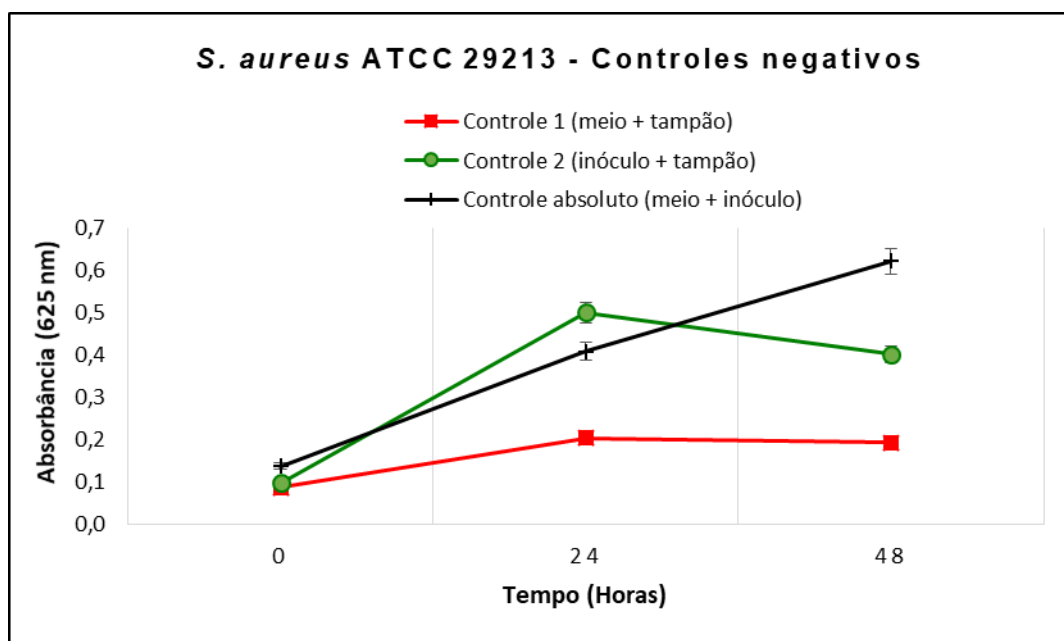


Figura 7: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213.
Fonte: Elaborado pelo autor.

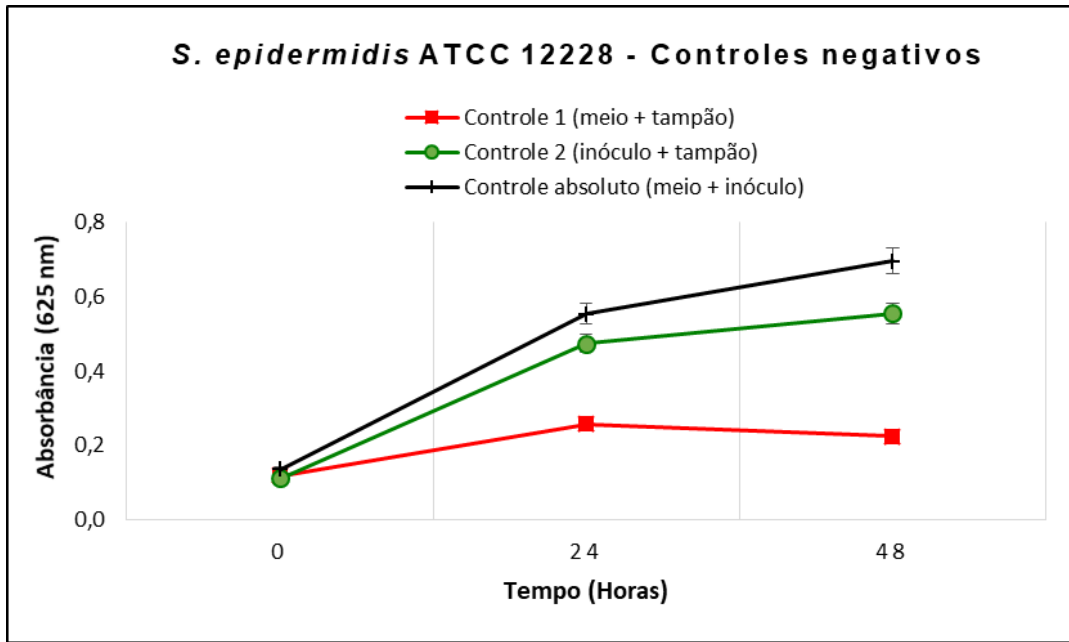


Figura 8: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228.
Fonte: Elaborado pelo autor.

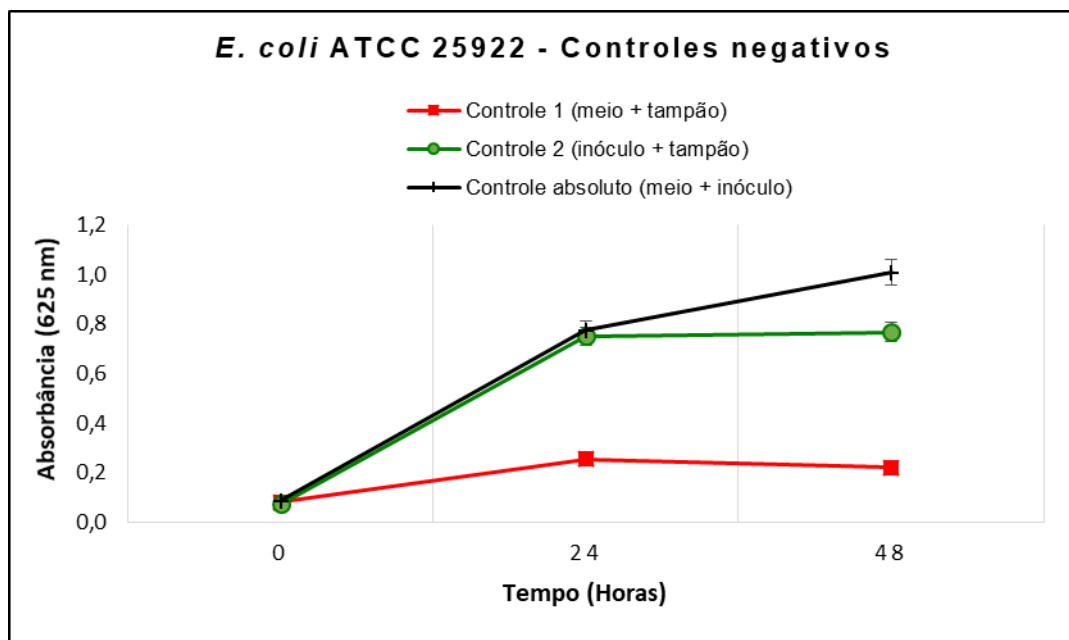


Figura 9: Controles negativos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as bactérias apresentaram crescimento normal, bem como não tiveram seu crescimento influenciado pelo tampão de diluição do peptídeo, confirmando a viabilidade de cada uma delas para a realização dos ensaios.

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. Foi analisada também a diferença estatística entre o peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado. Os resultados foram expressos em gráficos (APÊNDICES B, C e D) e tabelas. A legenda da simbologia das tabelas está representada logo abaixo de cada uma delas. Valores que foram estatisticamente significativos em relação ao cloranfenicol, porém não inibiram o crescimento bacteriano, foram representados por *C. Valores que foram estatisticamente significativos em relação ao cloranfenicol com maior inibição do crescimento bacteriano, apresentando-se melhores que o controle, foram representados por *M. Valores que não apresentaram diferença estatística em relação ao cloranfenicol foram expressos por =.

5.4.1 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

A Tabela 7 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 7: Resultados dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228.

<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228				
Hora	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	*C	=	=
	16	*C	=	=
	32	*C	*C	=
	64	=	*C	=
	128	=	=	=
48	8	*C	=	=
	16	*C	=	=
	32	*C	*C	=
	64	=	*C	=
	128	=	=	=

(*C) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância maiores que o controle, indicando crescimento bacteriano.

(*M) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância menores, indicando inibição maior que a do cloranfenicol.

(=) Não houve diferença estatística em relação ao cloranfenicol.

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 $\mu\text{g/mL}$, sendo que em todas as concentrações o peptídeo nanoencapsulado não apresentou diferença estatística em relação ao cloranfenicol.

Nas concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo livre, tanto em 24 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

quanto em 48 h (Figura 10). Nas demais concentrações não apresentaram diferença estatística.

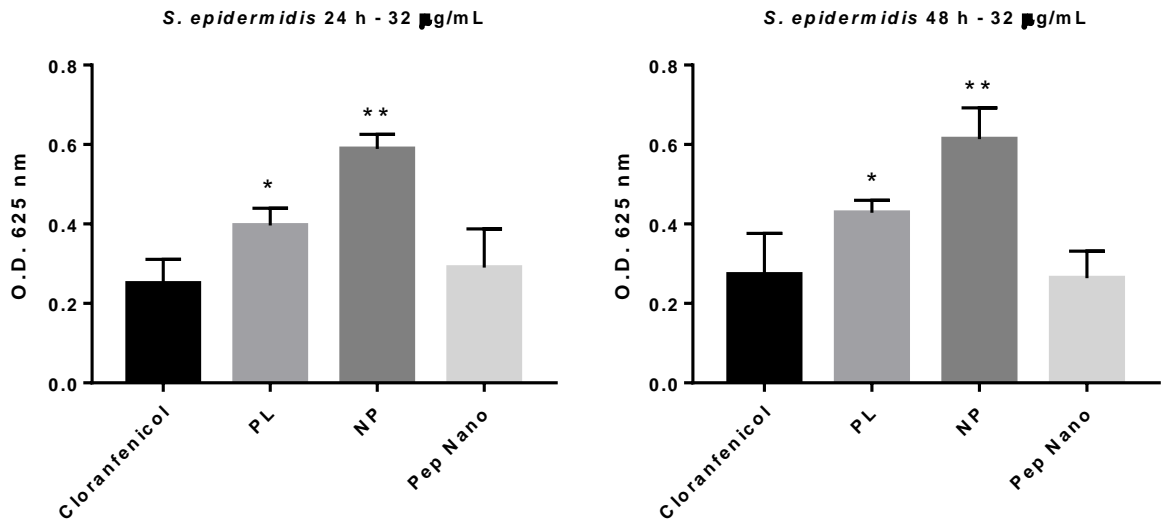


Figura 10: Ensaio antimicrobiano *S. epidermidis* ATCC 12228 em 24 e 48 h, na concentração de 32 µg/mL. Concentração em que o peptídeo nanoencapsulado foi estatisticamente diferente do peptídeo livre, apresentando maior inibição do crescimento bacteriano. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os gráficos correspondentes às concentrações mínimas inibitórias dos tratamentos em 24 e 48 h estão representados nas Figura 11 e Figura 12.

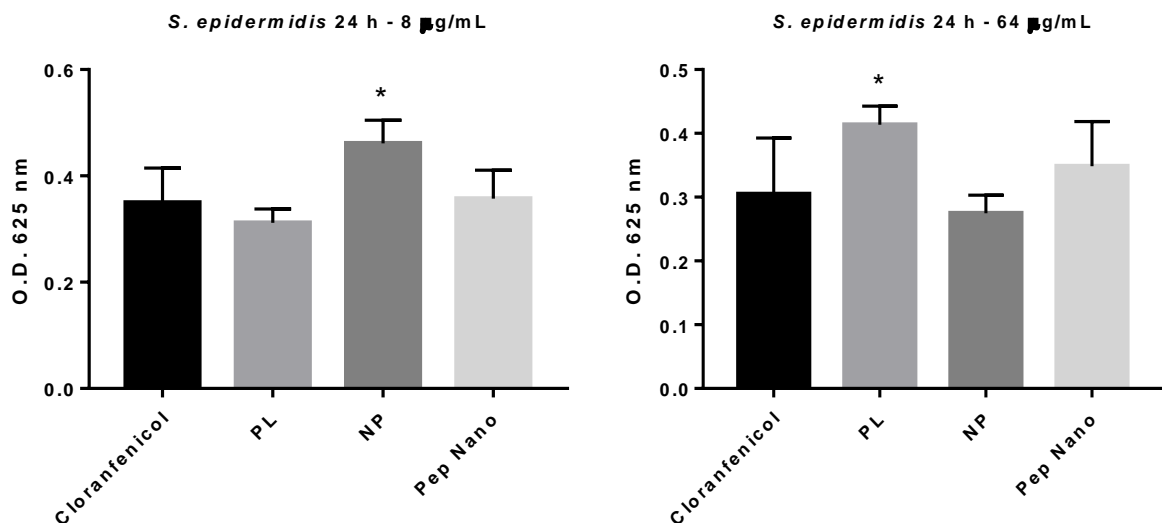


Figura 11: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228, em 24 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

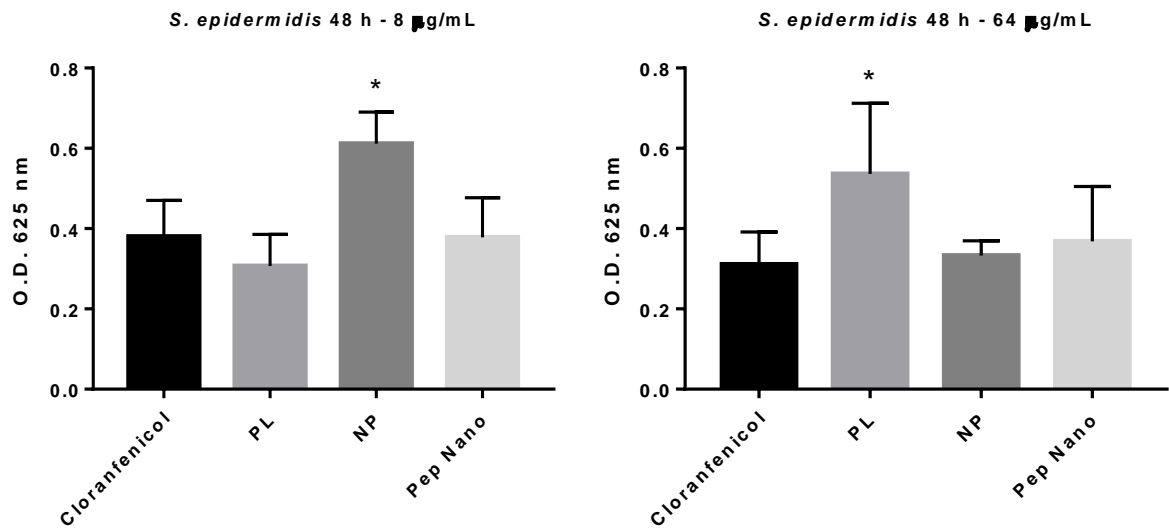


Figura 12: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. epidermidis* ATCC 12228, em 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

A Tabela 8 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *S. aureus* ATCC 29213.

Tabela 8: Resultados dos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213.

<i>S. aureus</i> ATCC 29213				
Hora	Concentração (µg/mL)	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	*C	=	=
	16	=	=	=
	32	*C	=	=
	64	=	=	=
	128	=	=	*M
48	8	*C	=	=
	16	*C	=	=
	32	*C	=	=
	64	=	=	=
	128	=	=	*M

(*C) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância maiores que o controle, indicando crescimento bacteriano.

(*M) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância menores, indicando inibição maior que a do cloranfenicol.

(=) Não houve diferença estatística em relação ao cloranfenicol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No ensaio de *S. aureus*, a nanopartícula de quitosana livre apresentou um MIC de 64 µg/mL. 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. Nas demais concentrações não apresentaram diferença estatística significativa.

Os gráficos correspondentes às concentrações mínimas inibitórias dos tratamentos em 24 e 48 h estão representados na Figura 13.

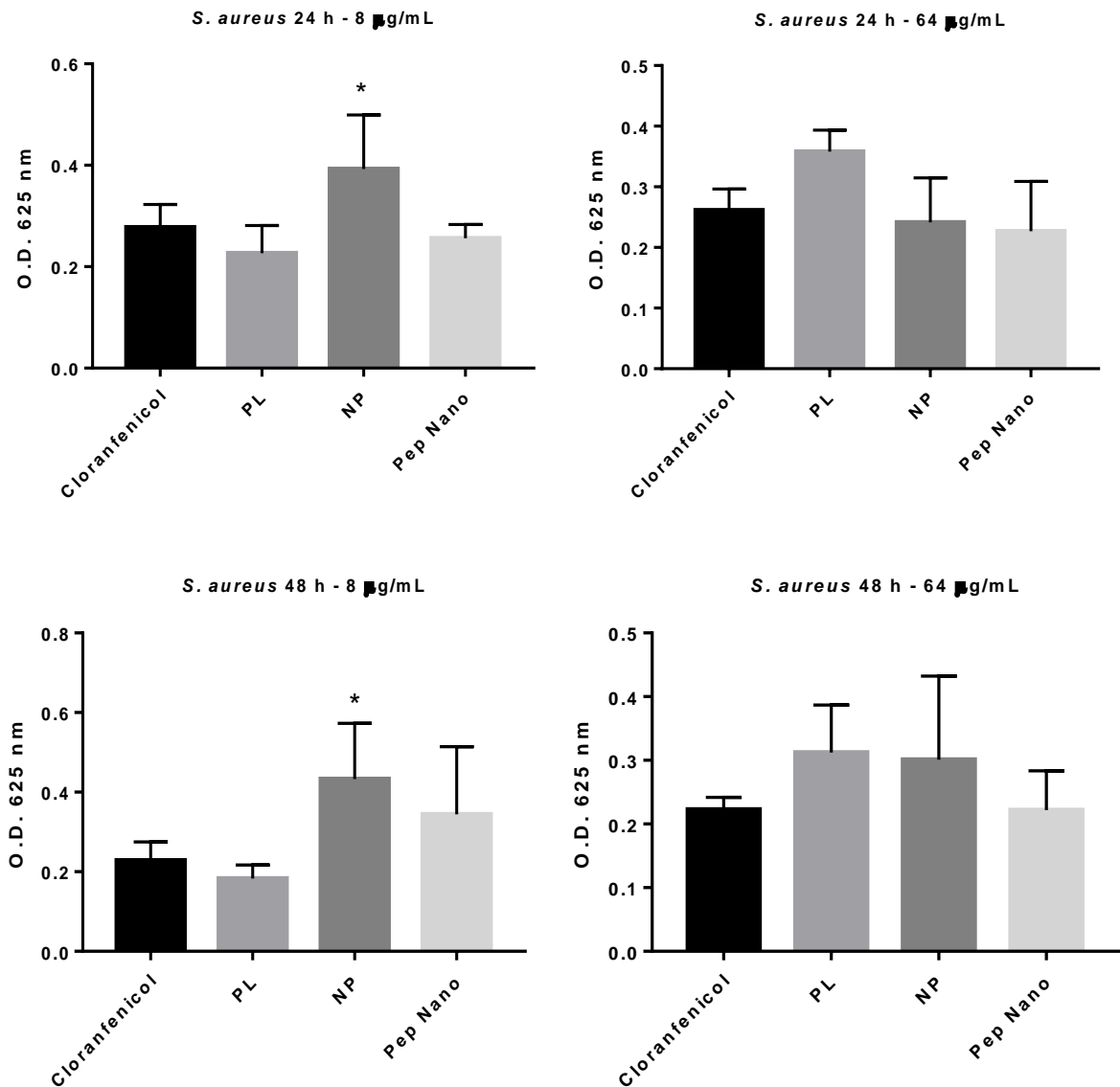


Figura 13: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213, em 24 e 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.3 *Escherichia coli* ATCC 25922

A Tabela 9 resume os resultados obtidos, por meio de análises estatísticas, em relação ao bioensaio de *E. coli* ATCC 25922.

Tabela 9: Resultados dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922.

<i>E. coli</i> ATCC 25922				
Hora	Concentração (µg/mL)	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	=	*M	=
	16	*C	*M	*M
	32	*C	*C	*M
	64	*M	*C	*M
	128	*M	*M	*M
48	8	*C	=	=
	16	*C	=	=
	32	*C	=	=
	64	=	=	=
	128	=	=	=

(*C) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância maiores que o controle, indicando crescimento bacteriano.

(*M) Apresentou diferença estatística ($p < 0,05$, Tukey) em relação ao cloranfenicol, com valores de absorvância menores, indicando inibição maior que a do cloranfenicol.

(=) Não houve diferença estatística em relação ao cloranfenicol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em *E. coli* o MIC da nanopartícula livre foi de 64 µg/mL, sendo em 24 h os melhores tratamentos nas maiores concentrações, superando o efeito do cloranfenicol em relação a inibição do crescimento bacteriano.

O peptídeo livre apresentou MIC de 8 µg/mL, superando o cloranfenicol nas concentrações de 8, 16 e 128 µg/mL, em 24 h. Nas concentrações de 32 e 64 µg/mL apresentou um pequeno aumento na absorvância em 24 h, no entanto em 48 h se iguala novamente ao controle positivo.

O peptídeo nanoencapsulado apresentou MIC em 8 µg/mL. A partir da concentração de 16 µg/mL apresentou efeito inibitório superior ao do cloranfenicol em

24 h, sendo considerado nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 14) o melhor tratamento dentre todos.

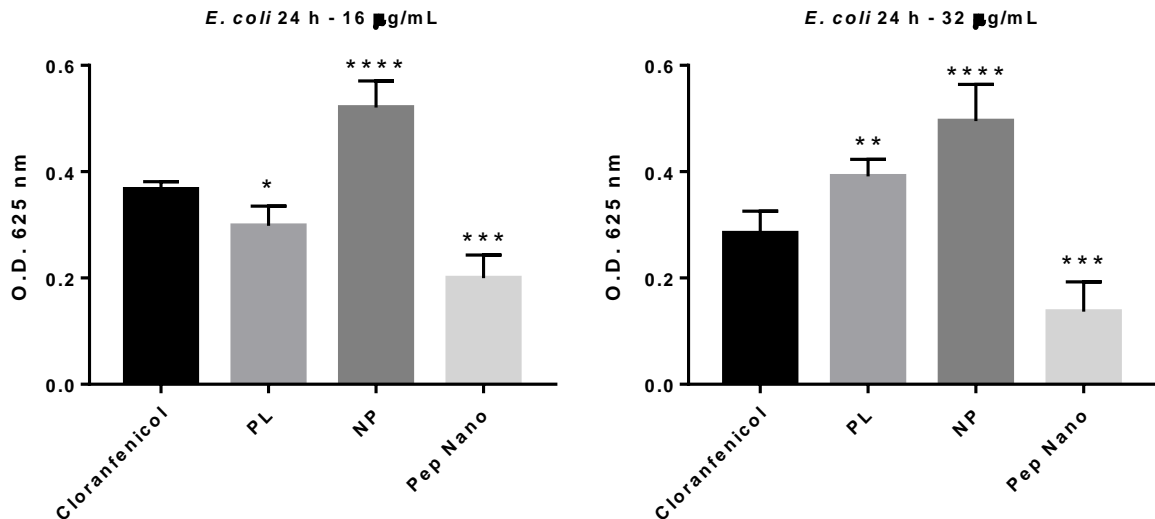


Figura 14: Ensaio antimicrobiano *E. coli* ATCC 25922 em 24 h, nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Destaque para o peptídeo nanoencapsulado, como o melhor tratamento nessas concentrações, superando o cloranfenicol. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

O peptídeo livre e o peptídeo nanoencapsulado apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações de 16, 32 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 24 h, com o peptídeo nanoencapsulado apresentando maior efeito inibitório do crescimento bacteriano em relação ao peptídeo livre.

Os gráficos correspondentes às concentrações mínimas inibitórias dos tratamentos em 24 e 48 h estão representados nas Figura 15 e Figura 16.

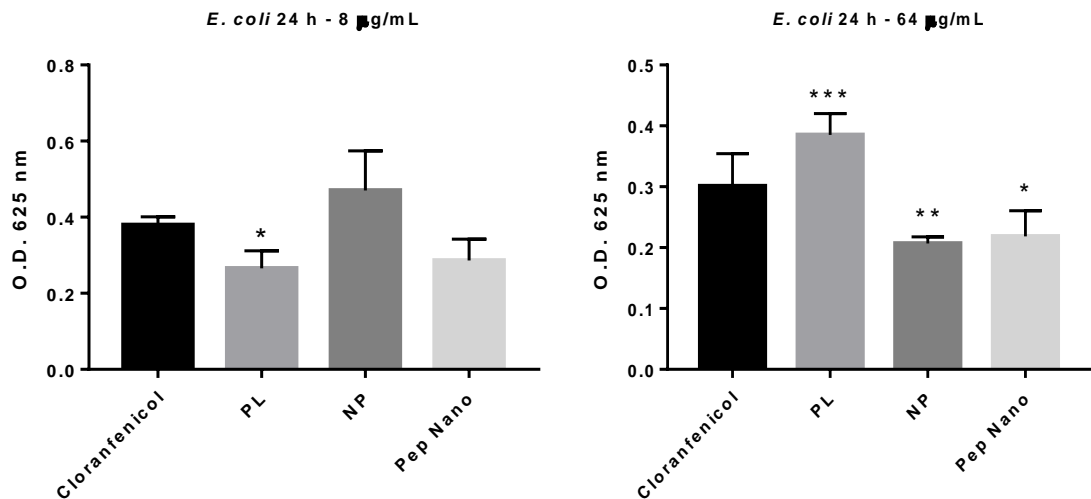


Figura 15: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922, em 24 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

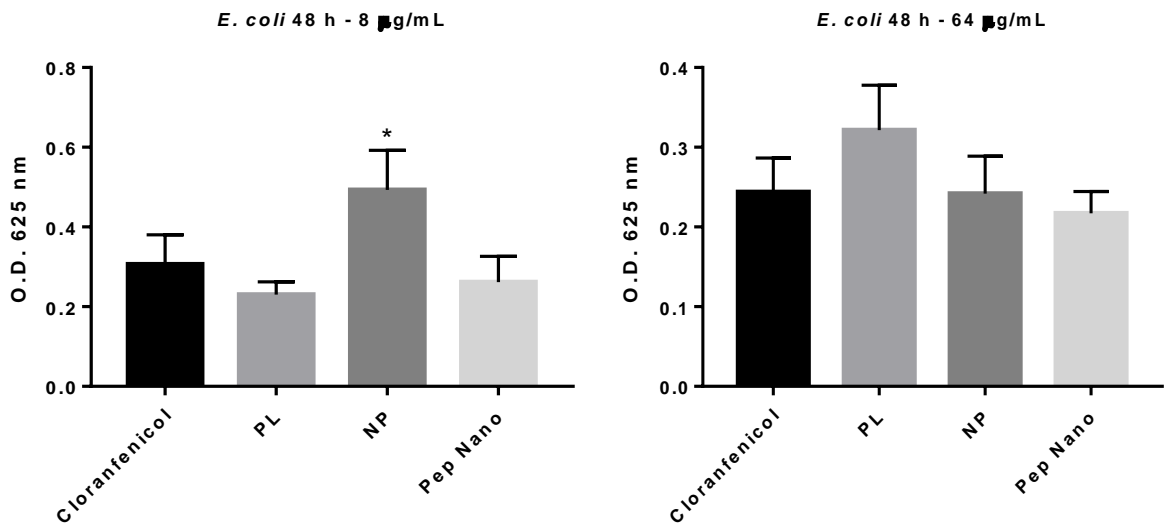


Figura 16: Concentração mínima inibitória (MIC) dos tratamentos dos ensaios antimicrobianos de *E. coli* ATCC 25922, em 48 horas. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 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 e 48 h. Foram testadas apenas as concentrações a partir do MIC, descrito no tópico 5.4.

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 absorvância turbidimétrica. Se estivessem inviáveis não cresceriam mais, apresentando a mesma absorvância ou então valores ainda menores.

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

5.5.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

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

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

<i>E. coli</i> ATCC 25922					
Hora	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo 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) 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 $\mu\text{g/mL}$ e bactericida em 128 $\mu\text{g/mL}$. Em 48 h, ambas concentrações apresentaram efeito bactericida.

5.5.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Os resultados em relação a ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos para *S. aureus* estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 e 48 h em *S. aureus*.

S. aureus ATCC 29213					
Hora	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	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) dos ensaios antimicrobianos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O cloranfenicol apresentou o mesmo comportamento em 24 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 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.

5.5.3 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Os resultados em relação a ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos para *S. epidermidis* estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12: Ação bactericida ou bacteriostática dos tratamentos em 24 e 48 h em *S. epidermidis*.

<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228					
Hora	Concentração (µg/mL)	Cloranfenicol	Nanopartícula Livre	Peptídeo Livre	Peptídeo Nanoencapsulado
24	8	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
48	8	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	16	Bactericida	-	Bactericida	Bacteriostático
	32	Bactericida	-	Bactericida	Bactericida
	64	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida
	128	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida

(-) Não corresponde a concentração mínima inibitória (MIC) dos ensaios antimicrobianos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O cloranfenicol e o peptídeo livre apresentaram ação bactericida em todas as concentrações, tanto em 24 h quanto em 48 h.

Já a nanopartícula livre apresentou ação bacteriostática, tanto em 24 quanto em 48 h.

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

5.6 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 e 48 h de exposição das células ao peptídeo livre, a nanopartícula livre e ao peptídeo nanoencapsulado, nas menores concentrações, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$. 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 $\mu\text{g/mL}$ e em ambas as concentrações, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$, 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 crescidas 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 e 48 h estão representados nas Figura 17 e Figura 18.

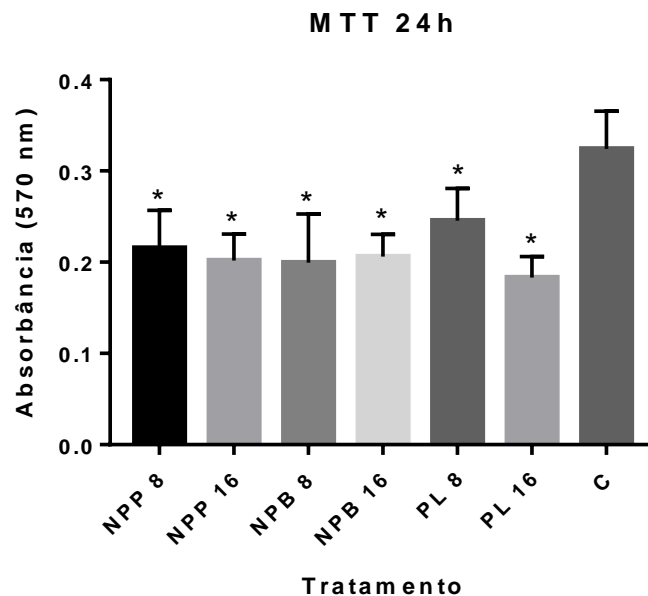


Figura 17: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 24 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPB 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.

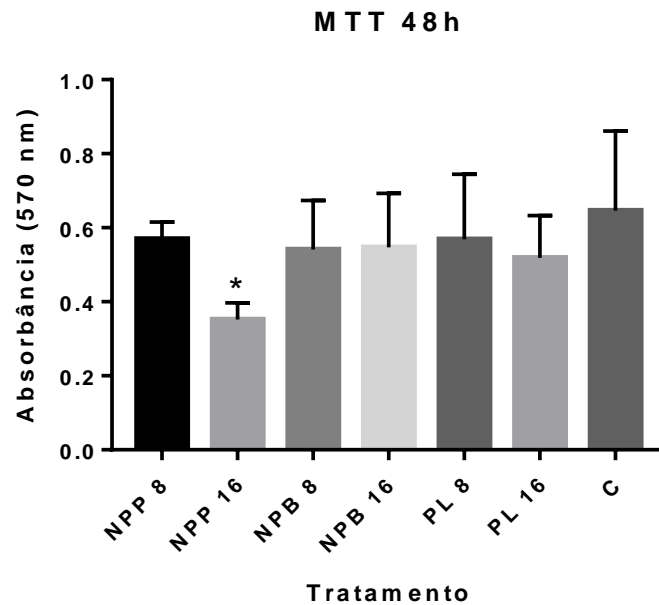


Figura 18: Resultados do MTT realizado em células HEK293, em 48 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados ao controle negativo pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPB 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 19 e Figura 20).

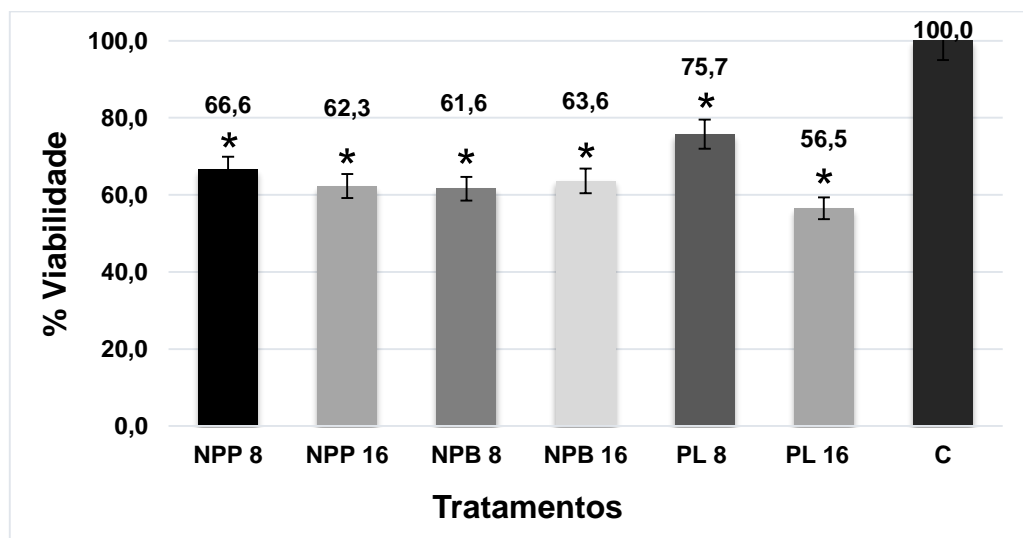


Figura 19: Viabilidade celular em 24 h. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$; NPB 16: nanopartícula livre na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$; PL 8: peptídeo

livre na concentração de 8 µg/mL; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 µg/mL; C: controle.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

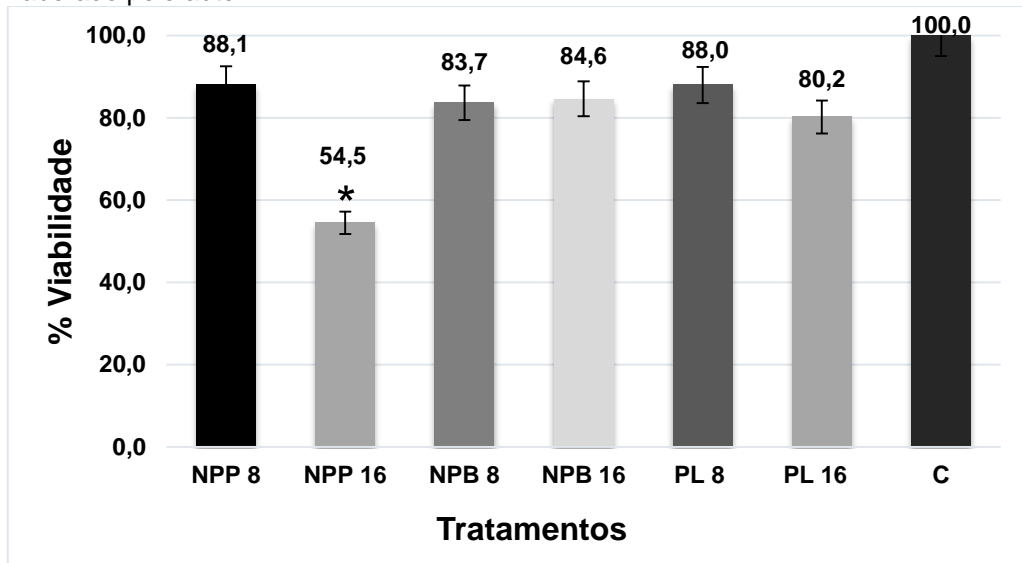


Figura 20: Viabilidade celular em 48 h. NPP 8: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 8 µg/mL; NPP 16: peptídeo nanoencapsulado na concentração de 16 µg/mL; NPB 8: nanopartícula livre na concentração de 8 µg/mL; NPB 16: nanopartícula livre na concentração de 16 µg/mL; PL 8: peptídeo livre na concentração de 8 µg/mL; PL 16: peptídeo livre na concentração de 16 µg/mL; C: 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 µg/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 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 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 do peptídeo, agindo de forma sinérgica (AHMED e ALJAEID, 2016).

A síntese de nanopartículas 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. A quitosana é uma molécula insolúvel em água, e seu ponto isoelétrico é 6,5. Dessa forma, apenas em meio ácido ela é capaz de liberar os grupamentos amino protonados, 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, e Piras et al. (2015b) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 75% com o peptídeo temporin B, valor inferior ao obtido neste trabalho.

Em relação ao tamanho médio das nanopartículas livre e nanoestruturadas com o peptídeo Lrot3.6, 196 nm e 228 nm, respectivamente, foram semelhantes aos resultados obtidos por Ding et al. (2017), que também produziram nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica de aproximadamente 211 nm, valores próximos aos alcançados neste trabalho. O tamanho obtido é o ideal para utilização em *drug delivery*, que apresentam tipicamente nanopartículas com diâmetros na ordem de 200 nm (MASARUDIN et al., 2015).

Além disso, obteve-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) de tamanho entre a nanopartícula livre e nanoencapsulada com o peptídeo. 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 das nanopartículas formadas. Está relacionado a distribuição de tamanhos na amostra. Amostras com maiores variedades de tamanho possuem maiores valores de PDI. Amostras com menores variedades ao contrário, possuem valores de PDI mais baixos. Os valores de PDI variam de 0 a 1. Os valores obtidos neste trabalho para o PDI foram 0,356 e 0,398. Valores no intervalo de 0,08 a 0,7 são considerados valores intermediários de PDI, e é a faixa em que os algoritmos de distribuição melhor trabalham (MALVERN, 2017). Dessa forma, a análise dos valores dos índices de polidispersão (PDI) das nanopartículas livres e nanoformuladas com o peptídeo Lrot3.6 produzidas neste trabalho demonstram que a maioria das partículas

apresentam pouca variedade de tamanho, certificando a qualidade da síntese realizada.

O potencial Zeta corresponde a carga superficial das partículas e está relacionado a manutenção da estabilidade das suspensões coloidais (AHMED e ALJAEID, 2016). Valores que determinam estabilidade e instabilidade de suspensões estão dentro do intervalo de +30 mV e -30 mV. 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 (MALVERN, 2017). Os valores obtidos foram maiores que +30 mV, certificando a estabilidade das suspensões formadas.

Observou-se que o potencial Zeta do peptídeo nanoencapsulado não apresentou diferença significativa em relação ao da nanopartícula livre. Isso pode ser explicado devido ao pequeno tamanho do peptídeo. O potencial Zeta é dado devido ao potencial de cargas entre a superfície da partícula e do líquido dispersante, que varia de acordo com a distância da superfície da partícula (MALVERN, 2017). Como o peptídeo é muito pequeno, não é capaz de promover grandes diferenças em relação a carga superficial da partícula, a ponto de causar diferenças significativas nos valores de potencial Zeta.

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 µg/mL. Apenas na *E. coli* apresentou ação bactericida, sendo considerado em 24 h o melhor tratamento, com menores níveis de absorbância. Em *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram ação bacteriostática.

O mecanismo exato da atividade antibacteriana da quitosana ainda deve ser completamente elucidado. No entanto, a maioria dos estudos indicam que 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 (DYVIA et al., 2017). Essas proposições podem ser realizadas em relação ao efeito das nanopartículas de quitosana neste trabalho. Como a nanopartícula livre atuou decrescendo seus níveis de absorbância 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 fosfolipídios de membrana, impedindo a entrada de substâncias na célula. Isso explica o efeito bactericida observado em *E. coli*. Além disso, observou-se também a ação bacteriostática em ambas bactérias gram-positivas, sugerindo que nessas bactérias a quitosana apresente ação intracelular, devido, provavelmente, a maior dificuldade de ocasionar rupturas na parede celular bacteriana espessa de bactérias gram-positivas. Os resultados deste trabalho demonstraram que a quitosana apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, apresentando atividade em todas as bactérias, gram-positivas e gram-negativas.

O peptídeo Lrot3.6 livre demonstrou ser eficaz na inibição do crescimento de todas bactérias, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, apresentando ação a partir da menor concentração, de 8 µg/mL, e amplo espectro de ação. Tavares (2015) já havia testado a eficiência do peptídeo Lrot3.6 sobre essas mesmas estirpes bacterianas, obtendo altos valores de inibição sobre o crescimento bacteriano. Esses resultados foram corroborados neste estudo, com inibição do crescimento bacteriano para todas as bactérias testadas.

O peptídeo, em *E. coli* e *S. epidermidis*, apresentou ação bactericida em todas as concentrações, apresentando ação bacteriostática apenas em *S. aureus*. Sua capacidade bactericida pode ser explicada por sua conformação. Sua estrutura em α -hélice sugere que seu mecanismo de ação seja diretamente na membrana, agindo como um peptídeo disruptivo de membrana que, geralmente, possuem ação bactericida (NGUYEN et al., 2011). No entanto, devido ao pequeno tamanho, também podem penetrar através dos poros da membrana bacteriana sem causar sua ruptura e se ligarem a proteínas e enzimas citoplasmáticas, alterando funções metabólicas dos microrganismos e demonstrando, dessa forma, mecanismos de ação intracelulares, com ação bacteriostática (KANG et al., 2014).

Ainda em relação aos peptídeos livres, observou-se que houveram concentrações intermediárias em *E. coli* e *S. epidermidis* que apresentaram aumento na absorbância turbidimétrica e conseqüente diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao cloranfenicol, permitindo o crescimento bacteriano. Sugere-se que isso possa ser explicado devido a hidrofobicidade do peptídeo Lrot3.6. Yin et al. (2012) demonstraram em seu estudo 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 consequente 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, penetrando nos poros e causando o extravasamento celular, e consequente morte das bactérias. 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. A medida que há absorção de água pela nanoesfera, há a degradação da matriz polimérica da quitosana e liberação do peptídeo, permitindo a liberação de pequenas quantidades do peptídeo ao longo do tempo, suficientes para a ação antimicrobiana do peptídeo (AHMED e ALJAEID, 2016).

Em *S. aureus*, o peptídeo nanoencapsulado não diferiu estatisticamente do peptídeo livre na maioria das concentrações. No entanto, foi o melhor tratamento na maior concentração, de 128 µg/mL, em 24 e 48 h, e permitiu uma ação bactericida em todas as concentrações em 24 h, e a partir de 32 µg/mL em 48 h. 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 potencialização dos efeitos antimicrobianos do peptídeo, 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 nanoencapsulação de AMPs, como Water et al. (2015) e Cruz et al. (2017), em que o peptídeo

nanoencapsulado foi mais eficiente que o peptídeo livre. Essa otimização pode ser explicada devido a maior superfície de contato das nanopartículas (FARIA – TISCHER e TISCHER, 2012), facilitando o contato dos peptídeos nas bactérias e, provavelmente, provocando um efeito sinérgico entre a quitosana e o AMP. 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* demonstram-se muito satisfatórios, afirmando 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.

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 a infecções bacterianas. Corroborando com Yadav et al. (2011), a formulação produzida neste trabalho apresentou diversas vantagens em relação aos medicamentos usuais: amplo espectro; garantiram a atividade antimicrobiana do peptídeo Lrot3.6 e até mesmo foi capaz de potencializá-la; permitiram uma liberação prolongada do peptídeo; e não foram citotóxicos 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 ensaios futuros *in vivo*, uma vez que o peptídeo Lrot3.6 livre estará 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 ótima alternativa para proteção e melhora 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 e ideais para *drug delivery*: 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 potencialização 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, bem como foi melhor que o peptídeo livre em algumas concentrações testadas. 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 ótima formulação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

8 PERSPECTIVAS

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

Estudos para a melhor compreensão da interação de peptídeos, nanopartículas e peptídeo nanoencapsulado em relação a seus efeitos antimicrobianos devem ser continuados, para a possibilidade de produção de uma nanoformulação biocompatível para combate de infecções causadas por bactérias resistentes.

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.

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.

DIVYA, 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.

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.

MALVERN. Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing. 2017.

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.

MEDEIROS, K. A. **Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). 2011. 77 f. – Universidade de Brasília, Brasília.

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.

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.

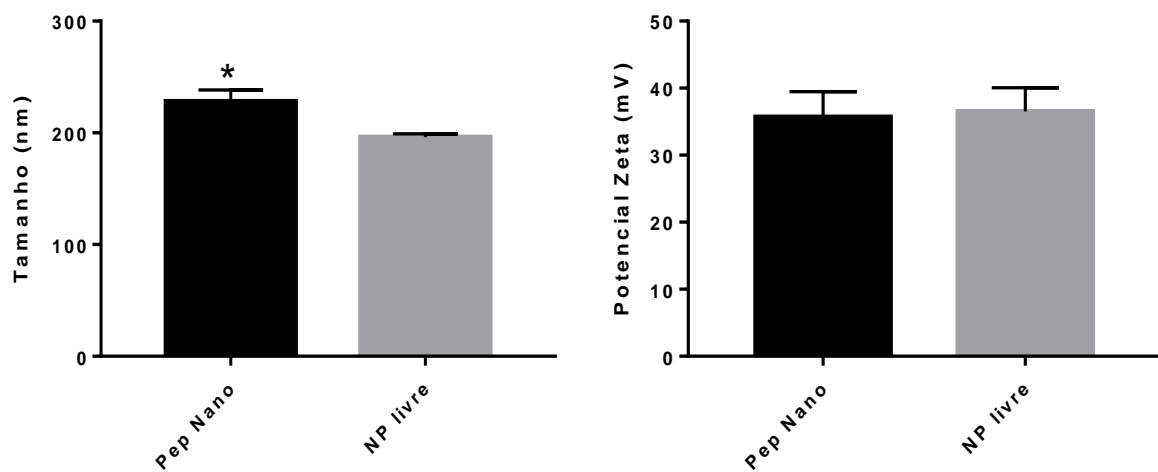
ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; EL HALAL, L. M.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, L. M.; CASTRO, L. A. S.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HÉRNANDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT,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

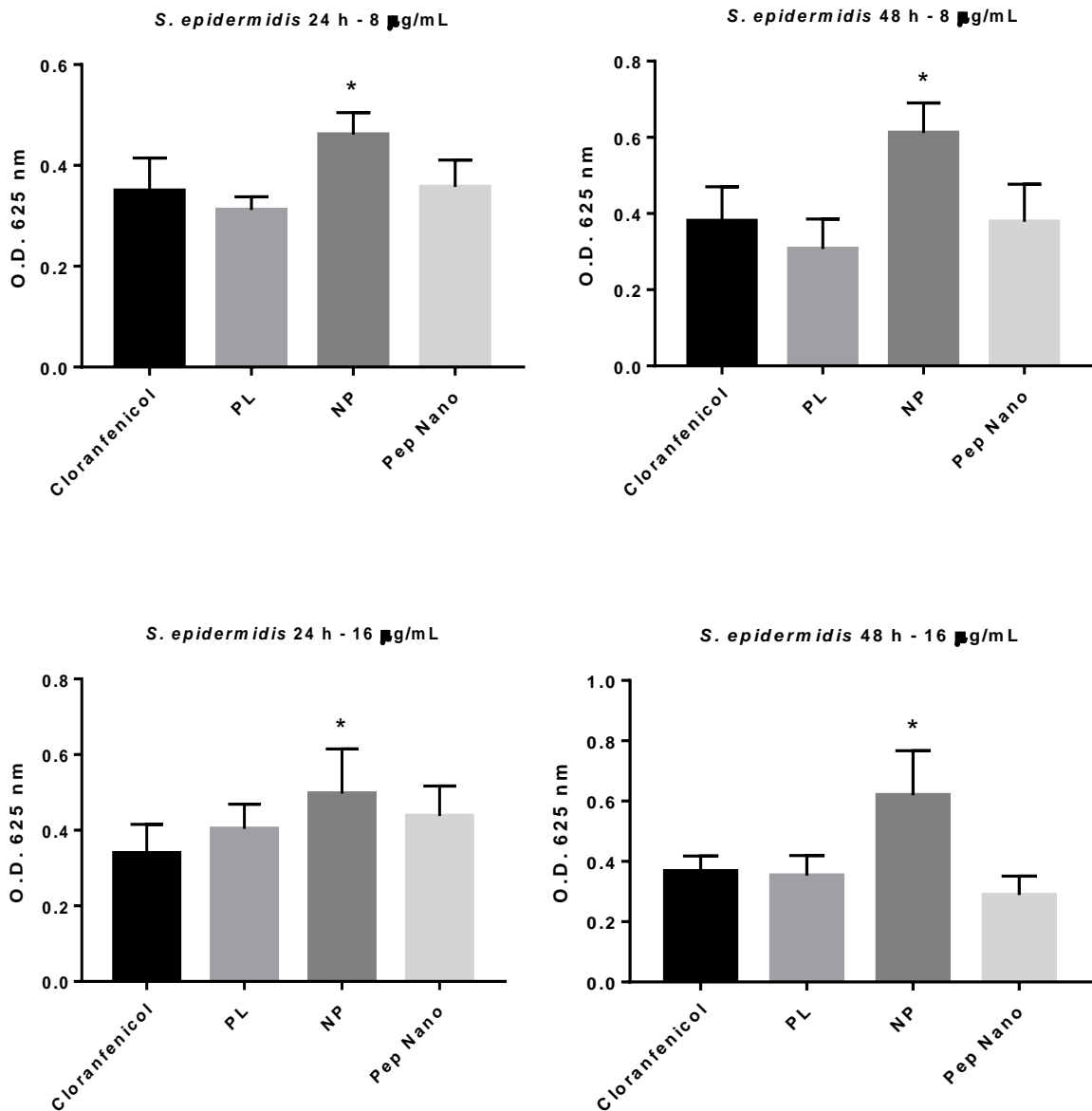
APÊNDICES

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.

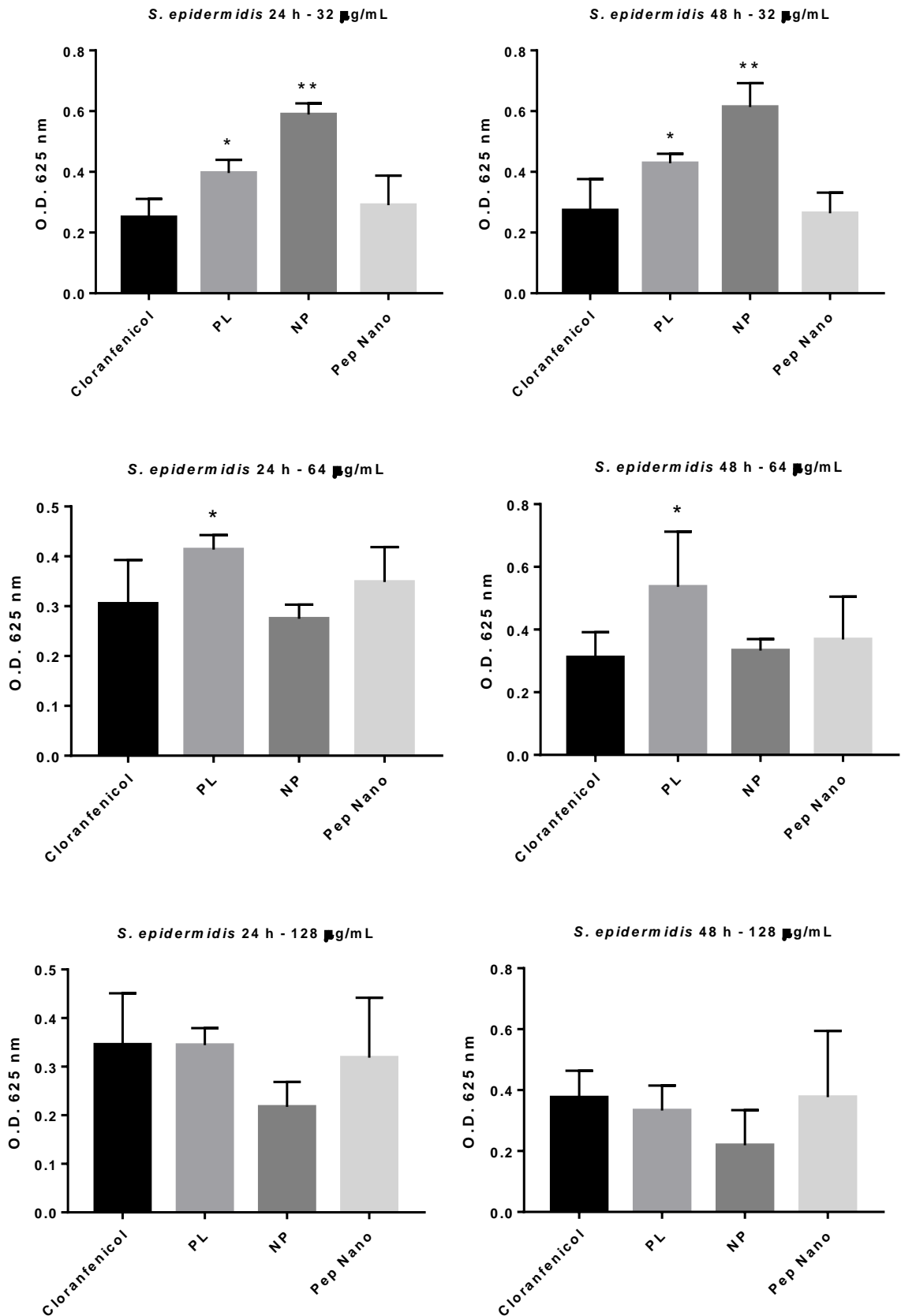


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste t . Pep Nano: Peptídeo Nanoencapsulado. NP livre: Nanopartícula de quitosana livre.

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 e 48 h.

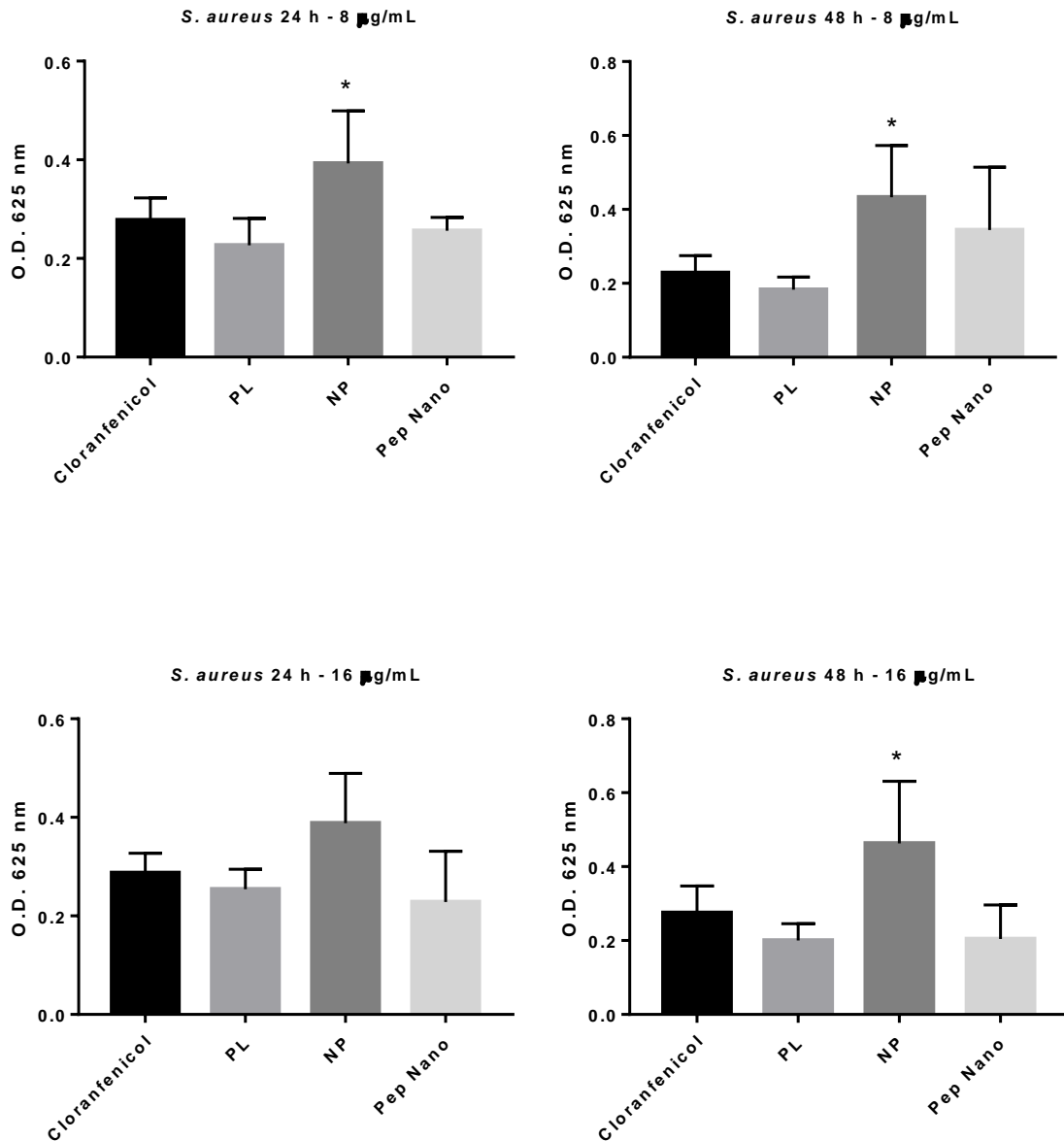


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

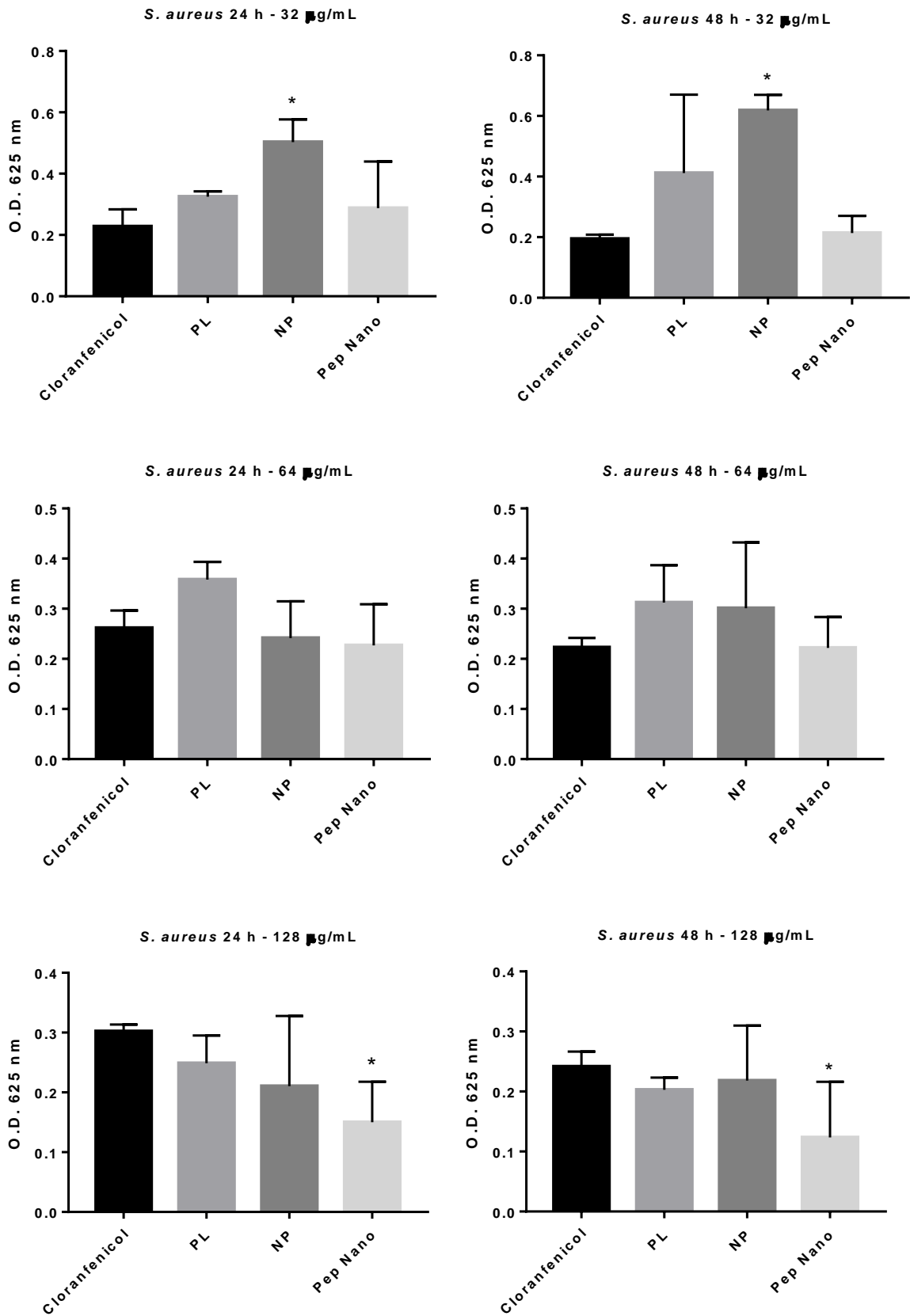


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

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 e 48 h.

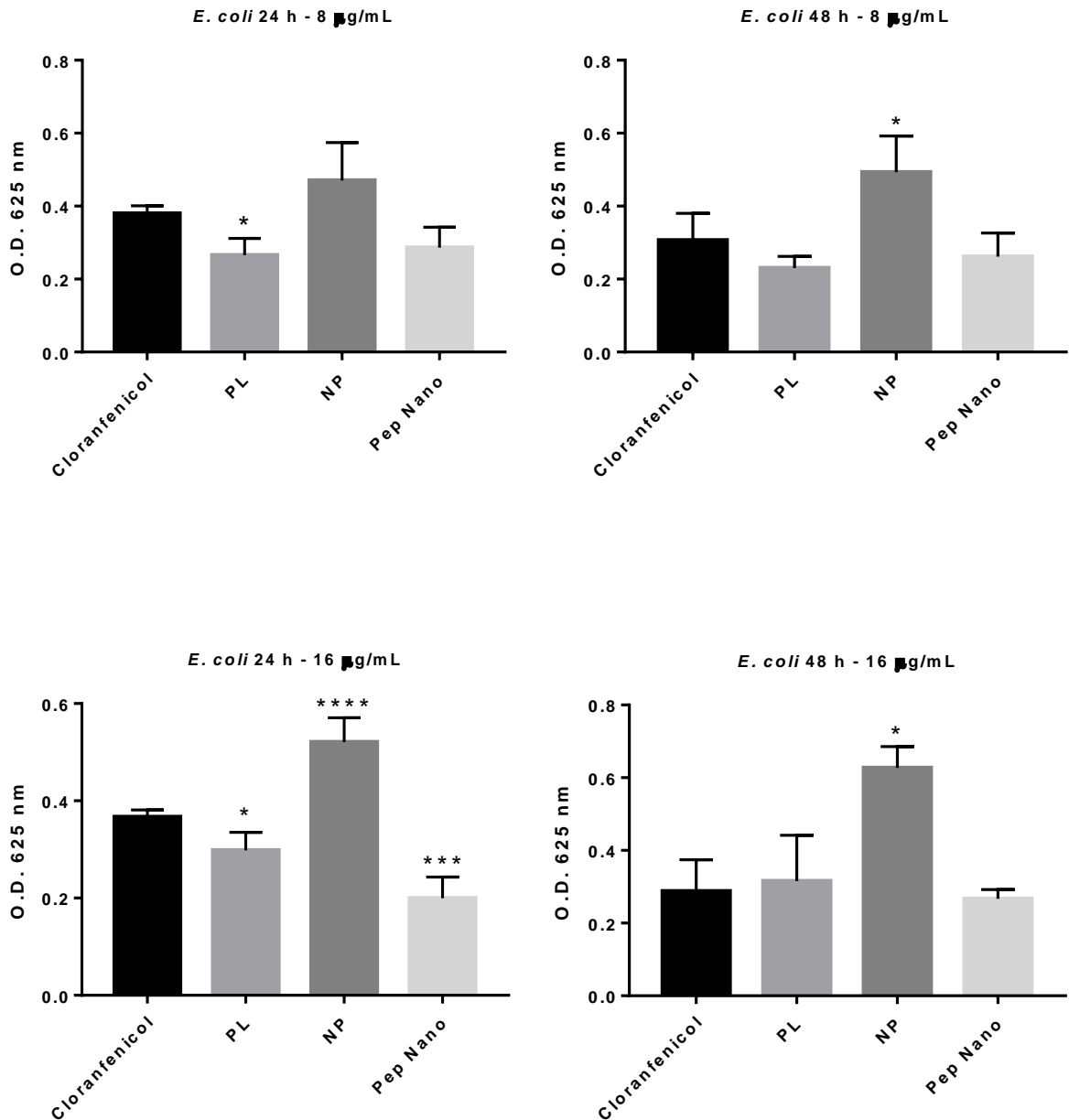


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

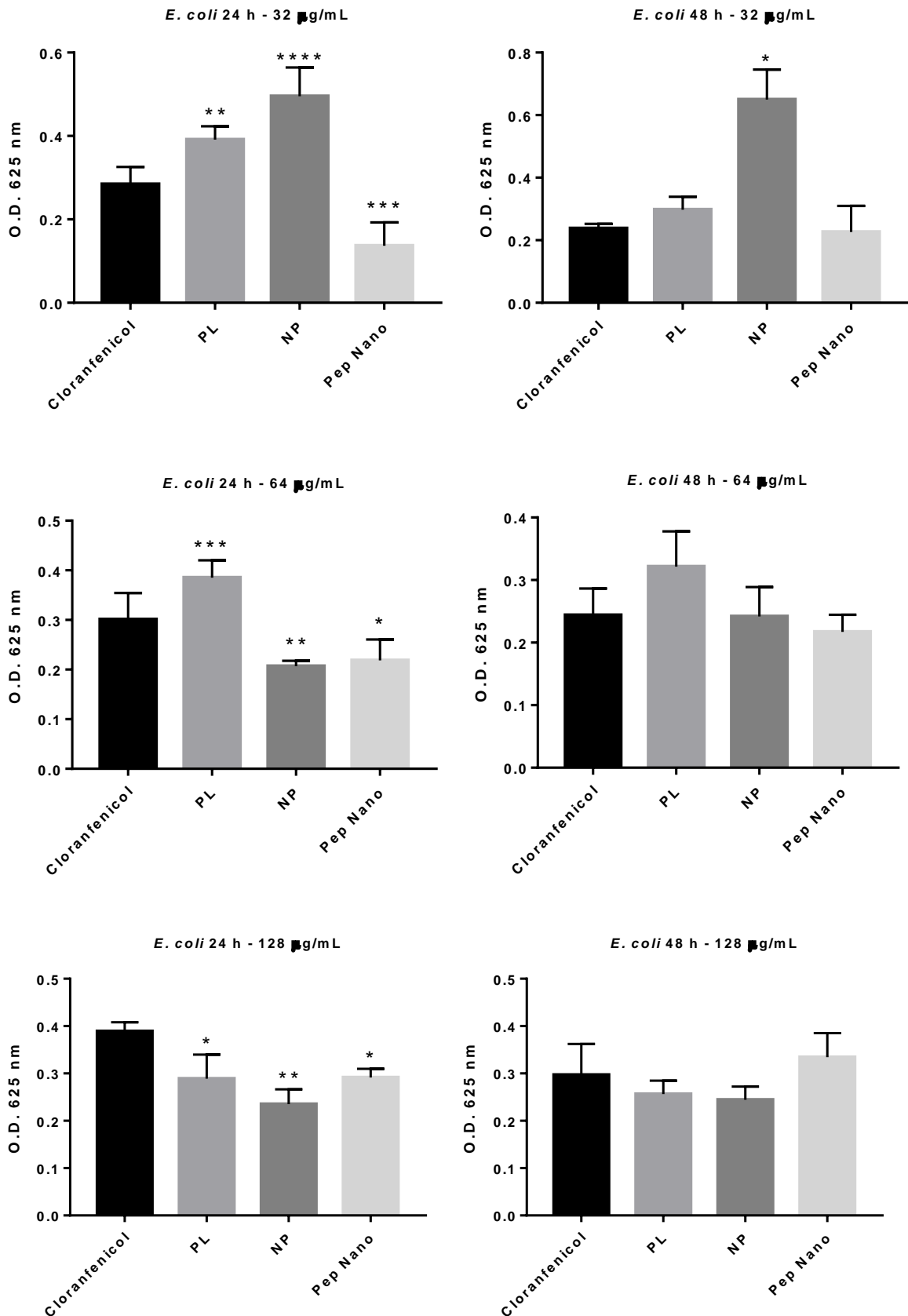


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

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 e 48 h.

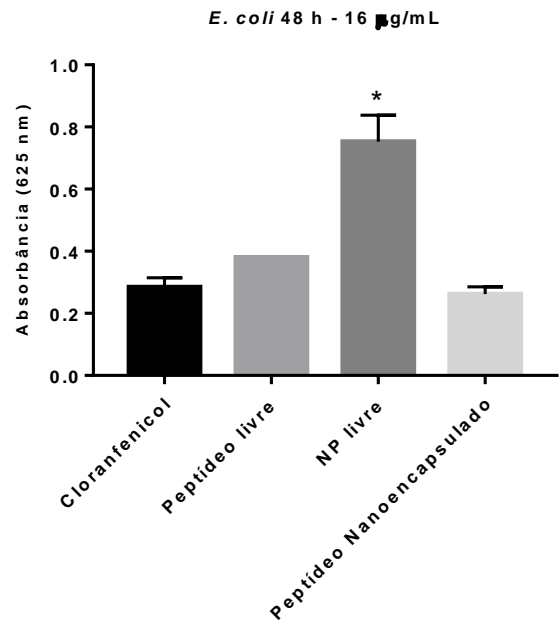
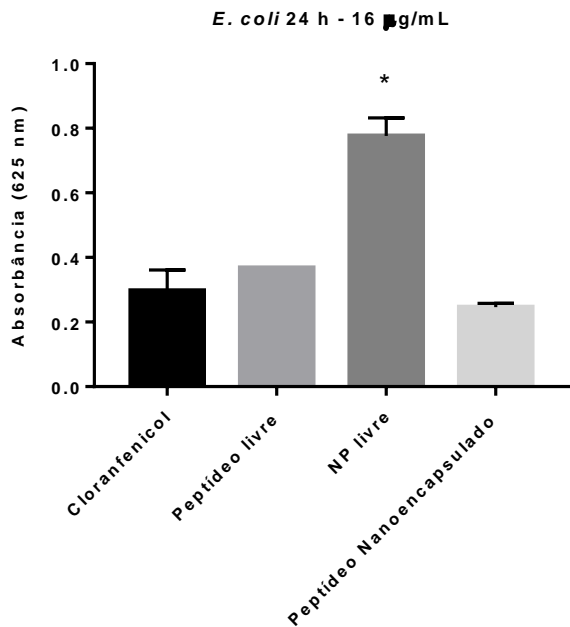
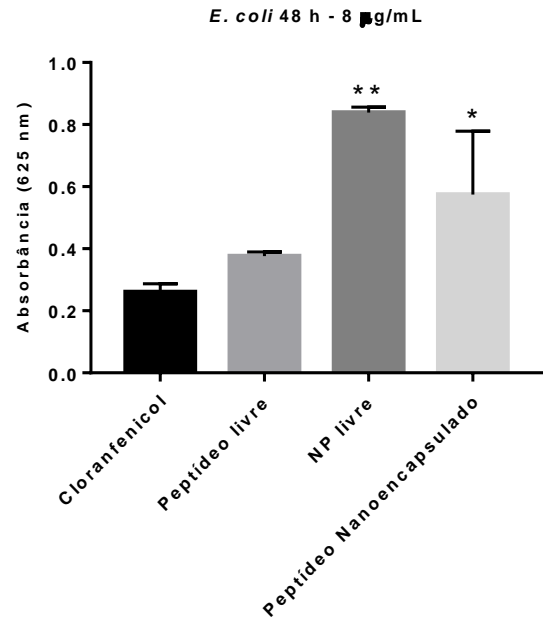
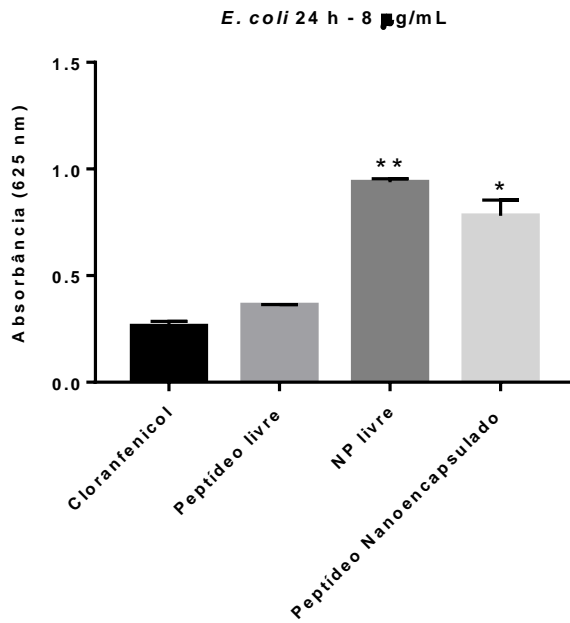


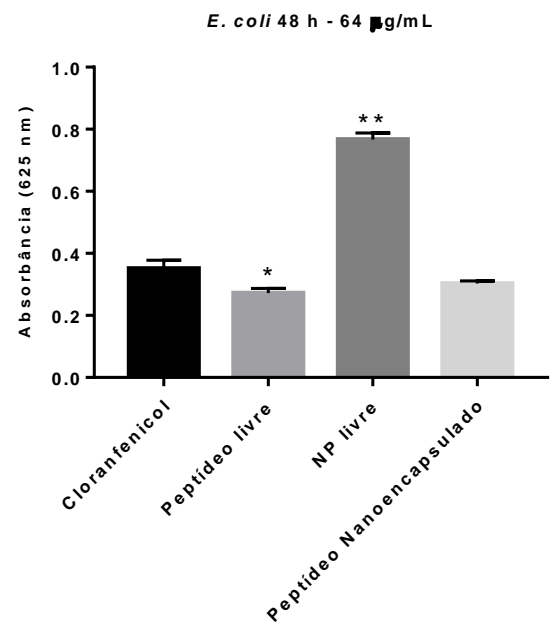
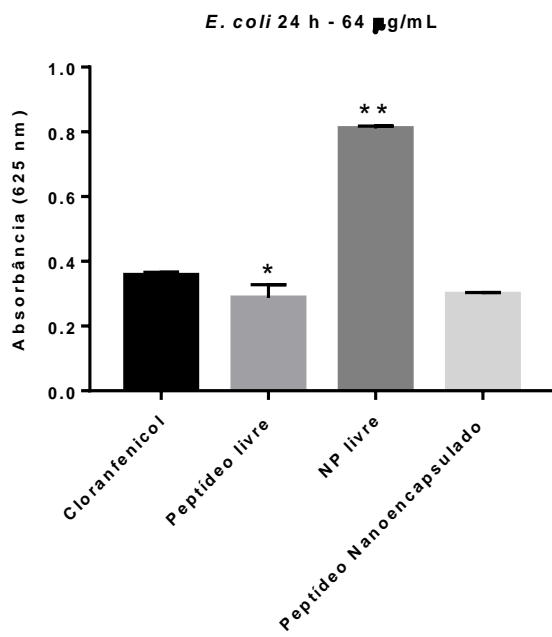
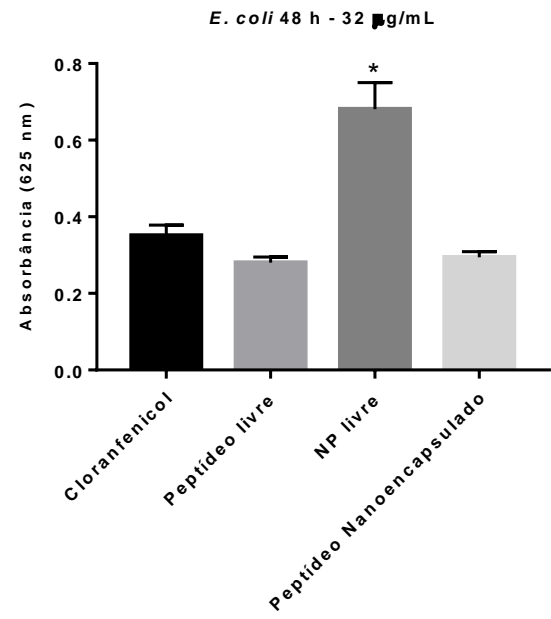
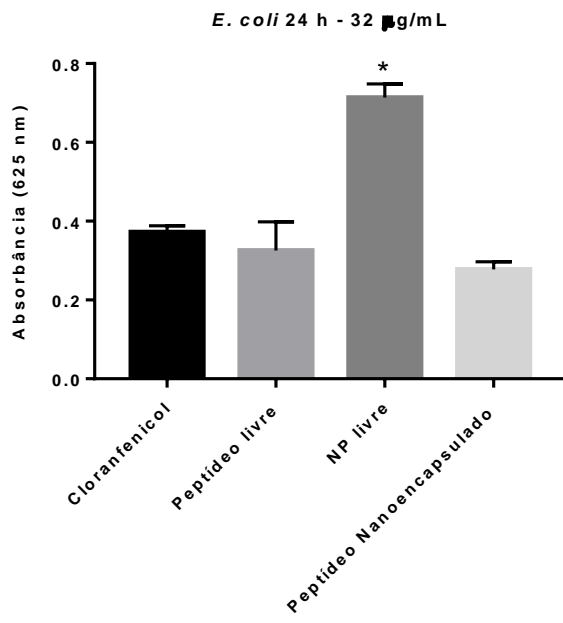
Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

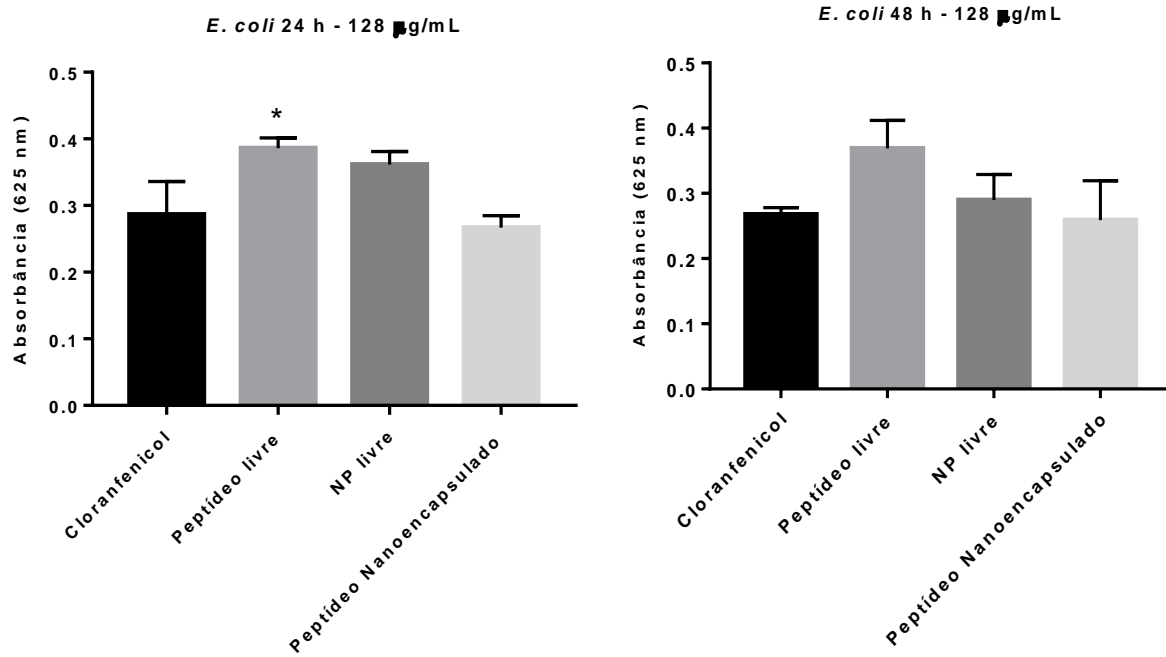


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey. PL: peptídeo livre; NP: nanopartícula de quitosana livre; Pep Nano: peptídeo nanoencapsulado.

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

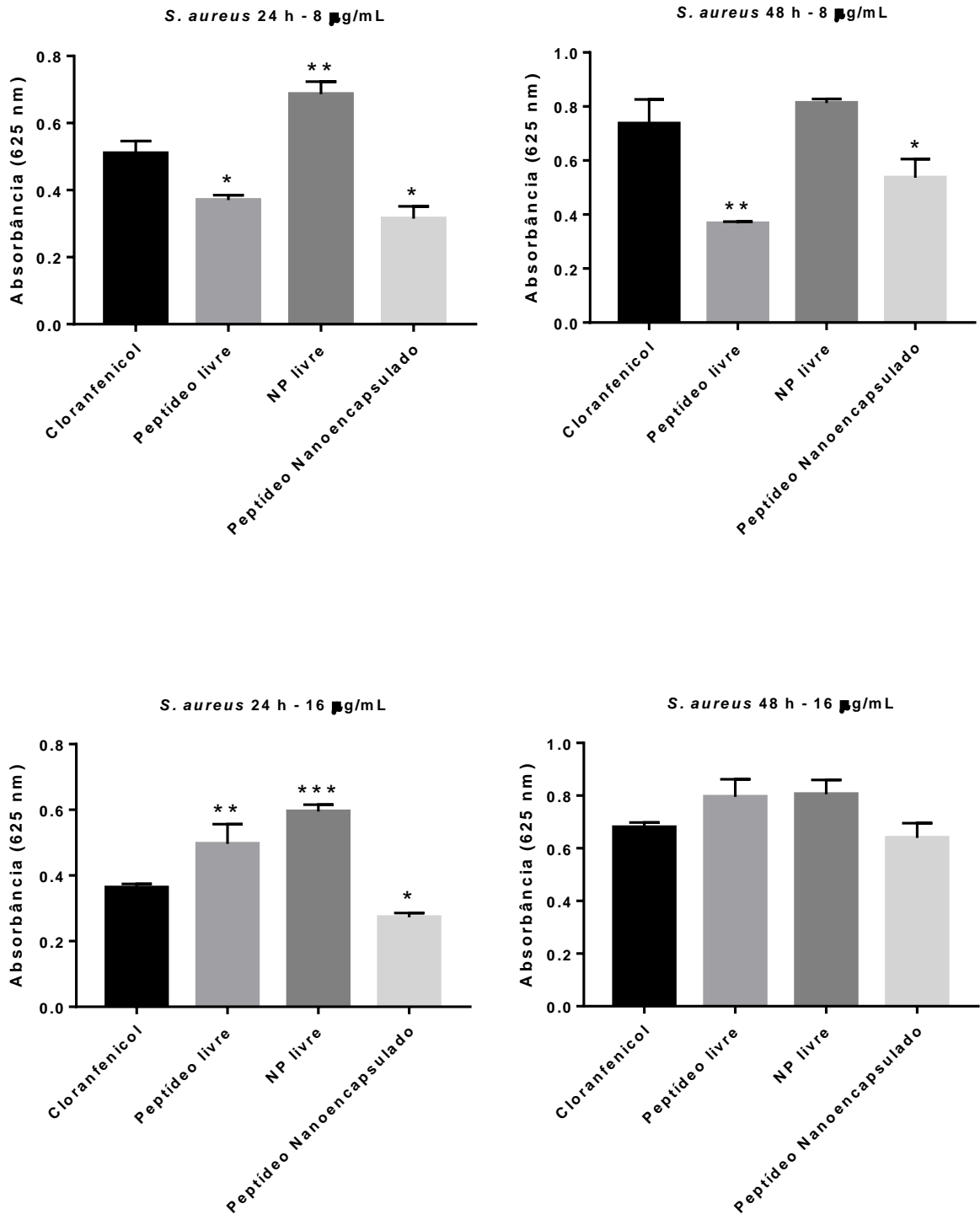


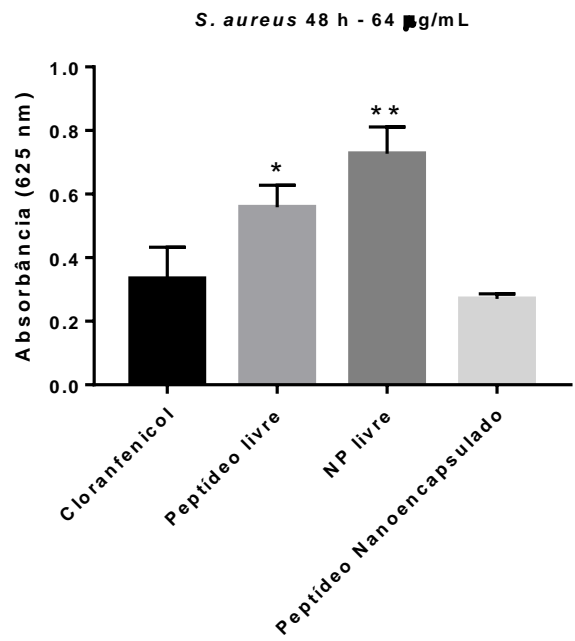
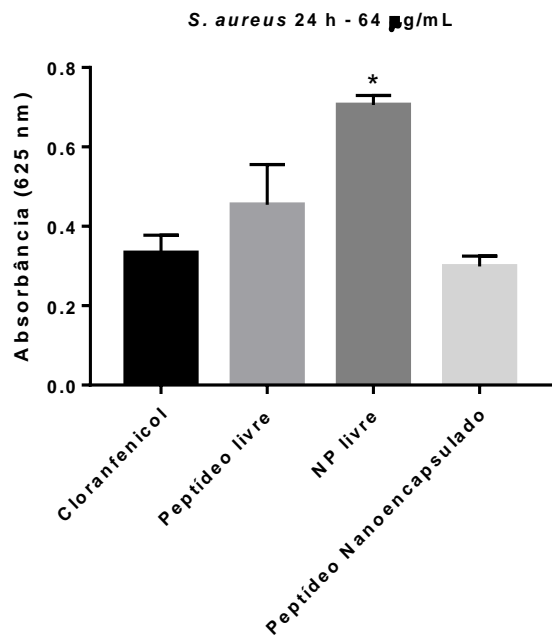
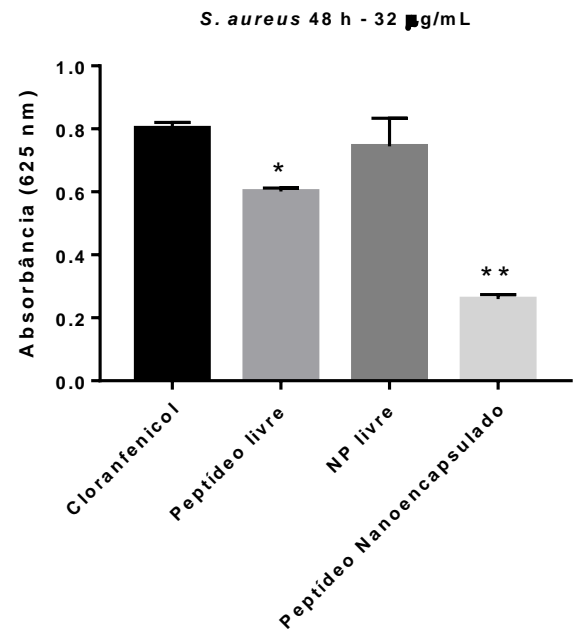
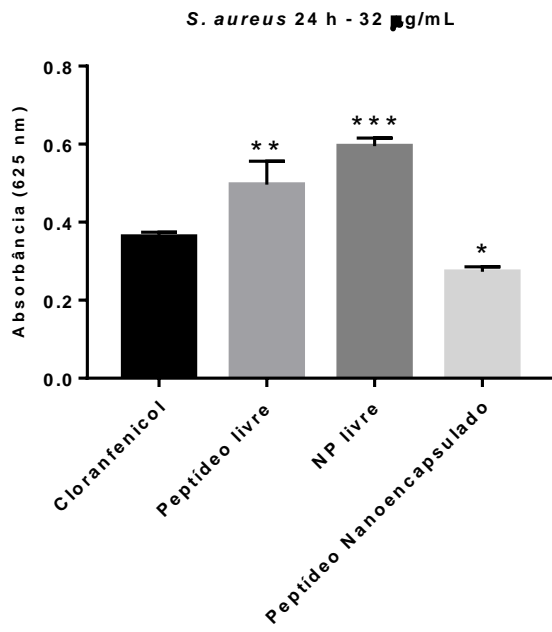


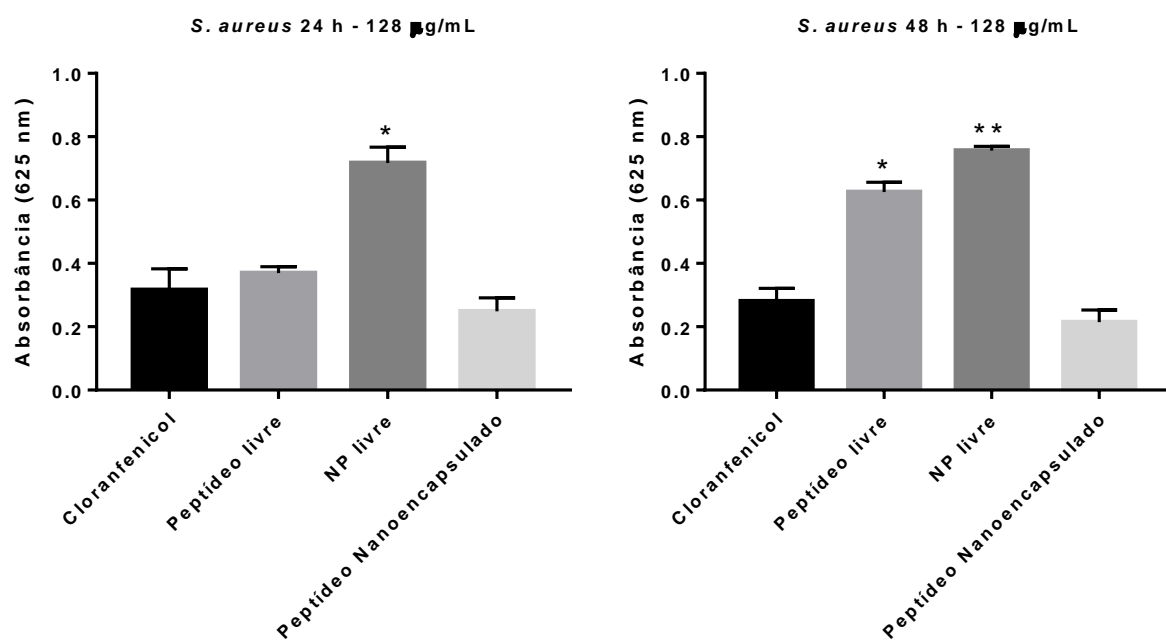


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.

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 e 48 h.

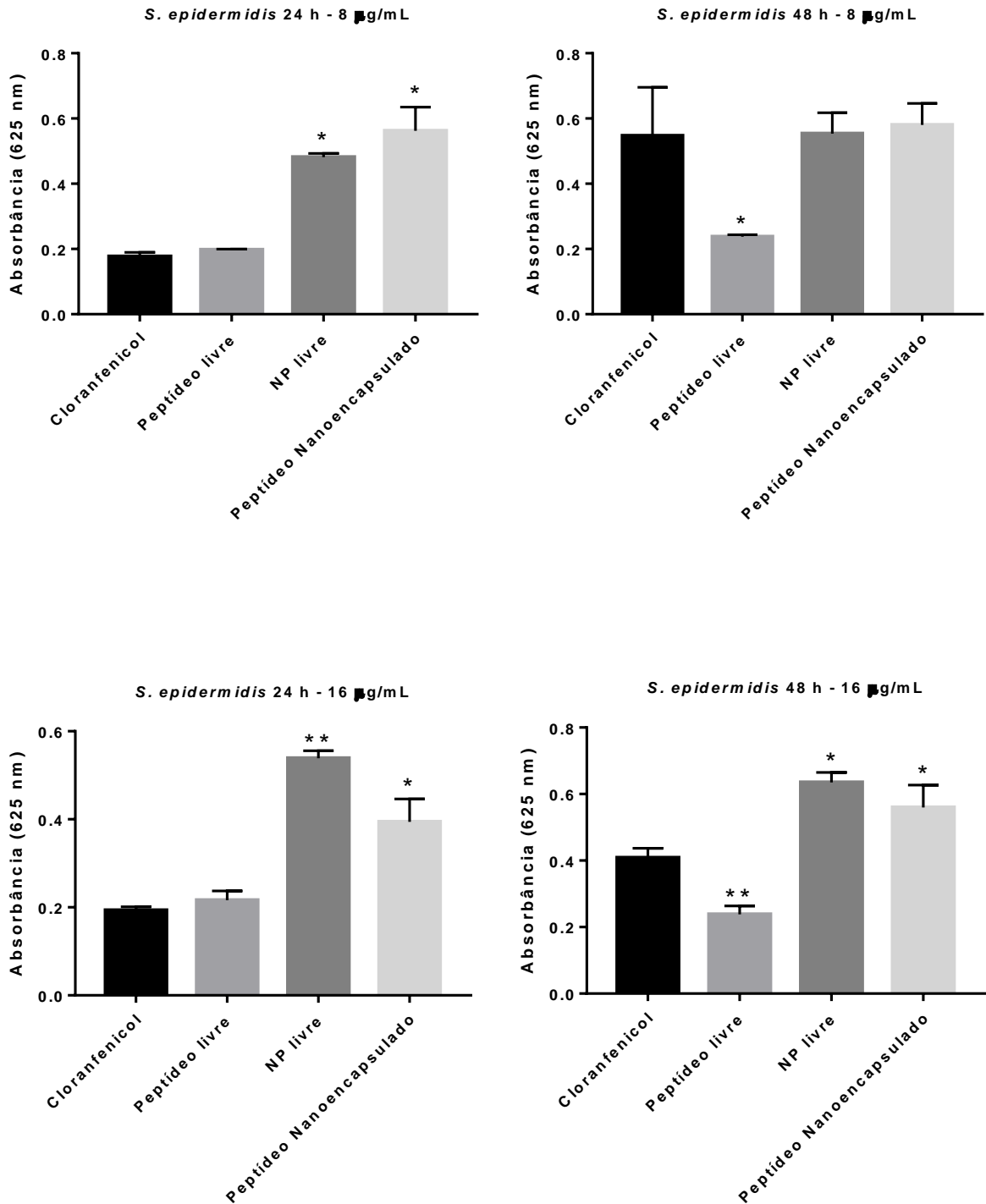


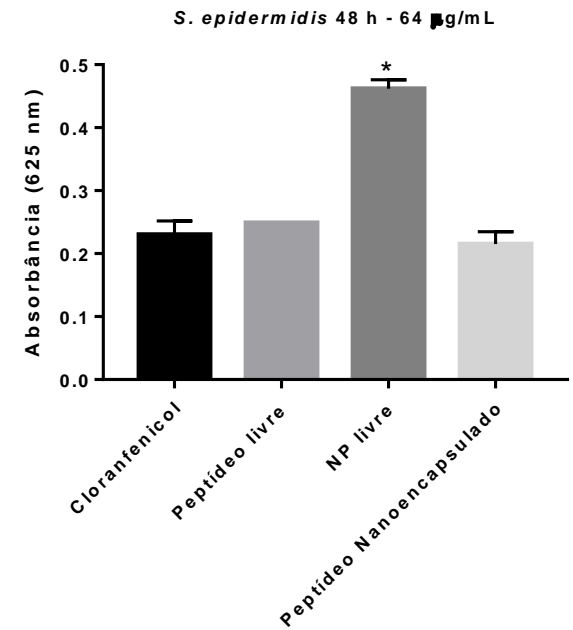
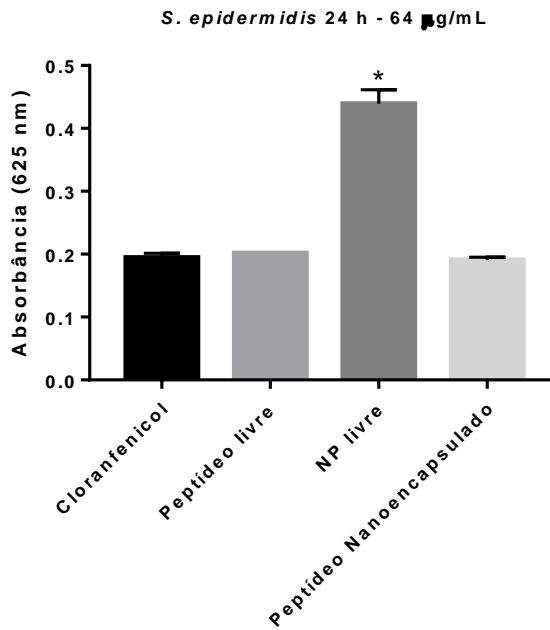
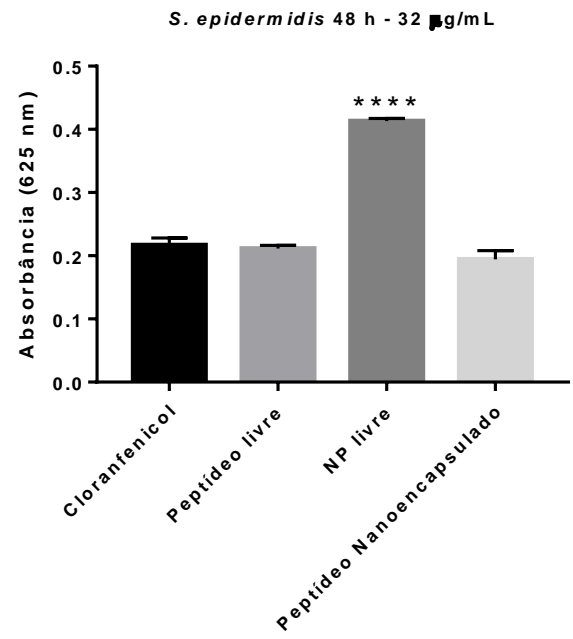
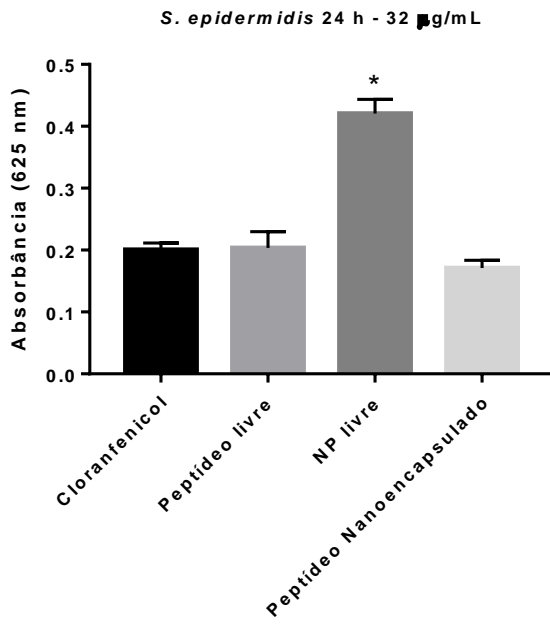


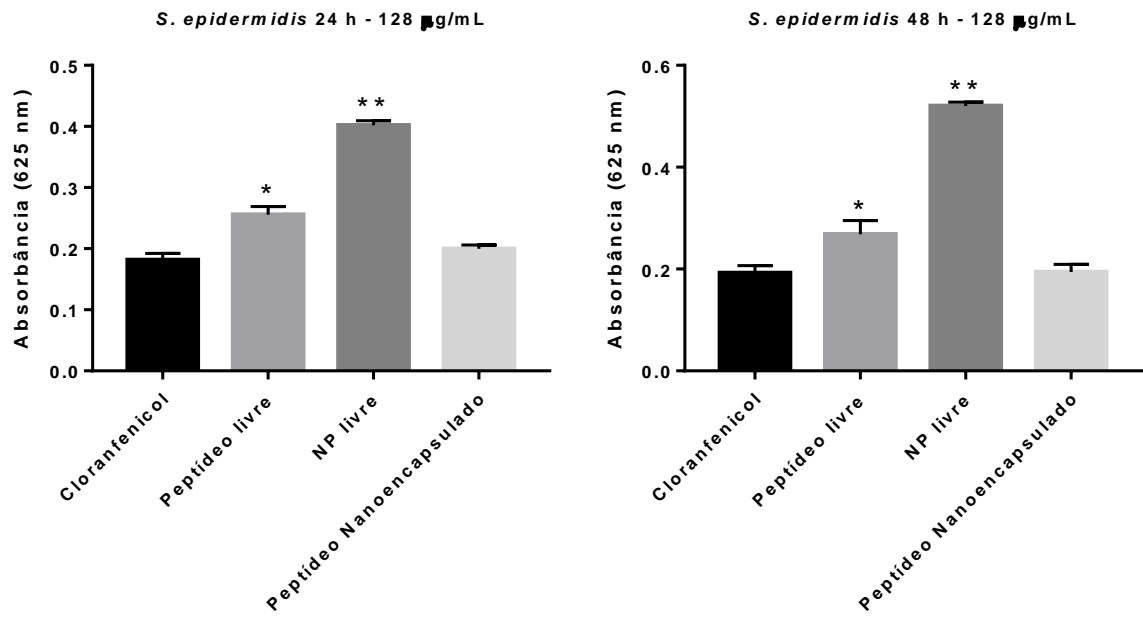


Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.

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







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