

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

Tamirys Silva Barino

**Análise da ação do peptídeo antimicrobiano Lrot3 nanoestruturado
contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis***

Dissertação

JUIZ DE FORA
2017

TAMIRYS SILVA BARINO

**Análise da ação do peptídeo antimicrobiano Lrot3 nanoestruturado
contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus 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: Área: Genética e Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientadora: Michele Munk Pereira

Juiz de Fora

2017

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

Barino, Tamirys Silva.

Análise da ação do peptídeo antimicrobiano Lot3 nanoestruturado contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* / Tamirys Silva Barino. -- 2017. 62 p. : il.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Coorientadora: Michele Munk Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Nanotecnologia. 2. Peptídeo antimicrobiano. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Pereira, Michele Munk, coorient. III. Título.

TAMIRYS SILVA BARINO

Análise da ação do peptídeo antimicrobiano Lrot3 nanoestruturado contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas em Ciências Biológicas,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de
Genética e Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Michele Munk Pereira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Humberto de Mello Brandão
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dra. Letícia Stephan Tavares,
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

JUIZ DE FORA

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, oportunidades, conhecimento adquirido, e principalmente pelos sonhos realizados.

A minha família por todo apoio e mimos durante minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais que desde a infância me incentivaram e continuam a me incentivar aos estudos e a ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus amigos pelas palavras sábias nos momentos que eu precisava e pela companhia que fizeram a caminhada ser mais leve.

Ao prof. Dr. Marcelo de Oliveira pela oportunidade e orientação durante o mestrado.

As profs. Dra. Michele Munk e Dra. Letícia Stephan por toda ajuda, paciência e ensinamentos possibilitando minha especialização.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão pela colaboração.

Aos colegas do laboratório de Genética e Biotecnologia pelo auxílio durante os experimentos.

A Universidade Federal de Juiz de Fora através do Programa de Pós-graduação em Genética e Biotecnologia por abrir as portas para o meu aprimoramento.

A Capes pelo financiamento permitindo que eu me dedicasse exclusivamente ao meu mestrado.

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvane e Valcir, que sempre me incentivaram e me apoiaram, me permitindo chegar até aqui. Por todo amor e carinho que me deram.

RESUMO

Microrganismos patogênicos são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas infecções, e em ambientes hospitalares, levam muitos pacientes ao óbito. Modificar esse quadro é necessário, todavia as bactérias apresentam distintos mecanismos de resistência após mutações em seu DNA. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos gera continuamente a seleção natural e propagação de cepas mais resistentes fazendo com que os antibióticos percam sua eficácia com o passar dos anos. Diante desse panorama, a elaboração de um nanocarreador contendo peptídeos antimicrobianos (PAMs ou AMPs do inglês *Antimicrobial Peptides*) torna-se uma interessante alternativa contra bactérias patogênicas. O objetivo deste trabalho foi sintetizar nanoesferas de alginato de sódio pelo método de Gelificação Ionotrópica para a entrega de AMPs Lrot3 às células bacterianas de *Escherichia Coli* 25922 e *Staphylococcus epidermidis* 12228. A atividade antimicrobiana dos peptídeos livres e nanoestruturados (128, 64, 32, 16, 8 e 4µg/mL), foi avaliada por meio da concentração mínima inibitória (MIC), e o potencial citotóxico investigado em células HEK 293 humanas utilizando o ensaio de MTT (Tetrazólio de azul de tiazolilo). Os dados foram avaliados por ANOVA e as médias comparada pelo teste de Tukey. Para a bactéria *E. coli* 25922, o peptídeo livre na concentração de 64 µg/mL destacou-se por ser a única concentração com atividade antimicrobiana significativa ($P < 0,01$), apresentando ação similar ao do cloranfenicol (128 µg/mL e 64 µg/mL). As nanopartículas contendo AMPs, por sua vez, mostraram-se eficazes em todas as concentrações ($P < 0,01$). Diferentemente se deu no *S. epidermidis* 12228, onde observou-se maior resistência da bactéria a todos tratamentos. Os resultados do MTT sugerem que as nanopartículas de alginato não apresentam citotoxicidade *in vitro*, motivando a continuidade deste estudo. Concluindo, os AMPs nanoestruturados tem potencial para serem utilizados no combate a infecções ocasionadas por *E. coli*.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, nanopartículas, bactérias patogênicas

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms are responsible for the development of various infections, particularly in hospital environment, leading to death in many patients. It is therefore necessary to change this scenario, it is difficult, however, because the bacteria have very distinct resistance mechanisms after mutations in their DNA. Furthermore, the indiscriminate use of antibiotics continuously generates the selection and propagation of more resistant strains, causing loss of effectiveness of antibiotics over the years. In this case, the development of a nanocarrier containing Antimicrobial Peptides (AMPs) becomes an interesting alternative against pathogenic bacteria. This paper aims to synthesize the delivery of AMPs to bacterial cells of *Escherichia coli* 25922 and *Staphylococcus epidermidis* 12228 through the use of nanospheres of sodium alginate by ionotropic gelation method. Alginate stands out for being a polyanionic, biodegradable and biocompatible polymer, which show interaction with Lrot3 cationic AMP. The antimicrobial activity of free and nanostructured peptides (128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the cytotoxic potential investigated in human HEK 293 cells using the MTT Assay (Tetrazolium thiazolyl blue). The data were evaluated by ANOVA and the means compared by Tukey test. For Gram-negative *E. coli* 25922 bacteria, the free peptide at concentration of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stood out for being the only concentration with significant antimicrobial activity ($P < 0,01$), showing similar action to the chloramphenicol, at concentrations of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. NPs, in turn, showed inhibitory activity at all concentrations ($P < 0,01$). Unlike occurred in *S. epidermidis* 12228, which was observed more bacterial resistance to all treatments. The MTT data suggest that alginate nanoparticles do not exhibit *in vitro* cytotoxicity, encouraging the continuation of this study. In conclusion, the nanostructured AMPs has the potential to be used to fight infections caused by *E. coli*.

Keywords: Antimicrobial peptides, nanoparticles, pathogenic bacteria

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração diferenciando a estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas..... **16**
- Figura 2.** Modelos representando as diferenças estruturais entre os AMPs. A) Peptídeo com estrutura α -hélice. B) Peptídeo com estrutura β -folha. C) Peptídeos estendidos..... **20**
- Figura 3.** Principais modelos de mecanismos de ação dos AMPs sobre membranas biológicas. A) Modelo do tapete. B) Modelo do barril. C) Modelo do poro toroidal. D) Modelo do agregado micelar - efeito detergente gerado pela alta concentração de AMPs no local. E) Agregados micelares formados pelo rompimento da membrana celular..... **22**
- Figura 4** – Modelagem do peptídeo antimicrobiano Lrot3 mostrando o perfil eletrostático do mesmo. Azul: representam regiões catiônicas, Vermelho: representam regiões aniônicas..... **25**
- Figura 5.** Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas. A esquerda: Nanocápsula com o fármaco dissolvido em núcleo oleoso. A direita: Nanoesfera com o fármaco disperso por toda a matriz..... **27**
- Figura 6.** Efeito Tyndall em suspensão coloidal de nanopartículas de alginato..... **39**
- Figura 7.** Representação do tamanho e diâmetro das nanopartículas sintetizadas pelo método de Gelificação Ionotrópica..... **40**
- Figura 8.** Estabilidade coloidal de nanopartículas de alginato de cálcio por potencial Zeta..... **41**
- Figura 9.** Variação do pH da suspensão coloidal de nanopartículas de alginato em função do tempo e temperatura..... **42**
- Figura 10.** Absorbância média da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* exposta ao peptídeo Lrot3 livre e nanoestruturado em diferentes concentrações por 24 horas a 37°C. *Inoc: Inóculo, Clor: Cloranfenicol, PL: Peptídeo livre, NPB: Nanopartícula branca, NP: Nanopartícula contendo o peptídeo. Os números indicam as respectivas concentrações em $\mu\text{g/mL}$. Cloranfenicol como controle positivo. Inóculo como controle negativo. DMSO como controle negativo relativo. * $p < 0.01$ quando comparado ao Inóculo no programa IBM SPSS Statistics 23..... **43**

Figura 11. Absorbância média da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* exposta ao peptídeo Lrot3 livre e nanoestruturado em diferentes concentrações por 24 horas a 37°C. *Inoc: Inoculo, Clor: Cloranfenicol, PL: Peptídeo livre, NPB: Nanopartícula branca, NP: Nanopartícula contendo o peptídeo. Os números indicam as respectivas concentrações em µg/mL. Cloranfenicol como controle positivo. Inóculo como controle negativo. DMSO como controle negativo relativo. *p < 0.01 comparado ao Inóculo. ** p< 0.05 quando comparado ao Inóculo no programa IBM SPSS Statistics 23.....**44**

Figura 12. Avaliação da viabilidade das células HEK293 após 24 horas de exposição ao antibiótico cloranfenicol, AMPs LRot 3 livres e AMP LRot 3 nanoestruturados por meio do ensaio de MTT. *Clor: Cloranfenicol, AMPs: Peptídeos Antimicrobianos. Cloranfenicol como controle positivo. Meio MSB como controle negativo. * p<0,05 quando comparado ao controle negativo no programa IBM SPSS Statistics 23.....**47**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α (Alfa)

β (Beta)

$\mu\text{g/mL}$ (Microgramas por mililitros)

μL (Microlitros)

$\mu\text{L/segundo}$ (Microlitros por segundo)

KDa (Kilodalton)

mg/mL (Miligrama por mililitros)

mL (Mililitros)

mS/cm (Millisimens por centímetro)

mV (Milivolts)

nm (Nanômetros)

ppb (Partes por bilhão)

rpm (Rotações por segundo)

ATCC (*American Type Culture Collection*)

AMPs (Peptídeos antimicrobianos)

ANOVA (Análise Unidirecional da Variância)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

Au (Ouro)

Ca²⁺ (Cátion divalente de cálcio)

CaCl₂ (Cloreto de cálcio)

CLOR (Cloranfenicol)

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CO₂ (Gás carbônico)

CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio)

C₆H₇O₆Na (Alginato de sódio)

C₆₀ (Folureno com 60 átomos de carbono)

DNA (Ácido desoxirribonucleico)

DnaK (Proteína chaperona Bacteriana)

DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

E. coli (*Escherichia coli*)

GroEL (Proteína chaperona bacteriana)
HA (Hidroxiapatita)
HCl (Ácido Clorídrico)
HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293* - Células de rim embrionário humano)
Hep62 (Linhagem de células cancerígenas de fígado humano)
IRAS (Infecções relacionadas a assistência a saúde)
IL-6 (Interleucina 6)
LL-37 (Peptídeo antimicrobiano da família das catelicidinas)
LPS (Lipossacarídeos)
LROT3 (Peptídeo de *Lippia Rotundifolia* 3)
MCF-7 (Linhagem de células de tumores)
MIC (Mínima concentração inibitória)
MSB (Meio de cultura)
MTT (Tetrazólio de azul de tiazolilo)
NP (Nanopartícula)
NPB (Nanopartícula branca)
OD (Densidade ótica)
OMS (Organização Mundial da Saúde)
PAMS (Peptídeo antimicrobianos)
pH (Potencial de Hidrogênio)
PL (Peptídeo livre)
PZ (Potencial Zeta)
RNA (Ácido ribonucleico)
S. epidermidis (*Staphylococcus epidermidis*)
SFB (Soro fetal bovino)
Spp. (Espécies do gênero)
TiO₂ (Dióxido de Titânio)
TNF- α (Fator de Necrose Tumoral)
SNK (*Student Newman Keuls*)
WHO (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Morfologia da parede celular bacteriana.....	15
2.1.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	15
2.2 Resistência antimicrobiana e Infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS).....	16
2.3 Peptídeos antimicrobianos.....	18
2.4 <i>Lippia rotundifolia</i>	23
2.4.1 Lrot3.....	24
2.5 Nanobiotecnologia.....	26
2.5.1 Alginato como sistema de liberação controlada.....	29
2.5.2 Testes de biocompatibilidade.....	31
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Delineamento Experimental.....	33
4.2 Obtenção dos peptídeos antimicrobianos.....	33
4.3 Síntese das nanopartículas de Alginato.....	34
4.4 Caracterização do tamanho e carga de superfície.....	34
4.5 Avaliação da estabilidade das nanopartículas.....	35
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
4.7. Avaliação <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	36
4.7.1 Cultura de células <i>in vitro</i>	36
4.7.2 Exposição às NPs.....	37
4.7.3 Viabilidade celular pela técnica de MTT.....	37
4.8 Análises estatísticas.....	38
5 RESULTADOS E DICUSSÃO	
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	39
5.1.1 Efeito Tyndall, Tamanho e Potencial Zeta.....	39

5.2 Análise do pH.....	41
5.3 Ensaio Antimicrobiano.....	42
5.4 Avaliação da Viabilidade Celular após incubação com as NPs de alginato.....	46
6. CONCLUSÃO.....	49
7. PERSPECTIVA.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos patogênicos são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas infecções, e em ambientes hospitalares, levam muitos pacientes ao óbito. No Brasil, o índice de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) é de aproximadamente 14%, enquanto a média mundial é de cerca de 5% (WHO, 2011). A mudança deste quadro é necessária, visto que a infecção hospitalar acarreta também um alto gasto público, todavia existem obstáculos para a eliminação dos microrganismos devido aos mecanismos naturais de defesa que estes possuem.

As bactérias podem apresentar distintos mecanismos de resistência. Esta resistência surge após mutações no DNA bacteriano, como: alteração no sítio de ligação ao fármaco, modificação na permeabilidade da membrana, produção de enzimas que degradam o fármaco, bombeamento ativo deste para fora da célula, entre outros (ANVISA, 2004; BAND; WEISS, 2015). Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos promove a seleção natural e propagação de cepas mais resistentes, fazendo com que o fármaco perca sua eficácia após determinado tempo (OLIVEIRA et al., 2015).

Diante deste panorama, novas alternativas são propostas utilizando peptídeos antimicrobianos (PAMs ou *AMPs do inglês Antimicrobial Peptides*) que são moléculas presentes no sistema imune inato de todos seres vivos (SORENSEN et al., 2008; GALLO; NAKATSUJI, 2011). Geralmente, estes peptídeos possuem entre 10 e 50 resíduos de aminoácidos, são catiônicos e anfipáticos (TAVARES, 2015; ZHANG; GALLO, 2016). Os AMPs podem ser utilizados como agentes terapêuticos, aumentando a especificidade do tratamento e diminuindo os possíveis efeitos colaterais causados pela administração de altas dosagens (REICHERT, 2003).

AMPs membranoativos possuem resíduos polares carregados positivamente nas regiões hidrofílicas, os quais interagem com as membranas carregadas negativamente de bactérias, levando à morte destes microrganismos devido à perturbação em sua estrutura (HOSKIN; RAMAOTHY, 2008). Além do mais, os AMPs podem penetrar na célula, e agir intracelularmente, se ligando ao DNA e alterando a expressão gênica, ou rompendo a membrana mitocondrial, por exemplo (MADER; HOSKIN, 2006).

Nesse estudo, utilizou-se o AMP Lrot3, o qual é um peptídeo sintético, provavelmente linear, prevalentemente catiônico, e de pequeno tamanho (variando entre 15 e 35 Å). Esse AMP foi bioprospectado a partir da planta *Lippia rotundifolia*, uma planta do cerrado brasileiro conhecida por possuir propriedade antimicrobiana (SOUZA et al., 2015).

Uma das limitações do uso de AMPs livres, consiste na possibilidade de eles serem degradados por enzimas proteolíticas, ou serem reconhecidos pelo sistema imune inato, sendo eliminados antes de atingirem seu alvo (REIS et al., 2006). Diferenças de temperatura, pH (potencial de Hidrogênio), dentre outros fatores podem agir sobre o peptídeo, degradando-o (FARKHANI et al., 2014). Visando solucionar tal problema, estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos na tentativa de criar sistemas capazes de transportar tais peptídeos até um alvo específico com maior eficácia (FARKHANI et al., 2014). Desta forma, neste trabalho foi proposto o uso de um AMP nanoestruturados como sistema de liberação controlada de fármaco.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos oferecem diversas vantagens quando comparados aos sistemas convencionais. Estes permitem a manutenção da concentração de um fármaco no organismo em níveis terapêuticos por maiores períodos de tempo, menor toxicidade, tendo como consequência a redução dos efeitos colaterais (MIRAKABADI et al., 2015). Outras vantagens incluem a possibilidade de serem alvo específico e fornecerem proteção ao peptídeo (CHEN et al., 2015). Carreadores poliméricos como o alginato de sódio são candidatos promissores a serem utilizados como sistema de liberação de AMPs. O alginato é um polímero natural que se destaca devido suas características intrínsecas por não ser tóxico, ser biodegradável e biocompatível. Trata-se de um polímero polianiônico, o qual apresenta interação eletrostática com os AMPs catiônicos.

Logo, a elaboração de um nanocarreador de alginato contendo o AMP LROT3 torna-se uma interessante alternativa contra bactérias patogênicas. O presente trabalho visou a síntese de nanoesferas de alginato de sódio para a entrega de AMPs a células bacterianas de *Escherichia Coli* (*E. coli*), *American Type Culture Collection* (ATCC) 25922 e *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), ATCC 12228.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia da parede celular bacteriana

2.1.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa composta por várias camadas de peptidoglicanos, com cerca de 20 a 40 nm, que se localiza entre a membrana plasmática e a cápsula (KIM et al., 2015). Os peptidoglicanos conferem rigidez a parede celular, além de proteger contra o ambiente externo proporcionando resistência as condições hostis enfrentadas pelas bactérias (MURRAY, 2014). Atravessando a parede celular estão os ácidos teicóicos, polímeros aniônicos, que podem participar da passagem de íons ou ligar-se a prótons (KIM et al., 2015) (**Figura 1**). Como parte deste grupo encontram-se bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, entre outras.

As bactérias Gram-negativas por outro lado, possuem uma única camada delgada de peptidoglicanos entre 3 a 7 nm compondo a parede celular por onde atravessam lipoproteínas (KIM et al., 2015). Entre a membrana interna e a camada de peptidoglicanos existe o periplasma, região com aspecto gelatinoso, em razão da alta quantidade de proteínas presentes. Outra característica intrínseca desses microrganismos é a presença de uma membrana externa, a qual limita a permeabilidade celular a pequenas moléculas hidrofílicas e evita a perda de proteínas e enzimas do periplasma (MURRAY, 2014). A membrana externa é composta por duas camadas, a mais interna constituída de fosfolipídios e a mais externa de lipossacarídeos (LPS) (HAARMANN, 2010). Os LPS são constituídos pelos lipídios A, que protegem as bactérias de muitos antibióticos (WARMUS et al., 2012). Este grupo compreende bactérias do gênero *Escherichia*, *Entobacter*, *Pseudomonas*, etc. (**Figura 1**).

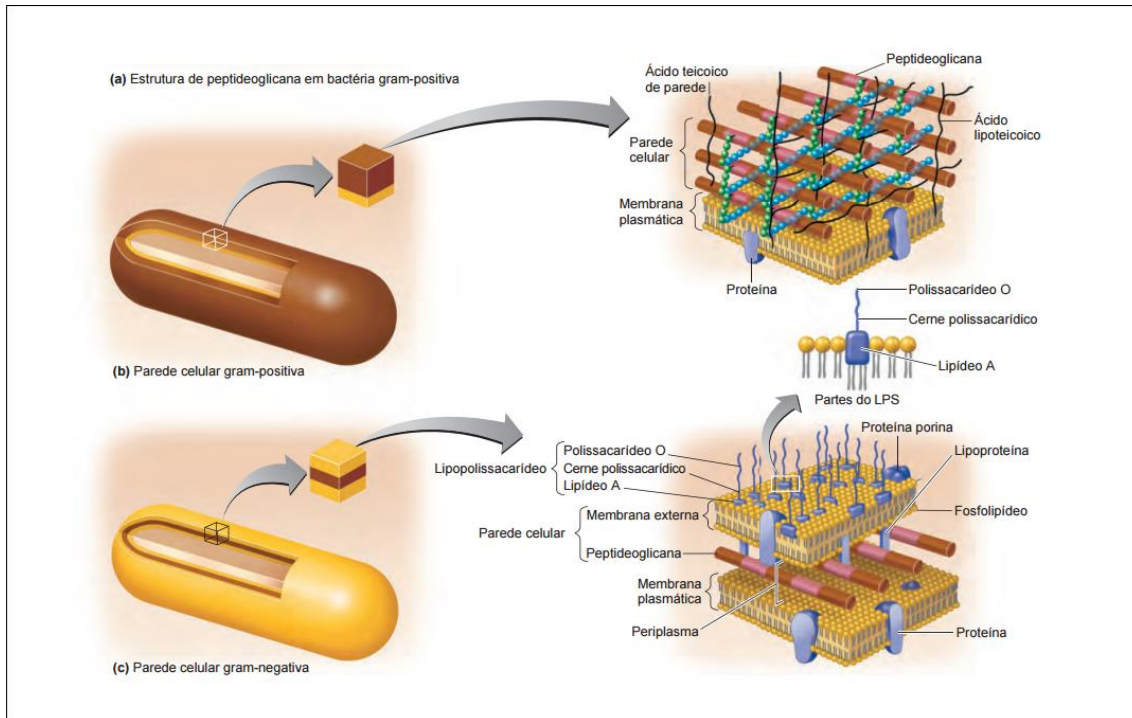


Figura 1. Ilustração diferenciando a estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Adaptado de TORTORA et al., 2012).

2.2 Resistência antimicrobiana e Infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS)

Atualmente, a resistência antimicrobiana gerada pelo uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais, assim como na produção de alimentos, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma ameaça à saúde pública. De acordo com a OMS, a resistência antimicrobiana assim como a resistência a múltiplos agentes cresce continuamente para vários patógenos, os quais são responsáveis por infecções em geral (OMS, 2012).

Bactérias patogênicas são os principais agentes causadores das infecções adquiridas em estabelecimentos de Saúde. Dentre estas, têm-se relatado, *Klebsiella* spp. e *E. coli*, como as enterobactérias mais frequentemente encontradas em comunidades e hospitais (SILVA; LINCOPAN, 2012), seguida por *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva, a qual causa graves infecções como meningites, pneumonia, endocardite, dentre outras, e é responsável por mais de 30% dos casos de infecções sanguíneas hospitalares (VOGEL et al., 2015).

Como relatado por Büttner (2015), *S. epidermidis* é a integrante mais frequente do gênero *Staphylococcus* em bacteremias hospitalares, que acomete

gravemente pacientes imunocomprometidos, em geral com diminuído número de neutrófilos, caracterizando-se por ser uma bactéria oportunista. As cepas produtoras de biofilmes caracterizam-se por serem mais virulentas do que as cepas que não produtoras.

Trata-se de uma bactéria colonizadora permanente, encontrada na pele e mucosas de humanos e demais mamíferos. Normalmente não causa danos ao hospedeiro, visto que não produz toxinas agressivas, todavia possui sistemas eficazes que promovem sua persistência no organismo. Comumente, torna-se invasiva quando há lesões na pele, como no caso de fraturas expostas e de procedimentos cirúrgicos. Conjuntamente com sua alta frequência, esses são fatores que tornam o tratamento excessivamente complicado (LOVATI et al., 2016).

S. epidermidis é responsável pela infecção da maior parte de indivíduos que fazem uso de cateteres em hospitais (BÜTTNER et al., 2015). Além disso, dentre os pacientes com endocardite da valva protética, têm-se que 16% desses desenvolveram a doença devido a *S. epidermidis*, levando parte destes indivíduos a morte (CHU et al., 2009).

A estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228 é descrita como uma estirpe aeróbica, não produtora de biofilme e que tem seu crescimento ótimo a temperatura de 37°C (ATCC, 2017). Devido a isso, é encontrada frequentemente no organismo de humanos, aonde sobrevive como uma bactéria comensal. Todavia, ocasionalmente é capaz de causar bacteremias (BÜTTNER et al., 2015). Essa é susceptível a antibióticos como a neomicina e à vancomicina, que possuem ação intracelular inibindo a síntese de proteínas e peptidoglicanos, respectivamente (ATCC, 2017). Entretanto, apresenta genes de resistência a diversos antibióticos, como os beta-lactâmicos e proteínas de resistência a tetraciclina (ZHANG et al., 2003).

E. coli por sua vez, é uma enterobactéria comensal que habita a microbiota normal do intestino de humanos, mas que ao atingir outros órgãos pode trazer danos à saúde destes. Esta também apresenta cepas virulentas capazes de causarem infecções intestinais, gastroenterites, infecções no trato urinário, meningite, septicemias, entre outras (TADESSE et al., 2012). A transmissão ocorre por alimentos e água contaminados, pelo contato com outros indivíduos ou com animais (CROXEN et al., 2013).

Dados apontam resistência da bactéria *E. coli* a medicamentos utilizados por um longo período de tempo (PETTY et al., 2014). A cepa ST131, por exemplo,

presente no trato urinário e em infecções sanguíneas, encontra-se disseminada globalmente e apresenta resistência a múltiplos antibióticos (PETTY et al., 2014).

A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 caracteriza-se por ser uma enterobactéria aeróbica conhecida por causar frequentemente intoxicação alimentar (MINOGUE et al., 2014). Essa foi isolada pela primeira vez a partir de uma amostra clínica humana em Seattle (Washington, EUA) e, desde então, é amplamente utilizada em testes de controle de qualidade (MINOGUE et al., 2014). Apresenta susceptibilidade a alguns antibióticos, como ao cloranfenicol, a tetraciclina, a neomicina, dentre outros (ATCC, 2017).

Garcia e colaboradores (2013) realizaram um estudo em um hospital do norte de Minas Gerais, expondo o perfil das infecções situadas no local e das bactérias mais comumente encontradas: *Klebsiella pneumoniae* (27,7%), *Escherichia coli* (23,4%), *Acinetobacter baumannii* (21,3%), *Staphylococcus aureus* (14,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (6,4%), *Enterobacter* spp. (2,1%), *Morganella morganii* (2,1%) e *Burkholderia cepacia* (2,1%). Esse estudo apresenta os gêneros *Escherichia* e *Staphylococcus* como dois dos mais frequentes encontradas no estabelecimento. Esse resultado é similar aos dos estudos citados anteriormente, reforçando a importância de pesquisas com essas bactérias.

A partir do exposto sobre infecções relacionadas a assistência a saúde, vê-se a necessidade de se desenvolver novas alternativas para o tratamento destas. Devido a isso, novos tratamentos são propostos utilizando AMPs como uma opção capaz de se sobrepôr, mesmo que apenas temporariamente, a defesa das bactérias, as quais anulam o potencial dos fármacos com ação bactericida utilizados por um longo período.

2.3 Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs apresentam como características seu pequeno tamanho, entre 10 e 50 resíduos de aminoácidos, e em geral superfície carregada positivamente e anfipaticidade (TAVARES, 2015; ZHANG; GALLO, 2016). Todos seres vivos são capazes de produzi-los, sendo estes utilizados na defesa imune, aquisição de nutrientes ou eliminação de outros organismos competidores (NAWROCKI; CRISPELL; McBRIDE, 2014). AMPs possuem ampla atividade, e podem de forma

direta matar bactérias, fungos, vírus, leveduras e células cancerígenas (ZHANG; GALLO, 2016).

As defensinas, por exemplo, são pequenos AMPs (com aproximadamente 5 kDa) ricos em cisteínas, os quais compõe a defesa imune inata de plantas. Essas são comumente encontradas nas sementes, na parede celular vegetal, nas flores e nos tubérculos e atuam sobre doenças (WIESNER-HANKS; REBECCA NELSON, 2016).

Estudos apontam a atividade antifúngica desses AMPs. Como relatado por Omidvar e colaboradores (2016), as defensinas são capazes de inibir o crescimento de fungos da espécie *Fusarium Graminearum* devido a sua estrutura anfipática e flexível, que permite a interação das mesmas com as membranas desse microrganismo. Além disso, as defensinas tem propriedades antibacterianas e inseticida (OMIDVAR et al., 2016).

Os AMPs também auxiliam na imunidade inata cutânea, podendo ser produzidos por diversos tipos de células (queratinócitos, mastócitos, neutrófilos, dentre outros) (GALLO; NAKATSUJI, 2011). Todavia, os AMPs presentes na pele não são apenas produzidos por células epiteliais, esses também são produzidos por microrganismos que residem na epiderme (BASTOS et al., 2009). Os AMPs produzidos por bactérias são denominados de bacteriocinas e são capazes de inibir outras bactérias competidoras.

Segundo Bastos e colaboradores (2009) as bacteriocinas produzidas pelo gênero *Staphylococcus* são capazes de inibir em sua maioria bactérias Gram-positivas, e algumas espécies Gram-negativas. Bactérias do gênero *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Streptomyces* também são conhecidas pela produção de AMPs (GALLO; NAKATSUJI, 2011). Atualmente, duas bacteriocinas são usadas clinicamente, a polimixina B e a polimixina E. Essas são usadas apenas em casos onde há múltipla resistência a antibióticos, devido seus efeitos adversos (BASTOS et al., 2009).

Os AMPs podem ser classificados de diferentes maneiras. Uma delas é de acordo sua estrutura secundária. Dessa forma são divididos em três distintos grupos: peptídeos com estrutura alfa-hélice, peptídeos com estrutura folha-beta e peptídeos estendidos, os quais não possuem estrutura definida e apresentam alta concentração de resíduos de histidina, arginina, glicina e triptofano (**Figura 2**) (ZHANG; GALLO, 2016). Como exemplo de AMPs com estrutura alfa-hélice pode-se

citar a catelicidina humana (LL-37) e a Magainina presente na secreção cutânea do anfíbio *Xenopus laevis*. Ambos AMPs apresentam estrutura linear em suspensão aquosa, e estrutura alfa-hélice anfipática em ambientes não polares, como nas membranas de células bacterianas (ZHANG; GALLO, 2016; XIAO et al., 2011). As bacteriocinas e as defensinas de vertebrados, fazem parte do segundo grupo citado, e logo caracterizam-se por uma estrutura com duas ou mais folhas-beta (ZHANG; GALLO, 2016; KUMARI et al., 2012). As histatinas de humanos, por sua vez, exemplificam os AMPs estendidos, apresentando uma estrutura rica em aminoácidos histidina (ZHANG; GALLO, 2016).

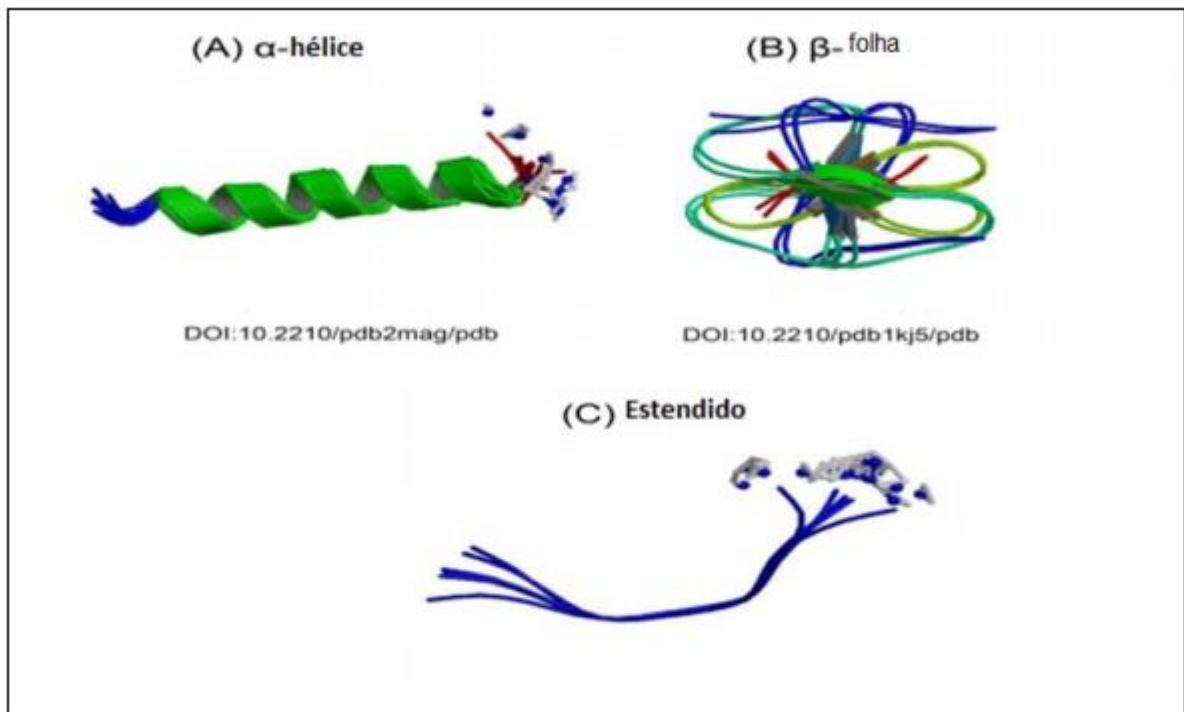


Figura 2. Modelos representando as diferenças estruturais entre os AMPs. A) Peptídeo com estrutura α -hélice. B) Peptídeo com estrutura β -folha. C) Peptídeo estendidos. (Adaptado de CASTRO, 2013).

Os AMPs podem ser catiônicos ou aniônicos. Geralmente apresentam carga positiva e possuem em sua estrutura uma porção hidrofóbica. Assim, conseguem interagir com as membranas celulares de bactérias, as quais tem carga negativa devido a presença de grupos fosfato (BAND; WEISS, 2015). Esses grupos compõe as “cabeças” dos fosfolipídios e ficam voltados para a face externa, o que facilita a interação AMP-bactéria.

Após o contato, variados podem ser os mecanismos de ação dos AMPs para matar as células bacterianas. Esses mecanismos dependem das características químicas e físicas dos AMPs (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Estes podem agir sobre a membrana celular das bactérias ou podem atravessá-la sem causar danos, agindo então intracelularmente. No interior desses microrganismos, os AMPs podem bloquear a atividade enzimática ou inibir a síntese de DNA, RNA e de proteínas (BAND; WEISS, 2015; ZHANG; GALLO, 2016).

Vários AMPs estendidos são conhecidos por agirem sobre as proteínas bacterianas. Os AMPs Pirrocoricina, Drosocina e Apidaecina derivados de insetos e ricos em prolina, por exemplo, interagem com proteínas intracelulares, como a proteína *heat-shock* DnaK e a chaperona GroEL, inibindo a atividade de ATPase da DnaK e o enrolamento de proteínas dependente de chaperonas (NGUYEN et al., 2011; BRODGEN, 2005).

Alguns modelos de ação dos AMPs sobre as membranas bacterianas foram propostos. Dentre esses destacam-se como principais: modelo do carpete, modelo do barril, modelo do poro toroidal e modelo do agregado micelar (RASHID et al., 2016) (**Figura 3**).

No primeiro modelo citado, os AMPs se acumulam paralelamente à membrana para que essa seja rompida através da formação de poros ou através da formação do agregado micelar (HARISSON et al., 2016). No modelo do barril, os AMPs se inserem na membrana bacteriana e se orientam lado a lado formando um poro em forma de barril, o qual pode agir como um canal para a passagem excessiva de íons aleatórios, levando a morte celular (RASHID et al., 2016). A formação do poro toroidal se dá de forma similar, todavia, nesse modelo há o dobramento da membrana devido a inserção dos AMPs nesta, gerando um poro composto por AMPs e lipídios intercalados (HARISSON et al., 2016). No modelo do agregado micelar, com a agregação dos AMPs sobre a membrana celular, há o aumento da concentração local. A alta concentração de AMPs, associada ao caráter anfipático destes, possibilita que os AMPs hajam como um detergente sobre a membrana, rompendo-a em pequenas estruturas ou micelas (RASHID et al., 2016).

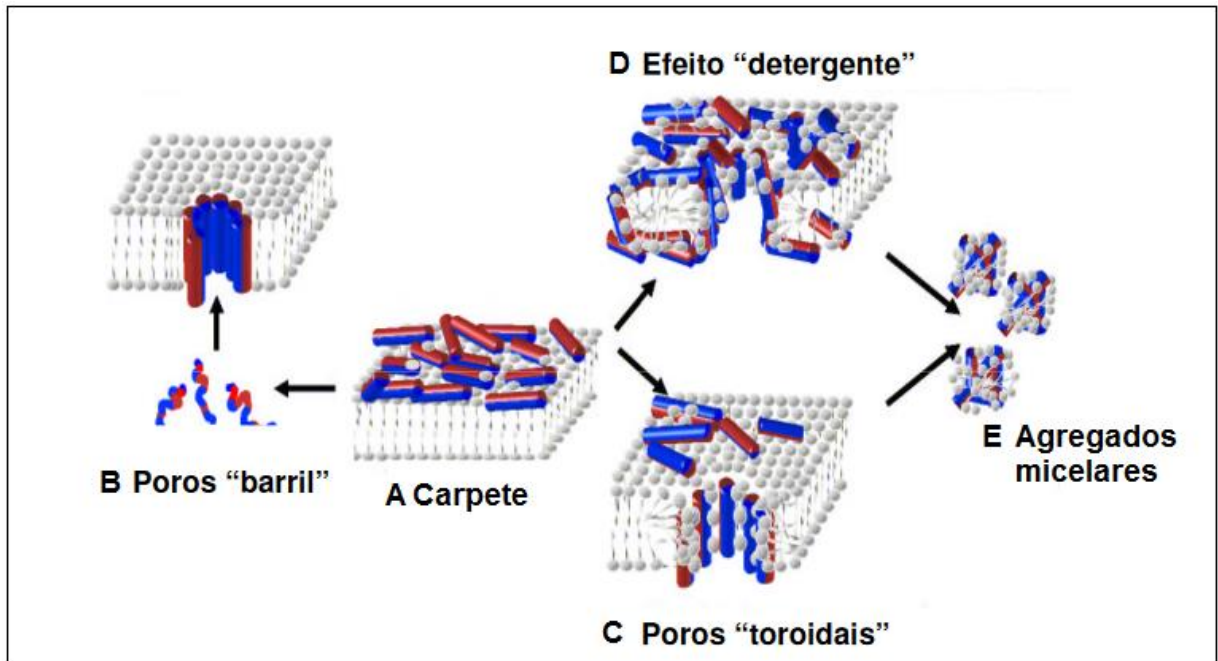


Figura 3. Principais modelos de mecanismos de ação dos AMPs sobre membranas biológicas. A) Modelo do tapete. B) Modelo do barril. C) Modelo do poro toroidal. D) Modelo do agregado micelar - efeito detergente gerado pela alta concentração de AMPs no local. E) Agregados micelares formados pelo rompimento da membrana celular. (Adaptado de BROGDEN, 2005).

Na área da saúde destaca-se o uso de AMPs em sistemas de liberação controlada, que através dos avanços na nanotecnologia permitem a ligação destes a um sítio específico no organismo do paciente ampliando a eficiência do tratamento. Proteínas e peptídeos possuem susceptibilidade de serem degradadas por diversas enzimas presentes no trato gastrointestinal. Como exemplo tem-se a pepsina, a tripsina e proteases presentes no citosol e na “borda em escova” dos enterócitos, as quais são uma das principais barreiras para a absorção de pequenos peptídeos em todas as mucosas do corpo (REIS et al., 2006). Dessa forma, os sistemas de liberação controlada atuam ainda protegendo a molécula bioativa contra degradação, além de possibilitar a utilização de menores doses e a redução da toxicidade dos fármacos sem que percam a efetividade (DASS; CHOONG, 2006; SALOUTI; AHANGARI, 2014).

2.4 *Lippia rotundifolia*

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) têm aproximadamente 200 espécies, as quais são encontradas na América do Sul, América Central e em parte da África (LEITÃO et al., 2008). No Brasil encontra-se 150 dessas espécies, sendo os locais de maior ocorrência a Serra do Espinhaço, em Minas Gerais, e a Chapada Diamantina, na Bahia (RESENDE et al., 2015).

Esse gênero possui valor econômico, uma vez que suas plantas são utilizadas na produção de óleos essenciais e possuem propriedades medicinais. Na medicina popular o gênero *Lippia* é utilizado para o tratamento de doenças respiratórias, problemas gastrointestinais, doenças de pele, úlceras e queimaduras (ALMEIDA et al., 2014; RESENDE et al., 2015).

A espécie *Lippia rotundifolia*, chamada habitualmente de “Rosmaninho”, é nativa do cerrado e rica em monoterpenos. Nas suas inflorescências encontra-se o limoneno, um terpeno conhecido pelas suas variadas propriedades medicinais, que incluem a sua ação anticancerígena em mamíferos (RESENDE et al., 2015). Nas folhas, por sua vez, encontra-se acumulado o mirtenol, um isômero óptico do limoneno. Similarmente ao limoneno, o mirtenol também possui atividade anticancerígena. Este atua inibindo o hepatocarcinoma por meio de uma infra-regulação do TNF- α e da supressão de carcinogêneos, protegendo as membranas celulares contra os danos causados pelos radicais livres (BABU et al., 2012).

Segundo Leitão e colaboradores (2006), os extratos de *Lippia rotundifolia* apresentam atividade anti-micobacteriana nas frações hexano e diclorometano, com uma mínima concentração inibitória de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses foram obtidos das folhas de *Lippia rotundifolia* e extraídos pelo método de extração líquido-líquido. Neste estudo testou-se a susceptibilidade do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* ao extrato de plantas das famílias Verbenaceae, Leguminosae e Monimiaceae. Dentre os 48 extratos testados, sete deles mostraram efeito antimicrobiano, sendo que todos os extratos pertenciam a plantas da Família Verbenaceae (*Lantana trifolia*, *Vitex cooperi*, *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia*).

Outros estudos também relatam o efeito bacteriostático do extrato proteico de *Lippia rotundifolia*. De acordo com Almeida e colaboradores (2014), o extrato proteico proveniente das flores de *Lippia rotundifolia*, também é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Esse inibe aproximadamente 50%, 45%, 37% e 13% do

crescimento de *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. mirabilis*, e *E. coli*, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL.

Similarmente aos extratos, os óleos essenciais de *Lippia rotundifolia* apresentam atividade antimicrobiana frente às bactérias isoladas *E. coli* e *S. aureus*. O Rosmaninho apresenta maior eficácia na concentração de 160 µL/mL sobre *S. aureus*, e na concentração de 80 µL/mL sobre a bactéria *E. coli*. Os óleos essenciais dessa planta possuem potencial para serem utilizados em rações para aves, como uma forma alternativa ao uso de antibióticos convencionais (SOUZA et al., 2015).

Tavares (2015) desenvolveu peptídeos com base no transcriptoma de *Lippia rotundifolia*. Dentre os peptídeos desenvolvidos, o peptídeo Lrot3 mostrou efeito antimicrobiano contra as bactérias *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *K. pneumoniae* ATCC 13866, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Esse chegou a inibir mais do que 50% do crescimento das estirpes testadas *E. coli* 1229 e *Klebsiella pneumoniae* 13866.

Segundo a literatura, a planta *Lippia rotundifolia* parece ser uma alternativa promissora ao uso dos antimicrobianos tradicionais ou mesmo para ser utilizada em conjunto a esses. Todavia, a literatura acerca do efeito bacteriostático dessa ainda é escassa.

2.4.1 Lrot3

O peptídeo Lrot3 é um peptídeo sintético, prevalentemente catiônico, e de pequeno tamanho (variando entre 15 e 35 Å), como pode se observar na **Figura 4**. É proveniente da planta *Lippia rotundifolia*, uma planta do cerrado brasileiro conhecida por possuir propriedades medicinais, e dentre essas, propriedade antimicrobiana (SOUZA et al., 2015).

Sua sequência foi determinada por Tavares (2015). Trata-se de um AMP com apenas 10 resíduos de aminoácidos (MRIGLRFVLM) e massa molecular de 1335.63 daltons. Sua estrutura primária é similar ao do AMP Temporin ALj com ação antimicrobiana conhecida contra as bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (TAVARES, 2015; WANG et al., 2010).

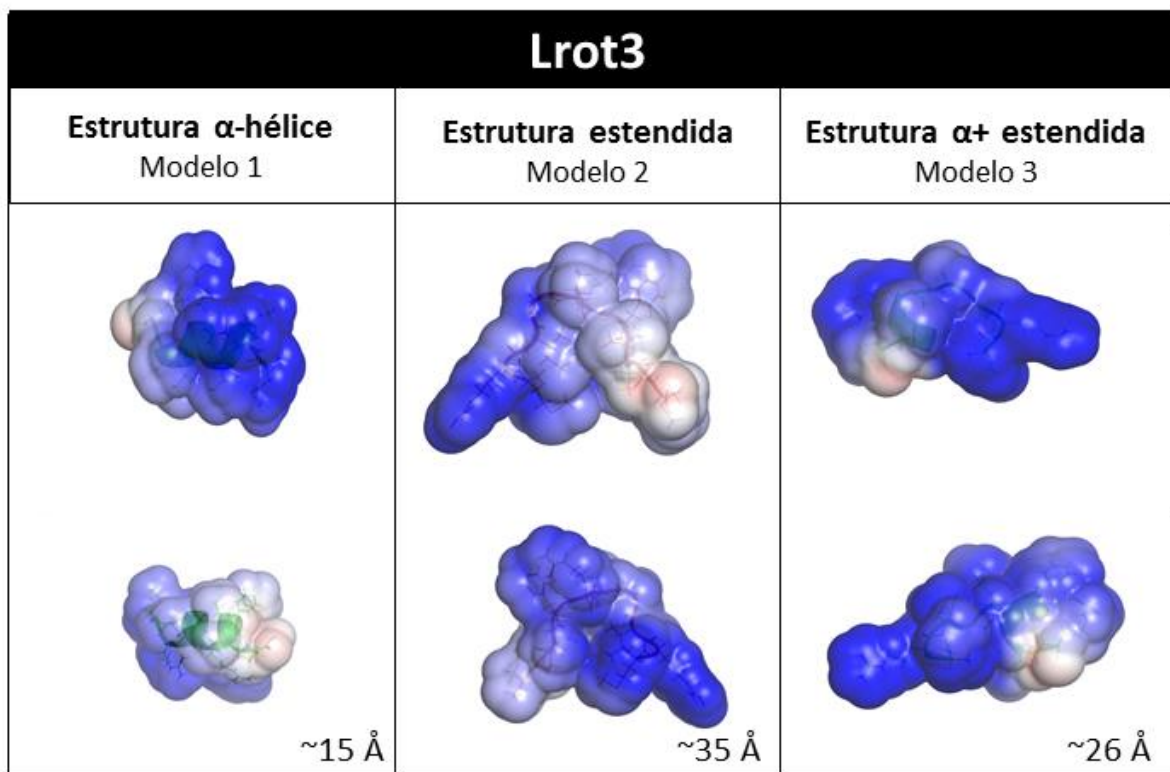


Figura 4 – Modelagem do peptídeo antimicrobiano Lrot3 mostrando o perfil eletrostático do mesmo. Azul: representam regiões catiônicas, Vermelho: representam regiões aniônicas. PEP-FOLD Peptide Structure Prediction Server.

Segundo a modelagem do AMP Lrot3, esse peptídeo provavelmente possui uma estrutura secundária estendida ou cruz (TAVARES, 2015). Como os peptídeos estendidos geralmente apresentam estruturas ricas em arginina, triptofano, cisteína ou prolina, acredita-se que ele provavelmente não possua uma estrutura definida em solução aquosa e estrutura α -hélice quando diluído em DMSO, similarmente ao que acontece a outros peptídeos lineares, como é o caso da histidin 5 (CRUZ et al., 2014).

De acordo com Cruz e colaboradores (2014), pequenos AMPs estendidos ricos em arginina geralmente apresentam atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *E.coli* e *S. aureus*, e afinidade pelas membranas aniônicas desses microrganismos. Em sua maioria, esses AMPs interagem com os lipídeos da membrana, penetram na célula e se acumulam no citoplasma bacteriano. Dentro da célula, podem possuir mecanismos de ação que inibem a recombinação de DNA da célula bacteriana. Todavia, alguns peptídeos estendidos, como a Indolicina, agem rompendo a membrana, devido a interação dos seus grupos de triptofano com os lipídeos da mesma.

2.5 Nanobiotecnologia

A nanociência é o estudo, controle e reestruturação da matéria em escala manométrica (10^{-9} m), com o intuito de criar novos materiais, com novas propriedades e funções para aplicações nas mais diversas áreas (SANCHEZ et al., 2010). É uma ciência multidisciplinar que compreende áreas como a física, a biologia e a química. A nanotecnologia, por sua vez, compreende o *design*, caracterização, produção e aplicação dessas nanoestruturas em dispositivos e sistemas nanométricos (DISNER; CESTARI, 2016). Destaca-se o uso desta em aplicações médicas, permitindo tratamentos mais sofisticados, como: diagnóstico precoce através de nanodispositivos, uso de biomateriais para implantes médicos ou próteses para reparar disformidades, entrega controlada de fármacos, entre outros (HUBER et al., 2015; KANG et al., 2015; CHEN; THOUAS, 2015; MIRAKABADI et al., 2015).

A entrega controlada de fármacos traz visíveis vantagens frente às formas tradicionais de administração dos medicamentos, uma vez que permite um tratamento alvo específico, com uso de menores concentrações, resultando na minimização dos efeitos colaterais (MIRAKABADI et al., 2015). A nanoestruturação pode superar barreiras relacionadas à degradação e mesmo solubilidade do fármaco tornando o sistema de liberação controlada de AMPs promissor (MORALES, 2007).

As nanopartículas (NPs) possibilitam o armazenamento de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, proteção do fármaco, aumento do tempo de residência da droga no intestino, aumento da absorção, maior especificidade do tratamento, além de garantir a estabilidade do peptídeo durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal, sendo desta forma o tratamento mais seguro e benéfico para o paciente (REIS et al., 2006). Além disso, é um processo simples que requer modestos equipamentos, sendo de baixo custo (SCHUBERT et al., 2010).

As NPs podem se apresentar de distintas formas, como em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas, se distinguem das nanocápsulas por se tratarem de uma mistura homogênea do fármaco com o biomaterial utilizado formando uma matriz. As nanocápsulas são reservatórios geralmente com núcleo oleoso ou aquoso, envoltos pelo biomaterial utilizado para reter fármacos hidrofóbicos (MORALES, 2007) (**Figura 4**).

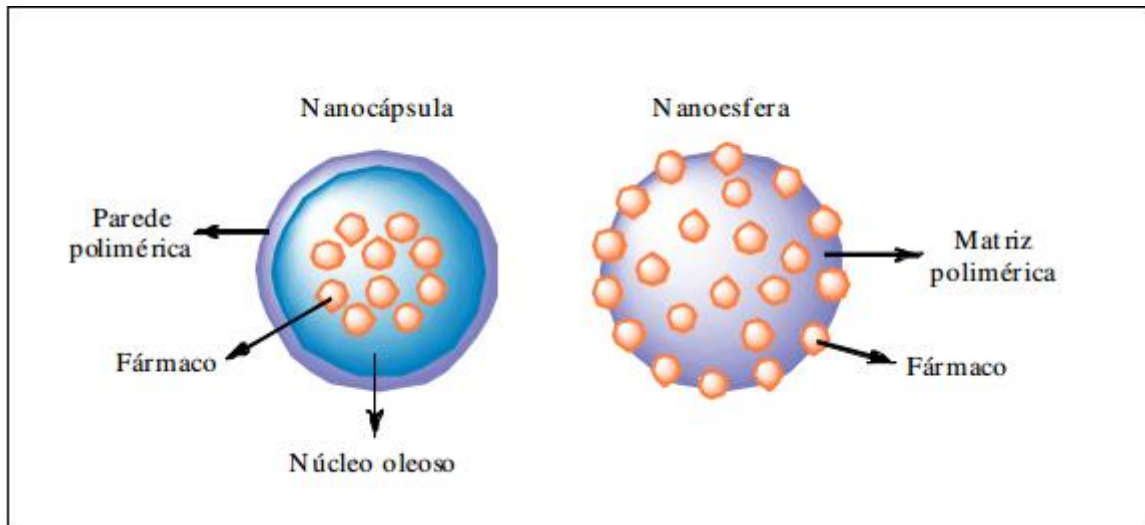


Figura 5. Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas. A esquerda: Nanocápsula com o fármaco dissolvido em núcleo oleoso. A direita: Nanoesfera com o fármaco disperso por toda a matriz (MORALES, 2007).

Além disso, as NPs podem ser sintetizadas a partir de diferentes biomateriais. Os biomateriais são materiais que tem como destino sistemas biológicos, sendo utilizados para o monitoramento, tratamento ou substituição de algum órgão ou tecido (NAIR; LAURENCI, 2007). Logo, esses são empregados em diversas áreas, como na bionanotecnologia, engenharia de tecidos, terapia genética, entre outras (DUCHEYNE et al., 2015). Os biomateriais utilizados na nanoestruturação podem ser metálicos, cerâmicos ou poliméricos (DUCHEYNE et al., 2015). Alguns estudos apontam que nanoestruturas a base de carbono, metais e cerâmicos podem ser tóxicas em certas concentrações e dependendo do tempo de exposição a elas.

Segundo Sayes e colaboradores (2005) o nano-fulereno C60, uma das formas mais estáveis do carbono, é citotóxico para fibroblastos dérmicos humanos, células de carcinoma de fígado humano (HepG2) e astrócitos humanos neuronais em doses maiores ou iguais a 50 ppb. Após 48 horas de exposição ao C60 ocorre a oxidação das membranas das células previamente citadas. Nesse estudo viu-se que essa reação química ocorre após a produção de radicais livres, devido a exposição das células ao C60 (SAYES et al., 2005).

Os *nanorods* de ouro (Au), NPs em formato de bastão, são utilizados como nanosensores e em aplicações fotoeletroquímicas. Apesar do Au apresentar baixa citotoxicidade, sua superfície precisa ser modificada para atender os fins

necessários. O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), é um estabilizante utilizado na produção de *nanorods*, o qual evita a agregação das NPs e apresenta alta toxicidade às células (TAKAHASHI et al. 2006). Logo para a utilização de *nanorods* de Au e manutenção da viabilidade celular são necessárias algumas adaptações como a retirada por centrifugação do excesso de CTAB não ligado ou extração deste com clorofórmio ou fosfatidilcolina-clorofórmio (TAKAHASHI et al., 2006).

Tay e colaboradores (2014) demonstraram que NPs de hidroxiapatita (HA) e de dióxido de titânio (TiO₂) induzem ao estresse oxidativo ao se acumularem na membrana das células epiteliais da mucosa oral (TR-146) e no citosol. Além disso, ambas NPs induzem a uma resposta inflamatória nas células TR-146, com o aumento da produção da interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). As NPs de TiO₂ ainda são capazes de induzir à apoptose precoce quando comparadas ao grupo controle (TAY et al., 2014).

Os polímeros, por sua vez, são macromoléculas naturais ou sintéticas, em sua maioria biodegradáveis conhecidas por não serem tóxicas e empregadas constantemente na liberação controlada de fármacos (DUCHEYNE et al., 2015; NGUYEN et al., 2015). Os polímeros naturais têm como vantagens a bioatividade, capacidade de apresentar seus ligantes a receptores celulares e de serem degradados naturalmente por enzimas proteolíticas, sendo dessa maneira eliminados do organismo humano após determinado tempo (DUCHEYNE et al., 2015). Os polímeros sintéticos, por outro lado, são menos reativos, tem propriedades mais previsíveis e são mais uniformes, ou seja, apresentam menor variação entre os lotes produzidos (NAIR; LAURENCI, 2007). Outra vantagem de se trabalhar com NPs poliméricas, é que para síntese dessas não é necessário a utilização de solventes orgânicos, o que contribui para uma melhor biocompatibilidade das NPs. Dentre os nanoestruturados poliméricos biodegradáveis destacam-se os polissacarídeos de origem não humana, como a quitosana e o alginato, os quais são comumente empregados para o *delivery* de fármacos (DUCHEYNE et al., 2015).

2.5.1 Alginato como sistema de liberação controlada

O alginato de sódio é um polissacarídeo, extraído da matriz intercelular de algas marrons, que também pode ser sintetizado por microrganismos, como as bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* (RHEIN-KNUDSEN et al., 2015). É um polímero amplamente utilizado em diversas áreas, como: alimentícia, têxtil, médica, farmacêutica, dentre outras. Suas funções são variadas, sendo utilizado como espessante e estabilizante de emulsões, agente de encapsulação e gelificação, e na formação de filmes e de fibras sintéticas (MULLER et al., 2011). Trata-se de um material biodegradável, biocompatível, e logo, não tóxico para o organismo (LEONG et al., 2015).

O alginato é um polímero linear poliânico constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos. Quando em contato com cátions divalentes, e também com polímeros catiônicos como a quitosana, origina NPs pelo processo de Gelificação Ionotrópica (DUCHEYNE et al., 2015). Na presença de cátions divalentes ocorre a reticulação do polímero, ou seja, as cadeias lineares se ligam por ligação covalente produzindo polímeros tridimensionais. O cloreto de cálcio (CaCl_2) é o composto químico mais utilizado no processo, pois trata-se de uma fonte de cátions (Ca^{2+}), além de ser altamente solúvel em água, possibilitando a formação instantânea de NPs quando em contato com o polímero (LEONG et al., 2015). As NPs de alginato apresentam carga superficial negativa, sendo ideal para o carregamento de proteínas e peptídeos carregados positivamente.

O estudo de Li e colaboradores (2008) reportou, pioneiramente, a possibilidade de aprisionar um fármaco hidrofóbico em NPs de Alginato-Quitosana. A Nifedipina, uma droga hidrofóbica utilizada no tratamento de hipertensos, apresenta baixa biodisponibilidade, metabolismo pré-sistêmico (redução da concentração da droga antes de atingir a circulação sistêmica) e rápida degradação na presença de luz (LI et al., 2008). Devido a essas características a nanoestruturação do fármaco é fundamental para uma liberação controlada da substância. Estudos com o complexo Alginato-Quitosana, obtidos por meio da Gelificação Ionotrópica, se mostraram eficazes nesse sentido, limitando a liberação da droga (LI et al., 2008).

O alginato de sódio também pode ser utilizado para a produção de sistemas polieletrólitos. Nesse tipo de sistema, eletrólitos de carga opostas são colocados

em suspensão aquosa e espontaneamente formam complexos, os quais são comumente empregados na liberação controlada de fármacos. Complexos de nanopartículas de alginato e gelatina cationizada mostraram-se eficazes no *delivery* de curcumina as células de câncer de mama humano (MCF-7). Nesse estudo, a atividade anticancerígena do sistema foi observada, resultando na morte celular de aproximadamente 90% das células MCF-7 quando na concentração de 50 µg/mL (SAKIRA; JAMES, 2016).

O alginato é um polímero amplamente utilizado para a entrega controlada de agentes terapêuticos, como peptídeos e proteínas. A nanoencapsulação de peptídeos com ação anticancerígena tem se mostrado promissora, ampliando a potência dos mesmos. Moradhaseli e colaboradores (2013), relataram o aumento do efeito citotóxico do peptídeo ICD-85 quando nanoencapsulado sobre a proliferação da linhagem de células HEP-2 (células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana) (MORADHASELI et al., 2013). Estudos prévios *in vitro* mostram que o peptídeo ICD-85 também possui efeito sobre as linhagens celulares cancerígenas MDA-MB231 e HL-60, induzindo a apoptose das mesmas (MIRAKABADI et al., 2008; MIRAKABADI et al., 2012). Além disso, experimentos *in vivo*, mostram o efeito supressor do peptídeo em tumores de mama em camundongos (KOOHI et al., 2009). Dessa forma, sugere-se que a nanoestruturação do peptídeo ICD-85 possa ser benéfica para o tratamento de diversos tipos de câncer.

Outra vantagem da utilização do polímero, é que fármacos carregados por NPs de alginato tendem a apresentar maior biodisponibilidade. A Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida, drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, podem ser encontradas na circulação sanguínea respectivamente 14, 10 e 14 dias após a nebulização dos fármacos nanoencapsulados, enquanto que na forma livre essas substâncias são eliminadas entre 12 e 24 horas após a administração (ZAHOOR et al., 2005). Além disso, observou-se que três doses de NPs carregadas com os fármacos citados anteriormente possuem a mesma eficácia que 45 doses administradas por via oral dos mesmos (ZAHOOR et al., 2005).

2.5.2 Testes de biocompatibilidade

A biocompatibilidade é um dos principais fatores que se deve analisar ao utilizar biomateriais. Os testes de biocompatibilidade, *in vitro* e *in vivo*, são aplicados para se obter informações a respeito da interação do material com células e/ou organismos vivos e dos possíveis efeitos citotóxicos da sua utilização. Testes *in vitro* constituem a primeira fase da análise de biocompatibilidade, diminuindo assim a utilização de cobaias nos experimentos (NOZAKI et al., 2012).

Como citado anteriormente, o alginato é um polímero conhecido por sua biocompatibilidade, todavia é imprescindível o desenvolvimento de novos estudos acerca da sua citotoxicidade quando produzido em escala nanométrica, visto que nessa escala os materiais tornam-se mais reativos devido à grande área superficial das partículas (POWERS et al., 2006).

Mudanças na morfologia, carga, tamanho, estabilidade, dentre outros fatores, também podem influenciar nas características das NPs (FRATODDI et al., 2014). Dados da literatura demonstram que as NPs esféricas de ouro são mais tóxicas do que as NPs com forma de estrela. A forma estrelar possui uma maior área superficial, a qual possibilita transportar uma maior quantidade de moléculas do fármaco utilizado, o que permite utilizar uma menor dosagem e conseqüentemente reduz a toxicidade. Por sua vez, comparadas aos *nanorods*, as nanoesferas mostram-se menos citotóxicas (FRATODDI et al., 2014).

Uma característica frequentemente analisada nos ensaios de citotoxicidade é a viabilidade das células após essas serem expostas a um determinado tratamento. A viabilidade celular pode ser estipulada através do acompanhamento das reações químicas, como por exemplo, do metabolismo celular (RISS et al., 2016). O ensaio de MTT (tetrazólio de azul de tiazolilo) é uma das técnicas mais utilizadas para determinar a viabilidade celular (LÜ et al., 2012). O MTT é um sal, solúvel em água, que consegue ser endocitado e metabolizado por mitocôndrias e enzimas citolíticas dentro das células (RISS et al., 2016). Ao ser metabolizado, o MTT é reduzido a cristais de formazan, os quais possuem coloração azulada. Existe uma correlação entre a quantidade de cristais formados e a viabilidade celular (RISS et al., 2016). Por meio da leitura ótica da amostra reduzida consegue-se estimar a quantidade de células vivas presentes (LÜ et al., 2012). Assim, a técnica mostra-se importante para se constatar a biocompatibilidade das NPs com diferentes tipos celulares.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de nanoesferas de alginato contendo os AMPs Lrot3.

3.2 Específicos:

- Sintetizar nanopartículas de alginato contendo o AMP Lrot3.
- Caracterizar as NPs quanto ao tamanho, potencial Zeta e estabilidade.
- Avaliar a ação antimicrobiana de NPs de alginato contendo AMPs sobre as espécies *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*.
- Analisar os efeitos da exposição de células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293* - Células de rim embrionário humano) cultivadas *in vitro* às NPs de alginato de cálcio contendo o AMP Lrot3 por meio do teste de MTT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O experimento foi constituído de seis grupos:

- Controle positivo: soluções do antibiótico cloranfenicol (Fisher Bioreagents) foram utilizadas nas concentrações de 1280 µg/mL, 128 µg/mL e 64 µg/mL.
- Controle negativo: meio de cultura MSB.
- Controle negativo relativo: suspensão contendo DMSO 0,5% (Sigma) e Tween 20 0,5% (Sigma).
- Peptídeos livres: foram utilizados em 6 distintas concentrações (128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL e 4 µg/mL).
- Peptídeos nanoestruturados: foram utilizados em 6 distintas concentrações: 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL e 4 µg/mL
- Nanoesferas de alginato brancas (sem incorporação dos peptídeos). Alginato de sódio: 30 mg/ml. CaCl₂: 10 mg/ml.

4.2 Obtenção dos peptídeos antimicrobianos

O peptídeo Lrot3 foi obtido após síntese pela empresa *Shanghai Hanhong Chemical Co, LTD.*, República Popular da China, e processado conforme descrito por Tavares (2015) pelo método de síntese em fase sólida por meio da estratégia Fmoc (HIRATA et al., 1994). O peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, liofilizado, e então armazenado em um tubo de microcentrífuga para posterior envio para o Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. O peptídeo foi solubilizado em uma suspensão de DMSO 0,5% e Tween 20 0,5% (Sigma) e armazenado a - 20°C até o momento de sua utilização.

4.3 Síntese das nanopartículas de alginato

Para a formação de nanoesferas de alginato, utilizou-se a técnica de Gelatinização Ionotrópica descrita por Sarei e colaboradores (2013) com adaptações. O processo consistiu na solubilização do alginato de sódio (0,3%) em água Milli-Q sob intensa agitação magnética por 2 horas em temperatura ambiente (Agitador magnético com aquecimento, Astral Científica). Na sequência realizou-se o gotejamento de uma suspensão de CaCl_2 (0,1 %, Sigma) sob o alginato de sódio, a uma taxa de 1000 $\mu\text{L}/\text{minuto}$, sob agitação magnética de 1300 rpm a temperatura ambiente. Após o fim do gotejamento a suspensão permaneceu em agitação por 45 minutos.

Realizou-se a síntese das NPs de alginato incorporadas com o AMP Lrot3 de maneira similar. Após a solubilização do alginato adicionou-se uma suspensão aquosa desse peptídeo, na concentração de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, previamente ao gotejamento do CaCl_2 . As soluções permaneceram sob agitação magnética por 10 minutos e em seguida a suspensão de CaCl_2 foi adicionada de modo similar ao processo de produção das nanopartículas de alginato brancas. A proporção de alginato de sódio e CaCl_2 (Sigma) seguiu a proporção de 3:1 em ambas as sínteses.

Inicialmente, utilizou-se o efeito Tyndall como um indicativo da formação de uma suspensão de NPs (PANG et al., 2012). O efeito Tyndall é um fenômeno de dispersão de luz plasmônica por NPs em suspensão coloidal, o qual pode ser visualizado a partir da incidência de um laser vermelho sobre essa. As NPs, quando presentes, interagem dispersando os raios luminosos, sendo possível a visualização do trajeto da luz. Dessa forma, as suspensões de alginato foram armazenadas em frascos transparentes de vidro e expostas a um feixe de laser vermelho, com comprimento de onda de cerca 650 nm para a visualização do fenômeno.

4.4 Caracterização do tamanho e carga de superfície

A técnica de análise de tamanho de partículas por difração de laser foi utilizada para se obter o tamanho das NPs (LS™ 13 320 SW, Beckman Coulter, Inc, Califórnia, EUA). A análise de tamanho das NPs foi realizada no Núcleo de

Laboratório Microestrutural e Microanálise do Departamento de Química da UFJF. O Potencial Zeta (PZ) foi avaliado a partir de alíquotas das suspensões aquosas das NPs de alginato de cálcio utilizando a técnica de microeletroforese Doppler (Zetasizer Nano ZN; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK). A análise do potencial Zeta das NPs foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia do CiPharma da UFOP. Ambas as técnicas foram realizadas em NPs brancas (sem o peptídeo Lrot3).

4.5 Avaliação da estabilidade das nanopartículas

Após a síntese de NPs de alginato brancas pelo método de Gelificação Ionotrópica como previamente descrito, a estabilidade das NPs foi avaliada através da análise macroscópica com o objetivo de averiguar características físico-químicas; a homogeneidade das formulações confeccionadas e identificar possível instabilidade visível. Além disso, avaliou-se o pH final da suspensão, visto que grandes alterações podem ocasionar na degradação do polímero, e influenciar na conformação molecular das cadeias.

As NPs tiveram seu pH medido (Ultra Basic pH meter, Denver Instrument) logo após a síntese, considerada o marco 0. Posteriormente, a suspensão total (100 mL) foi dividida igualmente em 3 tubos de 50mL e cada qual foi submetido a uma diferente condição de temperatura (25°C; 4°C; -20°C, respectivamente) durante 5 dias. Verificou-se o pH das soluções a cada 24 horas nos 4 dias seguintes para avaliar se houve variação em função da temperatura e tempo.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos livres e nanoestruturados foi avaliada por meio da concentração mínima inibitória (MIC). Os microrganismos, *E. Coli* ATCC 25922 e *S. epidermis* ATCC 12228 foram obtidos do Laboratório de Microbiologia, no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Primeiramente realizou-se o repique das bactérias obtidas em placa de ágar para se obter colônias isoladas. As placas de Petri foram devidamente lacradas,

identificadas e colocadas em uma estufa incubadora (Fanem Ltda) a 37° C por 16 horas. Após a incubação, adicionou-se cinco colônias isoladas de *E. coli* a 10 mL de meio MSB líquido em um tubo de 50 mL. O mesmo processo foi realizado para as colônias de *Staphylococcus epidermidis*. Ambos tubos de 50 mL foram agitados no shaker a 350 rpm (Forma Orbital Shaker, Thermo) e 37° C até que os microrganismos atingissem a densidade óptica (OD) ideal, entre 0.08 e 0.1, que correspondem a aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônias segundo a padronização por espectrometria realizada pela CLSI (2015). Realizou-se a primeira leitura por espectrofotometria (Biomate 3, Thermo Espectro) após 40 minutos de agitação, e posteriormente a cada 20 minutos. Ao atingir a OD necessária retirou-se 5 µl de inóculo de cada frasco que então foram ressuspensos em 5 mL de meio MSB líquido em tubos de 15 mL separadamente (CLSI, 2015).

Para a avaliação da MIC, utilizou-se duas placas de 96-poços, uma para cada bactéria, onde os tratamentos foram adicionados em triplicata. Previamente adicionou-se 50 µl de inóculo (1×10^4 unidades formadoras de colônias) em cada poço e posteriormente 50 µl do respectivo tratamento (peptídeos livres, nanopartículas brancas ou nanopartículas com o AMP Lrot3) nas concentrações citadas anteriormente. Os tratamentos foram diluídos em água Mili-Q autoclavada, por meio de diluição seriada. Reservou-se três poços em cada placa, nos quais foram adicionados 100 µl do meio MSB, para serem utilizados como branco. Todos poços apresentavam um total de 100 µl (50 µl de inóculo + 50 µl do tratamento). As placas foram identificadas e incubadas a 37° C por 24 horas. A absorbância foi determinada sob o comprimento de onda de 625 nm por espectrometria (Varioskan Flash - Thermo®).

4.7 Avaliação *in vitro* de citotoxicidade

4.7.1 Cultura de células *in vitro*

As células HEK 293 foram obtidas a partir de linhagens mantidas no laboratório de Genética e Biotecnologia, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Estas foram descongeladas e cultivadas ($5,4 \times 10^6$ células/mL) em meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco, Sigma)

suplementado com 1% de antibióticos, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em placas de 96 poços. O cultivo foi realizado em estufa incubadora (Estufa modelo RCO3000TVBB, REVCO Technologies, Asheville, USA) a 37° C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

As células HEK293 (70% de confluência) foram tripsinizadas por cerca de 3 minutos para se desprenderem do fundo da garrafa. Em seguida, a tripsina foi inativada com DMEM acrescido de 10% SFB, e a suspensão centrifugada (Spectrafuge, Labnet Internacional Inc.) em um tubo de 50 mL a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 2 mL de meio DMEM suplementado. Determinou-se o número celular a partir da câmara de Neubauer, cerca de $5,4 \times 10^6$ células. Do volume total ressuspendido diluiu-se um volume de 0.8 μ L (aproximadamente 2×10^3 células) em 200 μ L de DMEM. Em duas placas de cultura de células de 96-poços, adicionou-se 200 μ L de DMEM e 1 μ L das células diluídas por poço, que foram incubadas por 24 horas.

4.7.2 Exposição às NPs

As células HEK293 foram expostas as NPs após a retirada de 150 μ L de meio DMEM de cada poço, e adição de 50 μ L dos respectivos tratamentos, peptídeos livres, NPs livres e peptídeos nanoestruturados, nas concentrações de 128, 64, 32, 16, 8 e 4 μ g/mL. As células HEK293 foram mantidas em contato com às NPs por 24 horas em estufa incubadora (REVCO) a 37° C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram baseados na norma ISO 10993-5 (2009) com algumas modificações.

4.7.3 Viabilidade celular pela técnica de MTT

Após a exposição de células HEK293 às NPs de alginato por 24 horas, analisou-se a viabilidade celular pelo ensaio de MTT (Tetrazólio de azul de tiazolilo, Sigma). Em cada poço da placa de 96-well adicionou-se 180 μ L de DMEM e 20 μ L de MTT (5 μ g/mL), após a retirada prévia dos tratamentos. Durante 4 horas as

placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ envoltas em papel alumínio, para que o MTT fosse reduzido pela atividade metabólica das células formando cristais de formazan, os quais dão uma cor azulada as amostras.

Após esse processo, retirou-se o conteúdo dos poços e adicionou-se 200 µL de Isopropanol-ácido (3,3 mL HCl a 37% em 1L de isopropanol) para que houvesse a solubilização dos cristais de formazan durante o período de 1 hora. Por último, transferiu-se o conteúdo dos poços para duas novas placas, para se realizar a quantificação por espectrometria do MTT metabolizado. Novas placas foram utilizadas para que possíveis células aderidas ao fundo dos poços não pudessem interferir na leitura. A leitura foi realizada a 570nm, 650nm e 690nm num espectrofotômetro (Varioskan Flash, Thermo®), utilizando como branco 3 poços com 200 µL de isopropanol-ácido.

4.8 Análises estatísticas

A normalidade dos dados obtidos neste trabalho foi confirmada através do teste de Shapiro-Wilk. No que se refere aos dados gerados pelo ensaio antimicrobiano, as comparações estatísticas foram realizadas por Análise Unidirecional da Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação de médias. Para os dados gerados pelo ensaio de MTT, as comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA, seguido pelo post hoc de Dunnett, uma vez que desejava-se comparar a média dos tratamentos com a média do grupo controle. Os valores de “p” menores ou igual a 0,01 e 0,05 foram considerados significativos. Todos os testes foram realizados no proGrama IBM SPSS Statistics 23.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanopartículas

5.1.1 Efeito Tyndall, Tamanho e Potencial Zeta (PZ)

Segundo Pang e colaboradores (2012), o efeito Tyndall é um fenômeno de dispersão de luz plasmônica por NPs em suspensão coloidal. Este pode ser visualizado a partir da incidência de um laser com luz vermelha (650 nm) sobre a suspensão. As NPs possuem um tamanho da ordem do comprimento de luz visível. Com isso interagem dispersando os raios luminosos, sendo possível a visualização do trajeto da luz. Na **Figura 6**, após a síntese das NPs de alginato, pode-se observar o espalhamento da luz incidente (efeito Tyndall), o qual serve como um indicativo da formação das NPs.

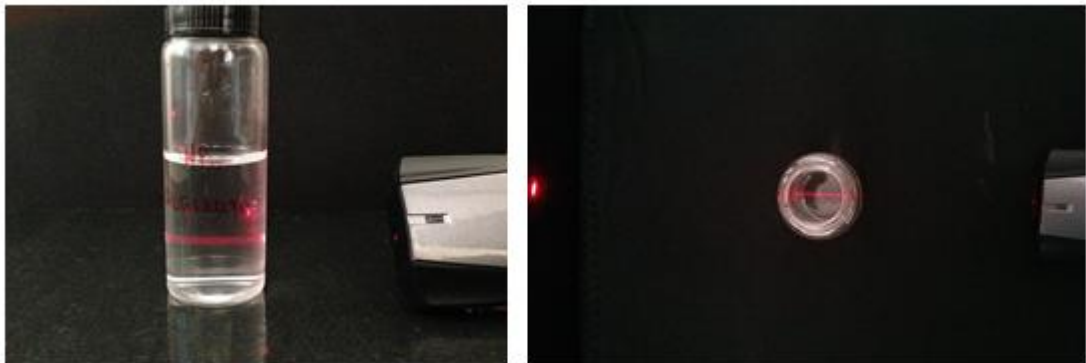


Figura 6. Efeito Tyndall em suspensão coloidal de nanopartículas de alginato.

Após a síntese das NPs, a técnica de análise de tamanho de partículas por difração laser foi utilizada para se obter o tamanho dessas. A média do tamanho das NPs de alginato sintetizadas foi de $85 \text{ nm} \pm 22 \text{ nm}$ (**Figura 7**), com partículas variando aproximadamente entre 25 a 150 nm. O tamanho obtido é ideal para o carregamento do AMP Lrot3, o qual possui pequeno tamanho, aproximadamente 1,2 kDa, possibilitando o aprisionamento e interação eletrostática com o mesmo. De acordo com Sarei e colaboradores (2013), o uso de concentrações de alginato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$) superiores a 0,3% levam a formação de estruturas macroscópicas, e o uso de concentrações de CaCl_2 superiores a 0,1% induzem a

agregados de gel microscópicos. Portanto, utilizou-se a proporção de 1:3 (CaCl_2 : $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$) para evitar a formação de tais estruturas, e se obter NPs de pequeno tamanho, com aproximadamente 100 nm (SAREI et al., 2013).

Ao entrar em contato com as bactérias espera-se que as NPs de menor tamanho possam atravessar a parede celular e membrana plasmática, liberando o peptídeo na parte interior do microrganismo, ou que os nanocarreadores se aglomerem na superfície das bactérias ou próximo a elas, liberando os AMPs (MORENO; GIRALT, 2015).

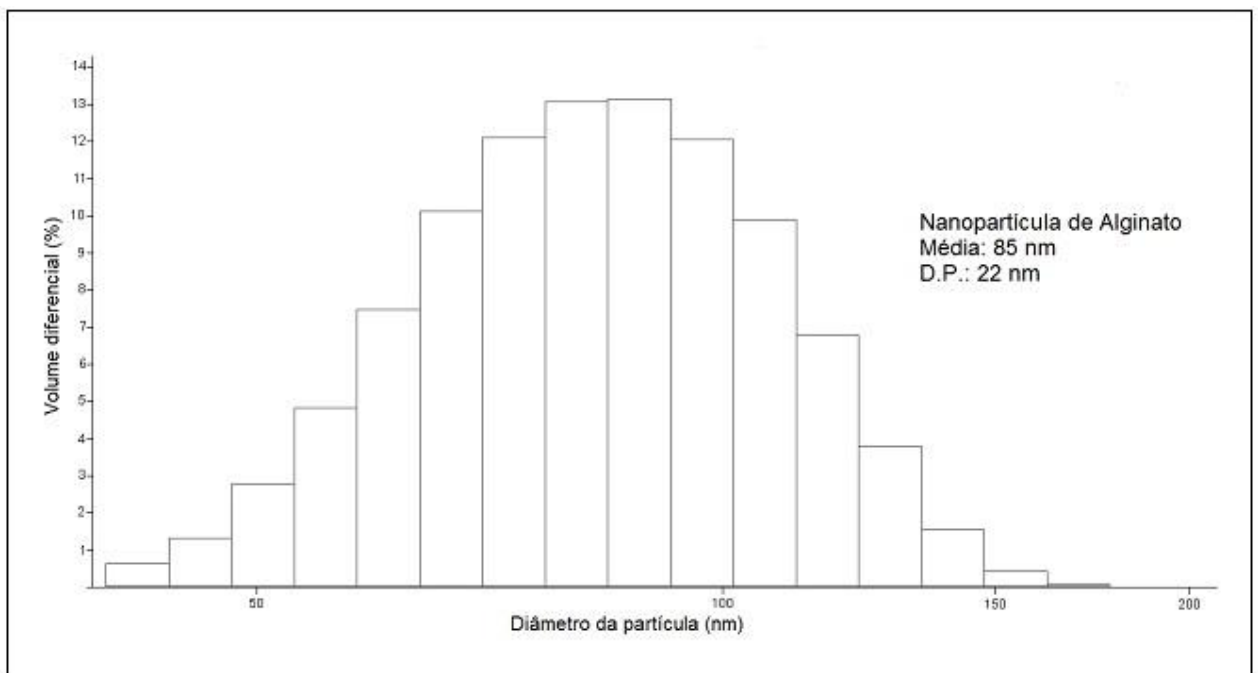


Figura 7. Representação do tamanho e diâmetro das nanopartículas sintetizadas pelo método de Gelificação Ionotrófica.

Baseado na mobilidade eletroforética das NPs em suspensão aquosa obteve-se um PZ médio de - 46,7 mV com um desvio de pico de 9.42 mV no pH de síntese, sugerindo uma boa estabilidade coloidal. Já está bem estabelecido que os PZs maiores que 30 mV (em módulo) do material particulado, geralmente são considerados estáveis por repulsão eletrostática (JIANG et al., 2009) e uma baixa condutibilidade de 0.763 mS/cm (**Figura 8**).

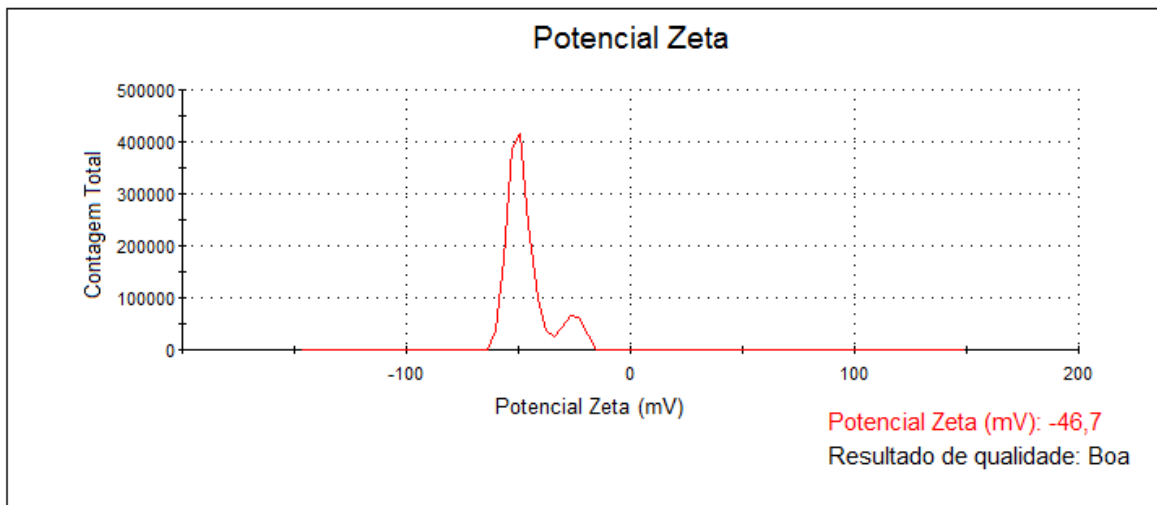


Figura 8. Estabilidade coloidal de nanopartículas de alginato cálcio por potencial Zeta.

5.2 Análise do pH

Quanto as características físico-químicas observadas, as NPs em suspensão coloidal apresentaram aspecto líquido e homogêneo, sem precipitação e instabilidade aparente.

A estabilidade da suspensão também foi verificada pela mensuração do pH das amostras submetidas a diferentes condições de temperatura em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Foi observada pouca variação do pH principalmente na suspensão armazenada a temperatura ambiente (25°C), com mínima de 6.7 e máxima de 7. Após 96 horas os 3 tubos apresentaram valores de pH similares (**Figura 9**), variando entre 0,2 e 0,3 em relação do marco 0. A não acidificação da suspensão indica que não houve degradação do polímero durante esse período, o que é importante para a liberação controlada do peptídeo. Por meio desses dados verificou-se que as NPs mantiveram sua estabilidade pelo período de 96 horas independente da temperatura a qual foram armazenadas.

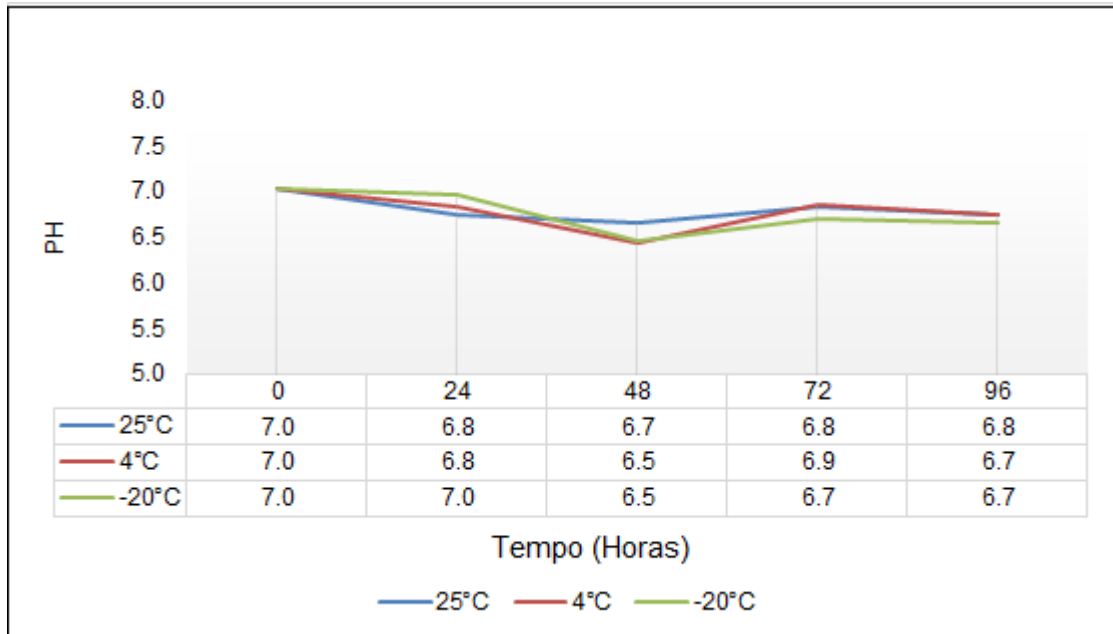


Figura 9. Variação do pH da suspensão coloidal de nanopartículas de alginato em função do tempo e temperatura.

5.3 Ensaio Antimicrobiano

A atividade antimicrobiana do peptídeo Lrot3 livre e nanoestruturado foi avaliada contra as bactérias *S. epidermidis* ATCC 12228 e *E. coli* ATCC 25922, e comparada a ação do antibiótico cloranfenicol. Os inóculos de ambas bactérias foram expostos aos tratamentos citados anteriormente em diferentes concentrações por 24 horas. Realizou-se a análise da absorbância para se obter a mínima concentração de PLs e NPs contendo o AMP Lrot3 necessária para a inibição do crescimento bacteriano, visto que a absorbância apresenta relação direta com a concentração bacteriana.

O antibiótico utilizado como controle, o cloranfenicol, mostrou-se eficaz nas três concentrações utilizadas sobre o inóculo de *E. coli* ($p < 0,01$) (**Figura 10**). Para esta bactéria Gram-negativa, a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ destacou-se por ser aquela à qual o PL possui atividade antimicrobiana ($p < 0,01$), apresentando ação similar ao do cloranfenicol, respectivamente, nas concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$, mas inferior à maior concentração (1280 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 10**). As NPs, por sua vez, mostraram-se eficazes em todas as concentrações ($p < 0,01$), sem diferença significativa entre estas, com exceção da NP na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, a qual se sobressaiu sobre as demais, com $p < 0,05$ quando comparada as NPs nas

concentrações de 128, 8 e 4 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 10**). A concentração mínima inibitória de NPs foi de 4 $\mu\text{g/mL}$, a qual gerou uma inibição de 55% na concentração bacteriana.

Ao se comparar o efeito dos PLs ao das NPs, evidenciou-se que as NPs nas concentrações de 64, 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um efeito superior a todas as concentrações de PLs.

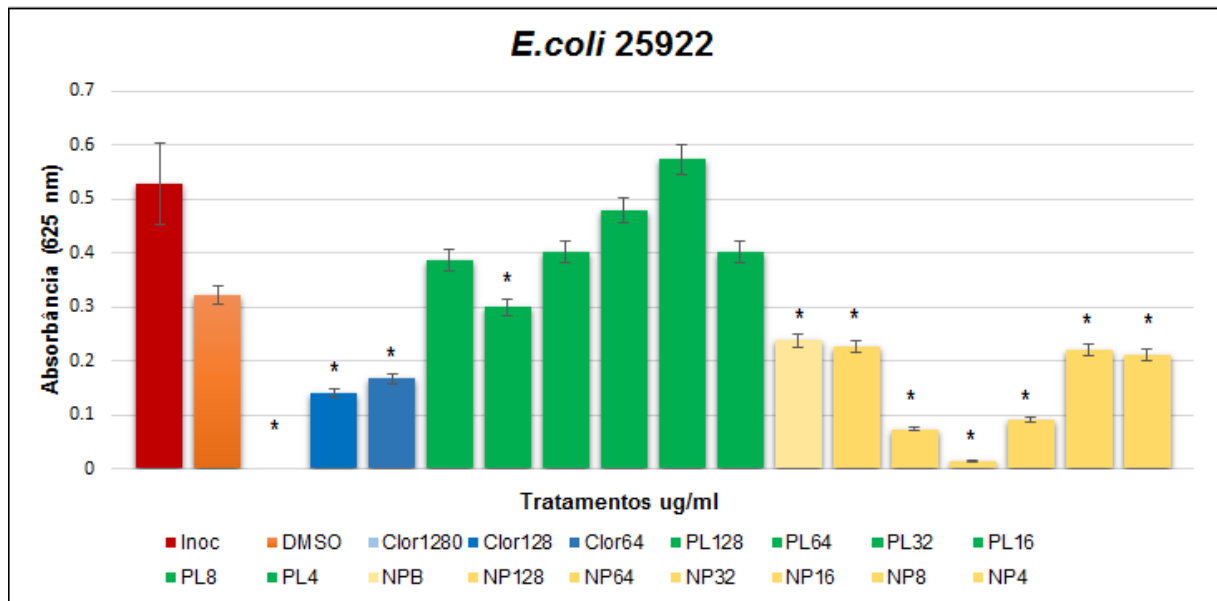


Figura 10. Absorbância média da bactéria Gram-negativa *Escherichia Coli* exposta ao peptídeo Lrot3 livre e nanoestruturado em diferentes concentrações por 24 horas a 37°C. *Inoc: Inoculo, Clor: Cloranfenicol, PL: Peptídeo livre, NPB: Nanopartícula branca (sem peptídeo), NP: Nanopartícula contendo o peptídeo. Os números indicam as respectivas concentrações em $\mu\text{g/mL}$. Cloranfenicol como controle positivo. Inóculo como controle negativo. DMSO como controle negativo relativo. * $p < 0,01$ quando comparado ao Inóculo no programa IBM SPSS Statistics 23.

Por meio da sua estrutura primária, Tavares (2015) observou que que o AMP Lrot3 possuía estrutura similar ao do AMP Temporin ALj, com ação antimicrobiana conhecida contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumillus* e *Bacillus cereus* e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Bacillus dysenteriae*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas aeruginosa* (TAVARES, 2015; WANG et al., 2010). Todavia, no presente trabalho foi observado uma maior resistência da bactéria Gram-positiva, *S. epidermidis* 12228, ao PL, nanoestruturado e mesmo ao antibiótico utilizado em questão. O cloranfenicol na concentração de 1280 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de causar a diminuição do número de bactérias ($p < 0,05$), todavia o mesmo não ocorreu nas demais concentrações, onde observou-se aumento da absorbância. Tal resultado, condiz com as informações presentes na

literatura de que bactérias Gram-positivas apresentam baixa sensibilidade a estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina e alta resistência a ruptura física (MOREIRA et al., 2015). O PL não mostrou qualquer efeito antimicrobiano sobre a bactéria Gram-positiva independente da concentração, havendo crescimento igual ou superior ao do controle negativo em todas as concentrações (**Figura 11**). Conseqüentemente relatou-se o mesmo para as NPs, indicando a existência de uma maior resistência desse microrganismo aos AMP Lrot3 livre e nanoestruturado (**Figura 11**).

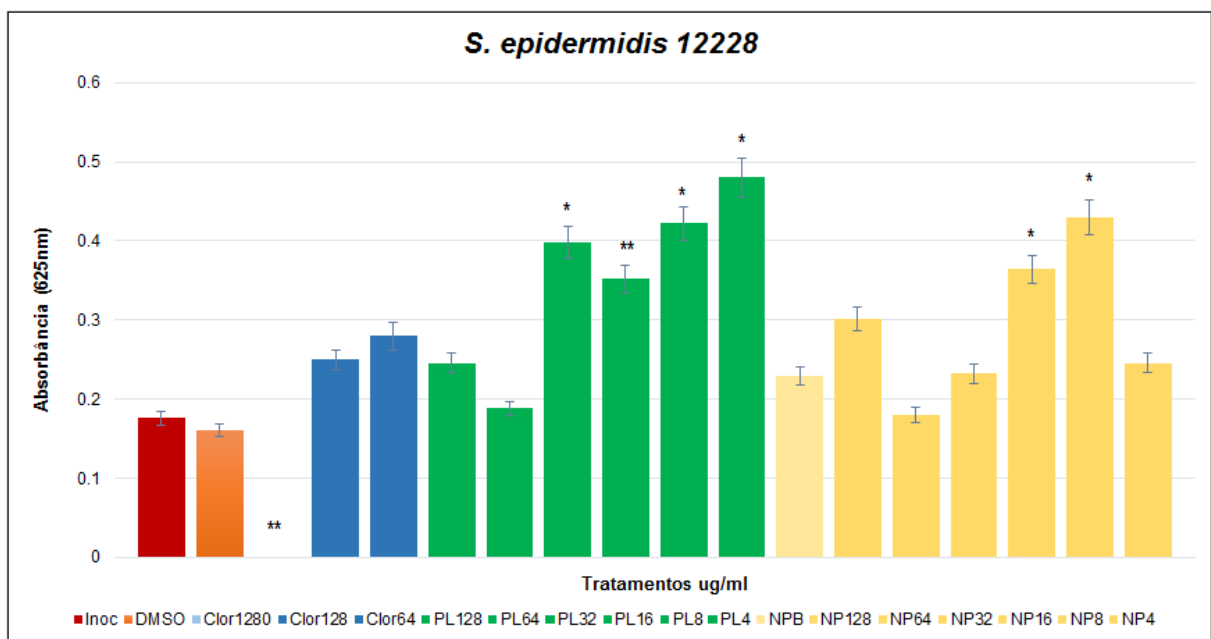


Figura 11. Absorbância média da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* exposta ao peptídeo Lrot3 livre e nanoestruturado em diferentes concentrações por 24 horas a 37°C. *Inoc: Inóculo, Clor: Cloranfenicol, PL: Peptídeo livre, NPB: Nanopartícula branca (sem peptídeo), NP: Nanopartícula contendo o peptídeo. Os números indicam as respectivas concentrações em µg/mL. Cloranfenicol como controle positivo. Inóculo como controle negativo. DMSO como controle negativo relativo. * p < 0,01 quando comparado ao Inóculo. ** p < 0,05 quando comparado ao inóculo no programa IBM SPSS Statistics 23.

Como demonstrado, a bactéria *E. coli* 25922 mostrou maior sensibilidade às NPs contendo o AMP Lrot3 do que *S. epidermidis* 12228. Na bactéria Gram-negativa, vê-se que após a nanoestruturação houve aumento da eficácia dos PLs, ampliando o efeito antimicrobiano, que antes se restringia a concentração de 64 µg/mL, para as demais concentrações. O AMP Lrot3 nanoestruturado mostrou maior efeito antimicrobiano em menores concentrações, com destaque para a concentração de 32 µg/mL, a qual mostrou efeito similar ao do cloranfenicol na

concentração de 1280 µg/mL, quase erradicando por completo as células bacterianas.

Esse resultado se assemelha ao relatado por Marques (2012), no qual o peptídeo Clavanina A mostrou-se mais eficaz na forma nanoestruturada do que livre contra as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae* (MARQUES, 2012). Tais dados sugerem, que a nanoestruturação pode ampliar o efeito bacteriostático de AMPs e diminuir a necessidade de doses maiores, tornando o tratamento mais eficiente.

Tendo em mente a utilização do AMP Lrot3 como princípio ativo para a produção de um fármaco antimicrobiano, a possibilidade de utilizar uma menor concentração do mesmo seria benéfica para os pacientes, pois diminuiria as chances de efeitos colaterais. Além disso, poderia tornar o produto mais acessível à população, uma vez que, o uso de menores quantidades desse AMP acarretaria em um menor custo de produção do fármaco, diminuindo o preço final que este chegaria as farmácias.

Uma hipótese para as diferenças observadas entre as bactérias frente aos mesmos tratamentos, seria a influência da composição da parede celular na ação do PL e nanoestruturado. As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa composta por várias camadas de peptidoglicanos que conferem rigidez a esta (KIM et al., 2015), podendo dessa forma, dificultar a passagem das NPs. O alginato é importante para a manutenção da estabilidade do peptídeo. Dessa forma, caso os AMPs fossem liberados e ficassem retidos na parede celular, acabariam se tornando instáveis e sendo degradados.

Por meio da modelagem realizada por Tavares (2015), viu-se que o AMP Lrot3 provavelmente apresenta estrutura estendida ou linear (TAVARES, 2015). Os AMPs estendidos geralmente agem intracelularmente, logo precisam atravessar a parede celular e a membrana plasmática para chegar ao seu sítio de ação no citoplasma das células bacterianas. Dentre os diversos mecanismos desses AMPs, pode-se citar sua ação sobre proteínas, como as chaperonas, e sobre a forquilha de replicação, prevenindo a recombinação e reparo do DNA (NGUYEN et al., 2011).

Além disso, essas bactérias são capazes de produzir enzimas que modificam os componentes de sua parede celular (ex.: peptidoglicanos), reduzindo a carga negativa da célula (NAWROCKI et al., 2014) e a afinidade desta pelos AMPs. Outro mecanismo frequentemente utilizado é o efluxo de partículas tóxicas ou com efeito antimicrobiano para fora da célula (BAND; WEISS, 2015). Conjuntamente, todos

esses mecanismos contribuem para a resistência bacteriana, e podem ter sido responsáveis pela baixa sensibilidade de *S. epidermidis* 12228 aos PLs e NPs utilizados no presente experimento.

5.4 Avaliação da Viabilidade Celular após incubação com as NPs de alginato

As células HEK293 foram incubadas com distintas concentrações de AMP Lrot3 livres e nanoestruturados por 24 horas. As concentrações utilizadas para ambos os tratamentos foram de 128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g/mL}$. O meio MSB foi utilizado como controle negativo, o cloranfenicol como controle positivo, e o DMSO como controle negativo relativo. Após a leitura da densidade ótica, estipulou-se que a média dos valores de absorbância encontrados no controle positivo correspondia a 100% de células viáveis. A partir daí, calculou-se a viabilidade celular dos demais tratamentos em percentual comparando-se ao controle positivo.

Como pode-se observar na **Figura 12**, após a exposição das células HEK293 ao controle positivo cloranfenicol, houve uma grande diminuição da viabilidade celular. A quantidade de células viáveis foi menor que 50% em todas as concentrações do antibiótico quando comparadas ao controle negativo. Nas concentrações de 1280 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$, essa diferença mostrou-se significativa ($p < 0,05$). Observou-se fato semelhante no AMP Lrot3 livre de maior concentração (128 $\mu\text{g/mL}$), no qual a porcentagem de células viáveis foi de 42,2 %, e também no de menor concentração, com 39% de células viáveis. De acordo com o ensaio de MTT, o AMP Lrot3 nas concentrações de 64, 32, 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram um melhor desempenho, com uma viabilidade celular superior a 50% (61,5; 96,8; 74,8 e 72,8%, respectivamente). A concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ revelou-se a opção menos tóxica para as células, com a porcentagem de células viáveis similar ao do controle.

As células HEK293 expostas ao AMP Lrot3 nanoestruturado mostraram um melhor resultado quando comparadas as células expostas a esse AMP livre. Em todas as concentrações de NPs contendo o peptídeo, a viabilidade celular foi superior a 50%. As NPs nas concentrações de 128, 32, 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ mostraram uma maior porcentagem de células viáveis, superior a 80% (100; 88; 84,9 e 83%, respectivamente). Dessa maneira, a nanoestruturação do AMP Lrot3 parece ser benéfica, limitando a possível interferência que o AMP possa ter sobre as células

HEK293, e assim diminuindo a percentagem de células mortas após exposição ao tratamento. Tal resultado sugere que as NPs de alginato não são citotóxicas nas concentrações testadas, e que poderiam ser utilizadas na liberação controlada de fármacos.

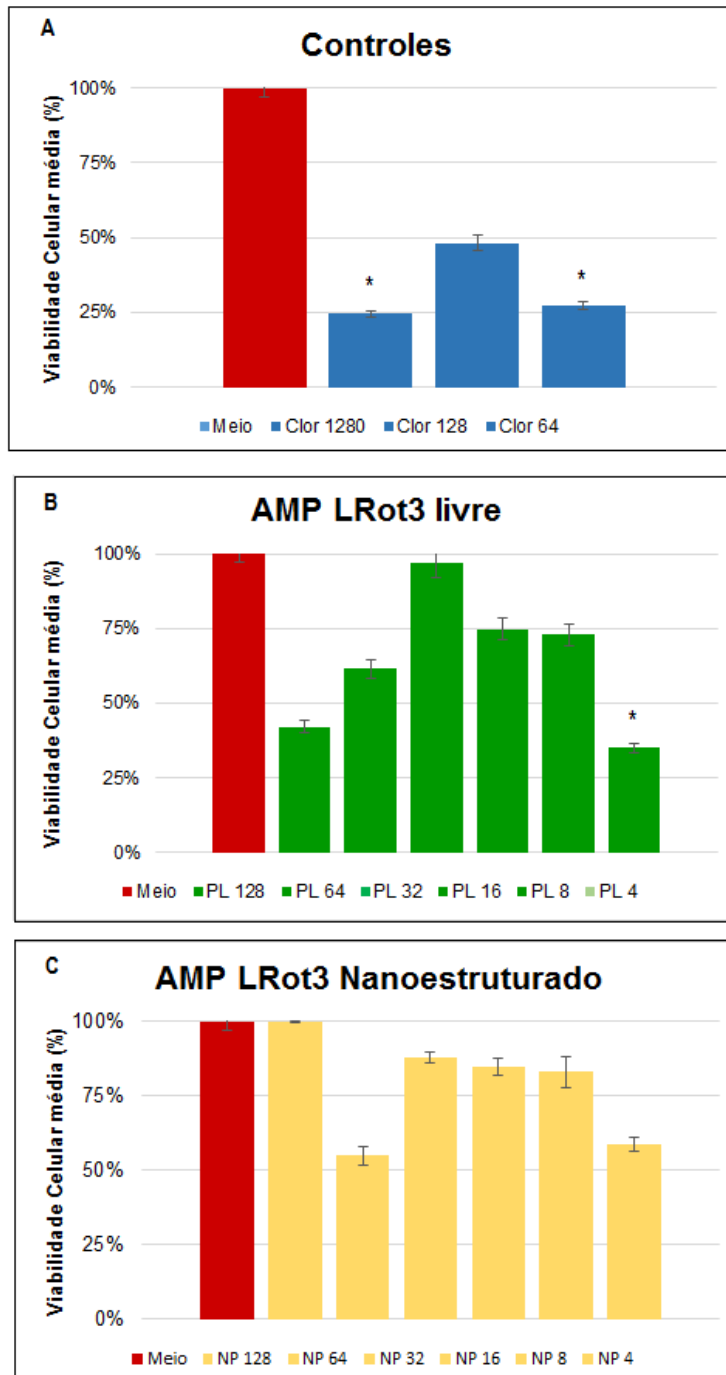


Figura 12. Avaliação da viabilidade das células HEK293 após 24 horas de exposição ao antibiótico cloranfenicol, AMP LRot 3 livres e nanoestruturado por meio do ensaio de MTT. *Clor: Cloranfenicol, AMPs: Peptídeos Antimicrobianos. Cloranfenicol como controle positivo. Meio MSB como controle negativo. *p < 0,05 quando comparado ao controle negativo no programa IBM SPSS Statistics 23.

Os polímeros são conhecidos por geralmente serem biodegradáveis e não - tóxicos segundo dados reportados na literatura provenientes de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*. Zahoor e colaboradores (2005), por exemplo, relataram que NPs de alginato carreando drogas com ação antitubercular não causam hepatotoxicidade em porquinhos da Índia. Sabe-se que as drogas administradas durante o tratamento da tuberculose podem causar efeitos adversos, como danos nos hepatócitos. Esse efeito foi prevenido após a nanoestruturação dos fármacos para a entrega controlada dos mesmos (ZAHOOR et al., 2005).

Estudos realizados com outros polímeros também mostram resultados similares. Prata (2011) observou *in vitro*, por meio do ensaio de MTT, que NPs de PLGA não causam citotoxicidade em células HEK humanas independente da concentração em que se encontram, mas que essas células apresentam certa sensibilidade as NPs, visto que a viabilidade celular diminui nas concentrações de 5mg/mL e 1 mg/mL.

Para averiguar se o mesmo acontecia após a degradação das NPs, Prata (2011) fez um teste de degradação acelerada, no qual as NPs foram submetidas a mecanismos de hidrólise e oxidação forçada. Osteoclastos obtidos da calvária de ratos Wistar foram incubados com NPs degradadas e avaliados pelo ensaio de MTT. Relatou-se que NPs brancas e contendo BSA degradadas não diminuem a viabilidade celular, sugerindo que estas não são citotóxicas na concentração testada (0,1 mg/mL) (PRATA, 2011).

Dessa forma, observa-se que a ausência de citotoxicidade encontrada no presente trabalho alinha-se com os resultados dos estudos citados anteriormente, e com os dados presentes na literatura, acerca da não toxicidade do alginato e dos polímeros em geral. Com isso, é possível que se dê continuidade aos estudos utilizando NPs de alginato para o carregamento de peptídeos, visando um tratamento eficaz contra bactérias patogênicas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho analisou-se se a nanoestruturação do AMP Lrot3 favoreceria o efeito antimicrobiano destes contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Os resultados sugerem que a bactéria *E. coli* 25922 é sensível as NPs de alginato contendo o AMP Lrot3 e que esse peptídeo exerce um efeito bacteriostático maior quando nanoestruturado. NPs na concentração de 32 µg/mL são suficientes para inibir o crescimento dessa bactéria Gram-negativa em quase 90%. O mesmo resultado não foi observado contra a bactéria *S. epidermidis* 12228, que se mostrou resistente a ambos tratamentos.

Por meio do ensaio de MTT constatou-se que as NPs de alginato contendo o peptídeo não são citotóxicas nas condições testadas. Tal resultado incentiva estudos futuros com novas espécies de bactérias, e também estudos *in vivo*. Além disso, novos ensaios devem ser feitos para averiguar o modo de ação do AMP Lrot3, elucidando se esse age na membrana celular bacteriana ou intracelularmente.

7 PERSPECTIVAS

A ação antimicrobiana do peptídeo Lrot3 nanoestruturado, assim como a ausência de citotoxicidade encontrada nesse trabalho, nas condições propostas, permite a continuação dos estudos para a produção de um possível fármaco. Devem ser realizados novos ensaios focados no modo de ação do AMP Lrot3 e na interação do peptídeo com a nanoestrutura que o carrega, assim como na sua interação com bactérias patogênicas.

Peptídeos nanoestruturados com ação antimicrobiana são uma inovação na área farmacológica. Na literatura existem poucos trabalhos utilizando a espécie *Lippia rotundifolia*, sendo que esses em sua maioria utilizam extratos e óleos essenciais, e não peptídeos provenientes da planta.

Essa Verbenacea parece ser promissora para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam uma alternativa ao uso dos antibióticos tradicionais, aos quais as bactérias adquirem rapidamente resistência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. G. D.; SILVA, O. N.; CANDIDO, E. D. S.; MOREIRA, J. S.; GOMES, D. G.; FREIRE, M. D. S.; BÜRCEL, P.H.M; JÚNIOR, N.G.O; VALENCIA, J.W.A.; DIAS, S. C. Screening and isolation of antibacterial proteinaceous compounds from flower tissues: Alternatives for treatment of healthcare-associated infections. **TANG**, v. 4, n. 1, p. 51-58, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de bactérias de importância médica - Módulo V. SAÚDE. M. D. Brasília: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

ATCC (American Type Culture Collection). Cell lines, 2017. Disponível em: <https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx> Acessado em: 03/01/2017.

BABU, L. H.; PERUMAL, S.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Myrtenal, a nature monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 369, n. 1/2, p. 183-193, 2012.

BAND, I.V.; WEISS, S.D. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 4, p. 18-41, 2015.

BASTOS, M.C.F.; CEOTTO, H.; COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S. Staphylococcal Antimicrobial Peptides: Relevant Properties and Potential Biotechnological Applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 38-61, 2009.

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

BUTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, a. 14, p. 1-15, 2015.

CASTRO, F.F.S. Identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de um novo peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha* contra bactérias multirresistentes. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde). UnB, Brasília, DF.

CHEN, W.; HUANG, S.; LIAO, C.; SUNG, C.; CHEN, J.; WEN, Z. The use of the antimicrobial peptide piscidin (PCD)-1 as a novel anti-nociceptive agent. **Biomaterials**, v. 53, p. 1-11, 2015.

CHEN, Q.; THOUAS, A. G. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering**, p. 1-57, 2015.

CHU, V.H.; MIRO, J.M., HOEN, B.; CABELL, C.H.; PAPPAS, P.A.; JONES, P.; STRYJEWSKI, M.E.; ANGUERA, I.; BRAUN, S.; MUNOZ, P.; COMMERFORD, P.; TORNOS, P.; FRANCIS, J.; OYONARTE, M.; SELTON-SUTY, C.; MORRIS, A.J.; HABIB, G.; ALMIRANTE, B.; SEXTON, D. J.; COREY, G.R.; FOWLER Jr., V.G. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis—a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. **Heart**, v. 95, p. 570-576, 2009.

CLSI. The Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard - Tenth Edition, 2015.

CROXEN, A. M.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 822–880, 2013.

CRUZ, J.; ORTIZ, C.; GUZMÁN, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, v.21, n. 20, p. 2299-2321, 2014.

DASS, C. R; CHOONG, P.F.M. Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. **Peptide**, v. 27, p. 3020-3028, 2006.

DISNER, GEONILDO RODRIGO; CESTARI, MARTA MARGARETE. NANOCIÊNCIA & NANOTECNOLOGIA. **Evidência- Ciência e Biotecnologia**, v. 16, n. 1, p. 71-76, 2016.

DUCHEYNE, P.; HEALY, K.; HUTMACHER, D. E.; GRAINGER, D. W.; KIRKPATRICK, C. J. **Comprehensive Biomaterials**, v. 1, Newnes, 2015.

FARKHANI, S. M.; VALIZADEH, A.; KARAMI, H.; MOHAMMADI, S.; SOHRABI, N.; BADRZADEH, F. Cell penetrating peptides: Efficient vector for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. **Peptides**, v. 57, p. 78-94, 2014.

FRATODDI, I.; VENDITTI, I.; CAMETTI, C.; RUSSO, M. V. How toxic are gold nanoparticles? The State-of-the-Art. **Nano Research**, p. 1-29, 2014.

GALLO, R.; NAKATSUJI, T. Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 1974-1980, 2011.

GARCIA, M.L.; CÉSAR, I.C.O.; BRAGA, C.A.; SOUZA, G.A.A.D.; MOTA, E.C. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

HAARMANN, R.; MOHAMED, I.; STEVANOVIC, M.; BREDEMEIER, R.; SCHLEIFF, E. The properties of the outer membrane localized Lipid A transporter LptD. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 22, 2010.

HARRISON, P. L.; HEATH, G. R.; JOHNSON, B. R.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; STRONG, P. N.; EVANS, S. D.; MILLER, K. Phospholipid dependent mechanism of smp24, an α -helical antimicrobial peptide from scorpion venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2737-2744, 2016.

HIRATA, I. Y.; CEZARI, M.H.S.; NAKAIE, C.R.; BOSCHCOV, P.; ITO, A.S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-amino benzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Letters in Peptide Science**, v. 1, n. 6, p. 299-308, 1994.

HOSKIN, D.W.; RAMAOTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 357-375, 2008.

HUBER, F.; LANG, H.P.; ZHANG, J.; RIMOLDI, D.; GERBER, C. Nanosensors for cancer detection. **Swiss Medical Weekly**, v. 145, 2015.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 77-89, 2009.

KANG, B.J.; JEUN, M.; JANG, G.H.; SONG, S.H.; JEONG, I.G.; KIM, C.; SEARSON, P.C.; LEE, K.H. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, 2015.

KIM, S. J.; CHANG, J.; SINGH, M. Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 350-362, 2015.

KOOHI, M.K.; MIRAKABADI, A.Z.; MOHARRAMI, M.; HABLLOVARID, M.H. "Anticancer effect of ICD-85 (venom derived peptides) on MDA-MB231 cell line (*in vitro*) and experimental mice with breast cancer (*in vivo*)", **International Journal of Veterinary Sciences and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 49-54, 2009.

KUMARI, S.R.; BADWAIK, R.; SUNDARARAJAN, V.; JAYARAMAN, V.K. Defensinpred: Defensin and Defensin Types Prediction Serve. **Protein; Peptide Letters**, v. 19, p. 1318-1323, 2012.

LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. N.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R.; VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y.A.G.; PINHEIRO, D.P.G.; DA SILVA, P.E.A.; TEIXEIRA, D.F.; JUNIOR, I.N.; LOURENÇO, M.C.S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 6-11, 2006.

LEITÃO, S. G.; OLIVEIRA, D. R. D.; SÜLSEN, V.; MARTINO, V., BARBOSA; Y. G., BIZZO, H. R.; LOPES, D.; VICCINI, L.F.; SALIMENA, F.R.G.; PEIXOTO, P.H.P.; LEITÃO, G. G. Analysis of the chemical composition of the essential oil extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008.

LEONG, J.; LAM, W.; HO, K.; VOO, W.; LEE, M.F.; LIM, H.; LIM, S.; TEY, B.; PONCELETC, D.; CHAN, E. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 855, 2015. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/partic> Acesso em: 20/05/2016.

LI, P.; DAI, Y.; ZHANG, J.; WANG, A.; WEI, Q. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. **International journal of Biomedical science**, v. 3, n. 4, p. 221-228, 2008.

LOVATI, A. B.; ROMANÒ, C. L.; BOTTAGISIO, M.; MONTI, L.; DE VECCHI, E.; PREVIDI, S.; ACCETTA, R.; DRAGO, L. Modeling *Staphylococcus epidermidis*-induced non-unions: subclinical and clinical evidence in rats. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2016.

LÜ, L.; ZHANG, L.; WAI, M.S.M.; YEW, D.T.W.; XU, J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 636-644, 2012.

MADER, J.S.; HOSKIN, D. W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, p. 933-946, 2006.

MARQUES, A. C. O uso da Clavanina A nanoestruturada no controle da sepse polimicrobiana. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). UnB, Brasília, DF, Brasil.

MINOGUE, T. D.; DALIGAULT, H. A.; DAVENPORT, K. W.; BISHOP-LILLY, K. A.; BROOMALL, S. M.; BRUCE, D. C.; CHAIN, P.S.; CHERTKOV, O.; COYNE, S.R.; FREITAS, T.; FREY, K.G.; GIBBONS, H.S.; JAISSE, J.; REDDEN, C.L.; ROSENZWEIG, C.N.; XU, Y.; JOHNSON, S.L. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. **Genome Announcements**, v. 2, p. 1-2, 2014.

MIRAKABADI, A.Z.; MAHDAVI, S.; KOOHI, M.K.; TAGHAVIAN, M. "Cytotoxic effect of ICD-85 (venom-derived peptides) on MDA-MB-231 cell line", **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. 619-627, 2008.

MIRAKABADI, A.Z.; SHAHRAMYAR, Z.; MOROVVATI, H.; LOTFI, M.; NOURI, A. "Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cell line (HL-60) by animal's venom derived peptides (ICD-85)", **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 3, p. 931-938, 2012.

MIRAKADABI, Z.; MORADHASELI, A.; SARZAEM, A.; SOHEILY, S.; MOROVATI, H. The anti-tumor efficacy of nanoparticulate form of ICD-85 versus free form. **Archives of Razi Institute**, v. 70, n. 1, p. 29-35, 2015.

MORADHASELI; MIRAKABADI. Comparative Cytotoxic Evaluation of Free and Sodium Alginate Nanoparticle-Encapsulated ICD-85 on Primary Lamb Kidney Cells. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 6, n. 3, p. 151-159, 2013.

- MORALES, M.M. Terapias Avançadas - Célula Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada a Saúde. Editora Atheneu, p. 247-252, 2007.
- MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M.; FROTA, C. C. Visualizações bacterianas e colorações. Fortaleza: Editora UFC, p.1- 70, 2015.
- MORENO, MIGUEL; GIRALT, ERNEST. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1126-1150, 2015.
- MULLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de alginato por microorganismos. **Polímeros**, v. 20, n. 10, 2011.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. Microbiologia Médica. 7ª edição. Editora Saunders Elsevier, 2014.
- NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Polymers in Biomedical Applications**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.
- NAWROCKI, L.K.; CRISPELL, K.E.; McBRIDE, M.S. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. **Antibiotics**, v. 3, p. 461- 449, 2014.
- 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, 2011.
- NGUYEN, T.D.; TRAN, T.H.; NGUYEN, C.H.; IM, C.; DANG, C.H. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin/alginate Nanoparticle as a Novel Drug Delivery System. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 3, p. 429 - 435, 2015.
- NOZAKI, A.C.M.; MARQUES, R.F.C.; DINIZ, I.M.A.; MARQUES, M.M.; MARQUI, J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. **COLAOB**, Natal, Rio Grande do Norte, 2012.
- OLIVERA, D. B.; BOMBANA, C.C.; RODRIGUES, G.A.G.; GOLÇALVES, R.J.; PARUSSOLO, L. Caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados da barra de mão de carrinhos e alças de cestas de supermercados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 407-412, 2015.

OMIDVAR, R.; XIA, Y.; PORCELLI, F.; BOHLMANN, H.; VEGLIA, G. NMR structure and conformational dynamics of AtPDFL2.1, a defensin-like peptide from *Arabidopsis thaliana*. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1864, n. 12, p. 1739-1747, 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf> Acesso em: 3/5/2016.

PANG, C.; JUNG, J.; LEE, J.W.; KANG, Y.T. Thermal conductivity measurement of methanol-based nanofluids with Al₂O₃ and SiO₂ nanoparticles. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 55, p. 5597-5602, 2012.

PRATA, W.M. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas. 2011. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFMG, Belo Horizonte, MG).

PETTY, N.K.; ZAKOUR, N.L.B.; STANTON-COOK, M.; SKIPPINGTON, E.; TOTSIKA, M.; FORDE, B.M.; MINH-DUY, P.; MORIEL, D.G.; PETERS, K.M.; DAVIES, M.; ROGERS, B.A.; DOUGAN, G.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A.; PITOUT, J.D.D.; UPTON, M.; PATERSON, D.L.; WALSHK, T.R.; SCHEMBRI, M.A.; BEATSON, S.A. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 5694-5699, 2014.

POWERS, K.W.; BROWN, S.C.; KRISHNA, V.B.; WASDO, S.C.; MOUDGIL, B.M.; ROBERTS, S.M. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 296-303, 2006.

RASHID, RAFI; VELEBA, MARK; KLINE, KIMBERLY A. Focal targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, 2016.

RESENDE, C. F.; BIANCHETTI, R. E.; OLIVEIRA, A.M.S.; BRAGA, V.F.; PEIXOTO, P.H.P. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 582-589, 2015.

REICHERT, J. M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 695-702, 2003.

REIS, P.C.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 53 - 65, 2006.

RHEIN-KNUDSEN, N.; ALE, M.T.; MEYER, A.S. Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3340-3359, 2015.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. **NBCI Bookshelf**, p. 1- 79, 2016.

SAKIRA, P.R.; JAMES, N.R. Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin deliver. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 354-361, 2016.

SALOUTI, M.; AHANGARI, A. Nanoparticle based Drug Delivery Systems for Treatment of Infectious Diseases. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. 2014.

SANCHEZ, FLORENCE; SOBOLEV, KONSTANTIN. Nanotechnology in concrete—a review. **Construction and building materials**, v. 24, n. 11, p. 2060-2071, 2010.

SAREI, F.; MOHAMADPOUR DOUNIGHI, N.; ZOLFAGHARIAN, H.; MORADI BIDHENDI, S.; KHAKI, P.; INANLOU, F. Design and evaluate alginate nanoparticles as a protein delivery system. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 2, p. 139-146, 2013.

SAYES, C.M.; GOBIN, A.M.; AUSMAN, K.D.; MENDEZ, J.; WEST, J.L.; COLVIN, V.L. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7587-7595, 2005.

SCHUBERT, S.; DELANEY T. J.; SCHUBERT S.U.J. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly (lactic acid). **Soft Matter**, v. 7, p. 1581-1588, 2010.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SORENSEN, O. E.; BORREGAARD, N.; COLE, A.M. Antimicrobial peptides in innate immune responses. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 61-77, 2008.

SOUZA, D. S.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; MARCELO, N. A.; AZEVEDO, I. L.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

TADESSE, A.D.; SHAOHUA, Z.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M.J.; McDERMOTT, P.F. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, 2012.

TAKAHASHI, H.; NIIDOME, Y.; NIIDOME, T.; KANEKO, K.; KAWASAKI, H.; YAMADA, S. Modification of Gold Nanorods Using Phosphatidylcholine to Reduce Cytotoxicity. **Langmuir**, v. 22, p. 2-5, 2006.

TAVARES, L. S. Desenvolvimento de Peptídeos Antimicrobianos a partir do Transcriptoma foliar de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*. 2015. **Tese** (Doutorado em Genética e Biotecnologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

TAY, C.Y.; FANG, W.; SETYAWATI, M.I.; CHIA, S. L.; TAN, K. S.; HONG, C.H.L.; LEONG, D.T. Nano-hydroxyapatite and Nano-titanium Dioxide Exhibit Different Subcellular Distribution and Apoptotic Profile in Human Oral Epithelium. **ACS Applied Materials; Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6248-6256, 2014.

TORTORA, G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10ª edição. Editora Artmed, 2012.

VOGEL, M.; SCHMITZ, R. P.; HAGEL, S.; PLETZ, M. W.; GAGELMANN, N.; SCHERAG, A.; SCHLATTMANN, P.; BRUNKHORST, F. M. Infectious disease consultation for *Staphylococcus aureus* bacteremia—A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 19-28, 2015.

WANG, M.; WANG, Y.; WANG, A.; SONG, Y.; MA, D.; YANG, H. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B v. 155, p. 72-76, 2010.

WARMUS, J. S.; QUINN, C.L.; TAYLOR, C.; MURPHY, S.T.; JOHNSON, T.A.; LIMBERAKIS, C.; ORTWINE, D.; BRONSTEIN, J.; PAGANO, P.; KNAFELS, J.D.;

LIGHTLE, S.; MOCHALKIN, I.; BRIDEAU, R.; PODOLL, T. Structure based design of an in vivo active hydroxamic acid inhibitor of *P. aeruginosa* LpxC. **Bioorganic; Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 2536-2543, 2012.

WIESNER-HANKS, T.; NELSON, R. Multiple Disease Resistance **in Plants**. Annual Review of Phytopathology, v. 54, p. 229-52, 2016.

WHO. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. 2011. Geneva, Suíça.

XIAO, Y.; LIU, C.; LAI, R. Antimicrobial peptides from amphibians. **Biomolecular concepts**, v. 2, n. 1-2, p. 27-38, 2011.

ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 298-303, 2005.

ZHANG, Y. Q.; REN, S. X.; LI, H. L.; WANG, Y. X.; FU, G.; YANG, J., QIN, Z.; MIAO, Y.; WANG, W.; CHEN, R.; SHEN, Y.; YUAN, Z.; ZHAO, G.; QU, D.; DANCHIN, A.; WEN, Y. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Molecular microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1577-1593, 2003.

ZHANG, L.; GALLO, R.L. Antimicrobial Peptides. **Current Biology**, v. 26, p. 1-21, 2016.