



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQUIM

THAÍS SANTOS FARIAS

**INTERAÇÕES MOLECULARES DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *OCELLATINA*
PT1 COM NANOAGREGADOS POLIMÉRICOS**

ILHÉUS

2019

THAÍS SANTOS FARIAS

**INTERAÇÕES MOLECULARES DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *OCELLATINA*
PT1 COM NANOAGREGADOS POLIMÉRICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Salay
Coorientador: Profa. Dra. Tércia Diniz Bezerra

ILHÉUS
2019

F224

Farias, Thaís Santos.

Interações moleculares do peptídeo antimicrobiano Ocellatina PT1 com nanoagregados poliméricos / Thaís Santos Farias. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.
75f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Salay.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Peptídeos. 2. Materiais nanoestruturados. 3. Polímeros condutores. 4. Anuros. I. Título.

CDD 547.756

THAÍS SANTOS FARIAS

**INTERAÇÕES MOLECULARES DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *OCELLATINA*
PT1 COM NANOAGREGADOS POLIMÉRICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Ilhéus, 28 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Carlos Salay
(Orientador – UESC)

Prof. Caio Fernando Gromboni
(Membro externo – IFBA)

Prof. Dra. Carla Fernanda Fávaro
(Membro interno – UESC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ser o meu refúgio e fortaleza, me dando força e coragem para concretizar meus objetivos;

À minha família, por acreditar na realização de mais esse sonho. Agradeço por também entenderem minhas ausências nesses últimos dois anos e nas fases cruciais do mestrado;

A dois professores o Msc Youssef Haun e o Dr. Ivon Lôbo, que foram essenciais para meu ingresso no mestrado. Me apoiaram, acreditaram, dedicaram um tempo para sanar algumas questões de química que eu tinha dúvidas. Enfim, vocês foram os mais essenciais para o início da realização desse sonho;

A UESC e ao PPGQUIM, por me proporcionar a chance de cursar o mestrado;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Salay, pelos ensinamentos, dedicação e oportunidade de trabalhar em uma área tão interessante para a minha profissão;

Ao Prof. Dr. Eloi Feitosa, por ter me dado a oportunidade de realizar parte do meu experimento em seu laboratório, na UNESP de São José do Rio Preto e por ter me recebido tão bem;

À Msc. Monique Lemos, pela atenção, apoio, carinho e ainda por compartilhar seu conhecimento e me auxiliar nos experimentos durante todo o período na UNESP;

À Prof. Dra. Tércia, pelo auxílio nos testes microbiológicos e pelas sugestões dadas para melhorar o trabalho;

Ao Prof. Dr. Fernando Rangel, por todo carinho, atenção, orientação, esclarecimentos de dúvidas e apoio durante o mestrado;

Ao Prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida, da UNB-Brasília, pela colaboração e síntese do meu peptídeo;

A Prof. (a) Dra Aline Silva, do laboratório de microbiologia do DCB, e da Gerlab, por permitir a realização dos testes microbiológicos em seu laboratório;

À banca examinadora, por ter aceito o convite;

As minhas colegas de trabalho: Cássia Fernanda pela flexibilização dos horários para que eu conseguisse conciliar o mestrado, e a amiga Silmara Bitencourt pela torcida e palavras de incentivo de sempre;

Aos colegas do mestrado, mas em especial a Jordan (pela ajuda principalmente na Inorgânica) e a Floriatan pela parceria e disponibilidade de sempre;

A Nélida Marin, Nathália e Aline pela ajuda nos experimentos;

Enfim, obrigada a minha família, amigos e colegas pela torcida e incentivo de sempre;

Concluo mais essa etapa da minha vida, em parte, graças ao carinho e apoio de vocês.

RESUMO

O número de patógenos resistentes aos antimicrobianos convencionais vem aumentando nos últimos anos e se tornando um grande problema de saúde pública mundial. Em virtude disso, a procura por novas fontes de antimicrobianos vêm aumentando. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), têm sido o foco de grande interesse devido à baixa propensão ao desenvolvimento de resistência, alta eficiência em concentrações muito baixas, atividade de amplo espectro, especificidade do alvo, dentre outros. Porém como estes são suscetíveis de degradação enzimática a utilização de nanocarreadores é de suma importância, uma vez que podem oferecer proteção e direcionamento a alvos específicos no organismo. O presente trabalho tem como proposta incorporar o PAM *Ocellatina* PT1 em um nanocarregador polimérico (micelas do Plurônico F127), a fim de avaliar as interações moleculares presentes, bem como se esse sistema formado oferecerá uma melhor eficiência do composto bioativo. Para o estudo da interação físico-química, foram empregadas as técnicas de: Calorimetria Diferencial de Varredura, Espalhamento Dinâmico de Luz e Medidas de Potencial Zeta. Algumas das características apresentadas pelo sistema F127/OCEL PT1 foram: diâmetro micelar ideal, carga de superfície com valores próximos da estabilidade, pequenas alterações na temperatura micelar crítica e mudanças mais significativas na entalpia quando o peptídeo foi adicionado as micelas do F127. Essas características são importantes e podem servir para o desenvolvimento de nanocarreadores para sistemas de entrega controlada de fármacos. Com relação a atividade antimicrobiana, notou-se uma interferência negativa sobre o crescimento de *E. coli*, para a *ocellatina* pura e com a adição do F127, sob altas concentrações. Foi observado também, que a interação com o plurônico não levou a uma potencialização da atividade antimicrobiana no teste de difusão em placa realizado. Estes resultados demonstram a necessidade de ampliação deste estudo incluindo outros ensaios antimicrobianos e outros agentes patogênicos. Logo, acredita-se que no futuro com estudos complementares, os nanoagregados micelares de F127 poderão ser utilizados como nanocarreadores para o PAM *Ocellatina* PT1, com potencial uso terapêutico no desenvolvimento de um novo antibiótico, que é de suma importância diante do quadro de bactérias resistentes vivenciado na atualidade.

Palavras-chave: Nanoestruturas; Micelas Poliméricas; Plurônico F127; Anuros; *Leptodactylus ocellatus*.

ABSTRACT

The number of pathogens resistant to conventional antimicrobials has increased in recent years and has become a major global public health problem. As a result, demand for new sources of antimicrobials has been increasing. Antimicrobial peptides (PAMs) have been the focus of great interest due to the low propensity to develop resistance, high efficiency at very low concentrations, broad spectrum activity, target specificity, among others. However as these are susceptible to enzymatic degradation the use of nanocarriers is of paramount importance as they can provide protection and targeting specific targets in the body. The present work proposes to incorporate *Ocellatin*PT1 PAM in a polymeric nanocarregador (Plurônico F127 micelles), in order to evaluate the molecular interactions present, as well as if this formed system will offer a better efficiency of the bioactive compound. For the study of the physicochemical interactions, the following techniques were employed: Scan Differential Calorimetry, Dynamic Light Scattering and Zeta Potential Measurements.

Some of the characteristics presented by the F127 / OCEL PT1 system were: ideal micellar diameter, surface loading with values close to stability, small changes in critical micellar temperature and more significant changes in enthalpy when the peptide was added to F127 micelles. These characteristics are important and may be useful for the development of nanocarriers for controlled drug delivery systems. With respect to the antimicrobial activity, a negative interference was observed on the growth of *E. coli*, for the pure ocellatin and with the addition of the F127, in high concentrations. It was also observed that the interaction with the pluronic did not lead to a potentiation of the antimicrobial activity in the plate diffusion test performed. These results demonstrate the need to extend this study, including other antimicrobial and other pathogenic assays. Therefore, it is believed that in future with complementary studies, the micellar nanoaggregates of F127 can be used as nanocarriers for the PAM *Ocellatin* PT1, with potential therapeutic use in the development of a new antibiotic, which is of paramount importance in the context of currentely bacteria resistance.

Keywords: Nanostructures; Polymeric Micelles; Plurônico F127; Anurans; *Leptodactylus ocellatus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (A) Fórmula estrutural do copolímero tribloco plurônico F127; (B) Representação da formação micelar do F127 23
- Figura 2 – Classes estruturais dos peptídeos antimicrobianos. (A) Alfa-hélice; (B) Folha-beta; (C) Estrutura estendida; (D) Estrutura em alça 30
- Figura 3 – Esquema do método de preparação da mistura do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1e Plurônico F127 41
- Figura 4 – Termogramas de DSC do plurônico F127 em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h 48
- Figura 5 – Termogramas de DSC da interação do plurônico F127 em diferentes concentrações em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4, com o peptídeo *Ocellatina* PT1, à 0 µM, obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h..... 49
- Figura 6 – Variação da Temperatura Micelar Crítica (CMT) em função da concentração de F127 (mM), na ausência e na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1, à 50 µM, obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h..... 51
- Figura 7 – Entalpia micelização (ΔH_m) pela concentração de F127 (mM), na ausência e na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1 à 50 µM, obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h..... 53
- Figura 8 – Diâmetro hidrodinâmico das micelas do Plurônico F127 (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1,0 mM; 1,25 mM e 1,5 mM) na ausência e na presença do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, na concentração 50 µM, a 25°C 56
- Figura 9 – Potencial Zeta das micelas do Plurônico F127 (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1,0 mM; 1,25 mM e 1,5 mM) na ausência e na presença do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, na concentração 50 µM, a 25°C 59

Figura 10 – Controles utilizados nos testes biológicos.....	61
Figura 11 – Teste de atividade antimicrobiana: Resultados após 24 horas, contra <i>E. coli</i> (ATCC10536), utilizando o peptídeo <i>Ocellatina</i> PT1 nas concentrações de 400, 600, 800 e 1000 µg/ml, na presença (lado esquerdo) e na ausência (lado direito) do Plurônico F127	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência, massa molar, ponto isoelétrico e momento hidrofóbico do Peptídeo <i>Ocellatina</i> PT1, isolado da secreção de <i>Leptodactylus pustulatus</i>	33
Tabela 2 – Sequência dos aminoácidos das <i>Ocellatinas</i> PT1 à PT8 isolados da secreção de <i>Leptodactylus pustulatus</i>	34
Tabela 3 – Diâmetro médio (D_H) das micelas de F127 e do F127+ <i>Ocellatina</i> PT1 à 50 μ M, na temperatura de 25°C	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração microbicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração micelar crítica
CMT	Temperatura micelar crítica
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DELS	Espalhamento eletroforético dinâmico de luz
DELS	Espalhamento Dinâmico Eletroforético de Luz ou Potencial Zeta
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
ELS	Espalhamento de luz eletroforético
F127	Plurônico F127
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICHQ	Clioquinol
JI	Jeleína I
MM	Massa Molar (MM)
MPs	Micelas poliméricas
mV	Milivolt
OCEL PT1	<i>Ocellatina</i> PT1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PEO	Poli (óxido de etileno)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PPO	Poli (óxido de propileno)

RNA	Ácido ribonucleico
SLS	Lauril Sulfato de Sódio
UESC	Universidade Estadual Santa Cruz
UNESP	Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ΔH	Variação da entalpia
$\Delta H'$	Variação da entalpia da transição reversa
$\Delta T_{1/2}$	Largura do pico a meia altura
ε	Constante dielétrica
ζ	Potencial zeta
λ	Comprimento de onda
μe	Mobilidade eletroforética
Ω	Ómega

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1	MICELAS POLIMÉRICAS	20
3.1.1	Micelas do Plurônico F127	22
3.2	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:	29
3.2.1	Peptídeo Antimicrobiano: <i>Ocellatina</i> PT1	32
3.3	TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS DO F127	35
3.3.1	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	35
3.3.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	36
3.3.3	Potencial Zeta (ζ)	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MATERIAL	39
4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	40
4.2.1	Solução de Plurônico F127	40
4.2.2	Solução de <i>Ocellatina</i> PT1.....	40
4.2.3	Mistura de <i>Ocellatina</i> PT1 e Plurônico F127	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICELAS POLIMÉRICAS DE PLURÔNICO F127 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DA <i>OCELLATINA</i> PT1 (OCEL PT1)	41
4.3.1	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do plurônico F127 na presença e ausência da <i>Ocellatina</i> PT1 (OCEL PT1)	41
4.3.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	42
4.3.3	Potencial Zeta (ζ)	43
4.4	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	43
4.4.1	Preparo das soluções de <i>Ocellatina</i> PT1 e <i>Ocellatina</i> PT1 + Plurônico F127	43
4.4.2	Ensaio de inibição	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5.1	ESTUDO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) DO PLURÔNICO F127 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO <i>OCELLATINA</i> PT1	46
5.2	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)	54
5.3	POTENCIAL ZETA (Z)	58
5.4	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	60
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A procura por peptídeos que apresentem atividade antimicrobiana potencializada e que tenham menor toxicidade para as células de mamíferos tem aumentado de maneira significativa (ALVARES, 2011; ROSCIA et al., 2013; WHO, 2015). Isso acontece em razão do crescente aumento de cepas resistentes aos antibióticos convencionais, largamente empregados na prática clínica (ALVARES, 2011; ROSCIA et al., 2013; SEVCSIK et al., 2008; WHO, 2015). Estima-se que em média 50.000 pessoas vão a óbito por ano, nos Estados Unidos e na União Europeia, em decorrência de infecções bacterianas não tratáveis associadas à resistência aos antibióticos convencionais (O'NEILL, 2014). Os efeitos prejudiciais decorrentes desse problema já estão sendo manifestados em todo o mundo.

Uma lista com 12 famílias de bactérias resistentes aos tratamentos atuais foi publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017. A lista teve como objetivo orientar, promover e encorajar a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). Nos últimos 40 anos, somente três antibióticos foram descobertos (ARCHILHA, 2009), deixando o cenário farmacêutico carente de alternativas terapêuticas para o tratamento de determinadas infecções. Em virtude disso, a procura por novas fontes de antimicrobianos tem aumentando e os peptídeos antimicrobianos (PAMs) vêm sendo considerados como uma alternativa promissora (ALVES; PEREIRA, 2014; FREIRE, 2014; MANDAL et al., 2009; PERINI, 2013; VELTRI; KAMATH; SHEHU, 2018), sendo o seu mecanismo de ação um fator de suma importância para o sucesso na aplicação deles.

Tem sido reportado, que o mecanismo pelo qual os PAMsexercem sua função envolve a desestabilização das membranas biológicas (FREIRE, 2014; MECKE et al., 2005; MEINCKEN; HOLROYD; RAUTENBACH, 2005; PERINI, 2013), porém, novas evidências sugerem que tal desestabilização pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais os PAMs podem atuar. Além dos efeitos via membrana causados por esses peptídeos, são citados também mecanismos envolvendo a inibição da síntese de DNA, bloqueios na síntese de RNA, inibição de funções ribossômicas que acabam interferindo na síntese de proteínas que são fundamentais para a sobrevivência de tais patógenos. Esses variados modos de ação, inclusive diferentes dos antibióticos convencionais, acabam dificultando o desenvolvimento de

resistência microbiana (AOKI; UEDA, 2013; KANG et al., 2017; PERINI, 2013; ROSCIA et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados em diversas fontes naturais também isolados de várias espécies, tais como bactérias, plantas, insetos, anfíbios, mamíferos. Além da ação antibacteriana, tem sido verificado que muitos desses peptídeos também podem apresentar atividade antifúngica, antiparasitária, antiviral, antitumoral, dentre outras (MARANI et al., 2015). Outros motivos que levam ao sucesso da utilização destes PAMs são que eles normalmente apresentam atividade de amplo espectro, eficácia elevada mesmo em pequenas concentrações, especificidade e sinergismo de efeito quando associados com antimicrobianos já conhecidos (ALVES; PEREIRA, 2014). Apesar de tais benefícios, a utilização de peptídeos como fármacos esbarra em algumas limitações, uma vez que apresentam meia-vida curta, são suscetíveis a degradação enzimática e possuem pouca permeabilidade através das membranas biológicas (MELO; JUNIOR; FIALHO, 2012). Este problema pode ser resolvido com a utilização de nanocarreadores, como micelas poliméricas.

As micelas poliméricas podem auxiliar no encapsulamento de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas como também de compostos bioativos. Podem ainda auxiliar na solubilidade, tempo de retenção e biodisponibilidade do composto (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SILVA, 2013). Tal encapsulamento pode promover um aumento da eficiência, tolerabilidade, especificidade da droga, como também pode reduzir os efeitos tóxicos no organismo (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Um polímero que vem sendo amplamente utilizado como veículo para entrega de peptídeos e proteínas é o Plurônico F127 (F127), que tem como característica a manutenção da estabilidade como também o aumento da eficácia terapêutica do composto (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014). Dentre os peptídeos recentemente descritos não consta na literatura nenhum estudo analisando as interações moleculares do peptídeo *Ocellatina* PT1 com nanoagregados poliméricos, o que torna este, um campo praticamente inexplorado, capaz de gerar inúmeros resultados interessantes para a melhor compreensão da aplicabilidade desse PAM. Sendo assim, o presente trabalho busca compreender as interações moleculares do peptídeo *Ocellatina* PT1 com as micelas poliméricas do Plurônico F127 por meio de técnicas físico-químicas, como também busca avaliar a potencial atividade

antimicrobiana de tal peptídeo após ser incorporado nas micelas do plurônico F127, com o intuito de possibilitar o desenvolvimento de novos biomateriais nanoestruturados funcionalizados, para possíveis aplicações farmacêuticas e nanobiotecnológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar as interações moleculares do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 com as micelas poliméricas não iônicas do plurônico F127, bem como sua possível atividade antimicrobiana.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a temperatura micelar crítica (CMT) e a entalpia de micelização do plurônico F127 na presença e ausência do peptídeo *Ocellatina* PT1, por meio da técnica Calorimetria Diferencial de Varredura;
- Obter por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico, informações sobre o tamanho da micela polimérica do F127 em diferentes concentrações, e avaliar a influência da *Ocellatina* PT1 no diâmetro micelar;
- Obter por meio da técnica de medida de Potencial Zeta, informações sobre a estabilidade da micela do plurônico F127 e suas possíveis alterações com a interação do peptídeo *Ocellatina* PT1;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo *Ocellatina* PT1 contra microrganismos patogênicos na ausência e presença das micelas do plurônico F127.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MICELAS POLIMÉRICAS

Com o advento dos nanomateriais, houve um grande avanço nas técnicas de liberação de fármacos. Tal advento representou uma forte expansão do mercado farmacêutico, isso porque, a ação dos fármacos no organismo ainda encontra alguns obstáculos tais como baixa solubilidade, necessidade de altas dosagens para obtenção do efeito terapêutico, elevada toxicidade, meia vida curta e degradação in vivo (VALENZUELA OSES, 2016). Cerca de 50% das drogas aprovadas atualmente para uso farmacológico não apresentam boa solubilidade nas soluções aquosas fisiológicas, o que pode resultar em uma baixa absorção gastrointestinal e por consequência baixa biodisponibilidade do fármaco no organismo (CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007; SANTOS, 2015). Logo, as novas tecnologias para entrega de medicamentos têm como objetivo o aumento do perfil de liberação, adsorção, biodistribuição, excreção do ativo, tendo como resultado a maximização na eficiência do tratamento, com menor toxicidade, trazendo assim maiores benefícios para o paciente (DIGESU et al., 2016).

Com o intuito de aperfeiçoar e potencializar essas formulações, uma grande quantidade de nanoestruturas vem sendo estudadas e utilizadas para o transporte de fármacos, sendo alguns exemplos: micelas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbono, nanocristais, nanopartículas poliméricas, lipossomos, entre outros (DIGESU et al., 2016).

Dentre as diversas alternativas nanotecnológicas, as micelas poliméricas têm atraído grande interesse por parte da indústria farmacêutica pela sua capacidade de servir como um sistema de entrega de fármacos em escala nanométrica de maneira efetiva (HSIAO et al., 2018). Valenzuela Oses (2016) reúne em seu trabalho uma série de formulações aprovadas e em fase de ensaios clínicos disponíveis no mercado nos últimos anos, sendo que três fármacos: Doxorubicina (DOX), Oxiplatino (NC-4016) e Cisplatino (Nanoplatin), foram incorporados em micelas poliméricas. Os resultados encontrados vêm se mostrando promissores, sendo que a DOX já se encontra na fase III (envolvendo grandes populações), enquanto que os demais estão em fase I.

As micelas poliméricas (MPs) podem ser definidas como: nanoagregados composto de polímeros anfifílicos, que tem como característica a capacidade de se auto-organizarem espontaneamente em ambiente aquoso (BONFERONI et al., 2016; GJERDE et al., 2018; TYRRELL; SHEN; RADOSZ, 2010; VARSHOSAZ et al., 2015). Podem ser formadas por blocos copolímeros do tipo A-B (dibloco) ou A-B-A (tribloco), formando micelas com estrutura *core-shell* (núcleo-coroa), ou seja, onde o seu núcleo será hidrofóbico e sua coroa hidrofílica. Tendo uma larga aplicação na indústria farmacêutica como veículo de entrega controlada de fármacos (YOKOYAMA, 2011; VARSHOSAZ et al., 2015), proteínas e peptídeos (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014) como também de genes e moléculas de imagem (BATRAKOVA; KABANOV, 2008).

As MPs são de fácil produção, geralmente de pequenas dimensões, com diâmetro micelar em torno de 10 a 100 nm, o que lhes conferem uma maior estabilidade, possibilidade de incorporação de várias espécies químicas, além de maior tempo de circulação no organismo (SEZGIN; YUKSEL; BAYKARA, 2006; HSIAO et al., 2018; YOKOYAMA, 2011). Devido à sua baixa CMC (10^{-6} – 10^{-7} M), bem como a sua lenta cinética de dissolução, as MPs não se dissociam logo após a administração intravenosa (PACHIONI et al., 2016) e são consideradas seguras quanto à toxicidade crônica, uma vez que as cadeias que formam o copolímero podem ser separadas em monômeros no decorrer do tempo, o que favorece a excreção renal total desses copolímeros (YOKOYAMA, 2011).

Sua formação reflete um balanço complexo de diversas forças intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações estéricas, hidrofóbicas e eletrostáticas. A força atrativa principal é resultante do efeito hidrofóbico associado aos grupos hidrofóbicos, enquanto que a força repulsiva é resultante das interações eletrostáticas e/ou estéricas associadas aos grupos hidrofílicos. O processo de micelização é resultante do balanço entre as forças repulsivas e atrativas presentes (VALENZUELA OSES, 2016).

A mesofase polimérica será dependente do tamanho da cadeia hidrofóbica. Quando esta é menor que as cadeias hidrofílicas, o formato esférico das micelas é predominantemente, porém, se o grupo hidrofóbico for maior, as micelas assumem estruturas não esféricas diferentes (SANTOS, 2015). A principal vantagem do uso de micelas poliméricas consiste no fato delas apresentarem um tamanho suficiente para evitar a excreção renal, mas possuírem dimensão pequena o suficiente para

contornar as células endoteliais do baço, levando a um aumento na biodisponibilidade do fármaco no organismo (GAUCHER et al., 2005; SANTOS, 2015).

3.1.1 Micelas do Plurônico F127

Uma das classes desses copolímeros anfifílicos é a família dos Plurônicos, sendo o Plurônico F127 (F127), também conhecido como polaxâmero 407, amplamente utilizado no sistema de liberação controlada de fármacos. Quanto à sua forma, dependendo do comprimento de PPO e PEO, podem ser classificadas em esféricas, laminar ou bastão (KABANOV; ZHU; ALAKHOV, 2005).

A denominação dos Plurônicos leva em consideração o estado físico a temperatura ambiente (pasta (P), floco (F) e líquido (L)), o percentual de monômeros constituintes e a massa molecular de seus componentes. A nomenclatura segue o seguinte padrão: morfologia de cada copolímero (P, F ou L), seguido de um número de 2 ou 3 dígitos que são referentes às porções hidrofílica e hidrofóbica. O primeiro ou os dois primeiros dígitos (levando em consideração que o copolímero tenha 3 dígitos), multiplicados por 300, são referentes a massa molecular aproximada de PPO (porção hidrofóbica), já o último número multiplicado por 10 indica a porcentagem de PEO (porção hidrofílica) (ALEXANDRIDIS; HATTON, 1995; SANTOS, 2015; VALENZUELA OSES, 2016).

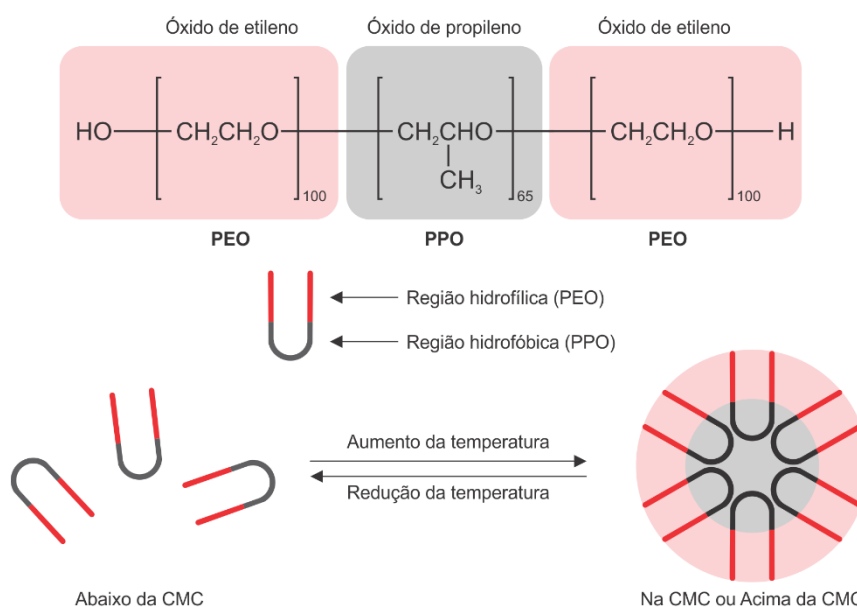
A utilização do Plurônico na obtenção de nanopartículas frente a outras rotas apresenta como vantagens a estabilidade das nanopartículas poliméricas formadas, rápida velocidade da preparação, uso de solventes ambientalmente amigáveis, levando a formação de um produto que pode ser facilmente aplicado em meio aquoso (ALEXANDRIDIS; TSIANOU, 2011).

O F127 possui massa molecular de 12600 g/mol, tem caráter não iônico e não é tóxico (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; KABANOV; ZHU; ALAKHOV, 2005). Suas micelas possuem o diâmetro em torno de 10 a 100 nm (YONG-YONG et al., 2013). Apresenta estrutura tribloco tipo ABA: PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀, onde PEO (óxido de etileno) corresponde à porção hidrofílica e o PPO (óxido de propileno) a porção hidrofóbica (Figura 1 – A). Suas micelas têm estrutura núcleo-coroa, sendo a coroa

hidrofílica e o núcleo composto por PPO, hidrofóbico (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014; WANG et al., 2017; YONG-YONG et al., 2013).

O F127 se auto-associa espontaneamente em micelas quando está acima da temperatura micelar crítica (CMT), ou quando está acima da concentração micelar crítica (CMC), pois quando estão abaixo delas, se apresentam apenas na forma de unímeros, sendo que este processo é reversível (Figura 1– B) (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014; KABANOV; ZHU; ALAKHOV, 2005). O processo de micelização é dependente da adequação desses dois fatores (concentração e temperatura). Esse fato pode ser observado no trabalho de Lee, Shin e Oh (2003) que demonstra que o valor da CMT diminui com aumento da concentração do F127.

Figura 1 – (A) Fórmula estrutural do copolímero tribloco plurônico F127; (B) Representação da formação micelar do F127



Fonte: Adaptada de AKASH; REHMAN; CHEN, 2014.

Outra forma na qual o plurônico F127 pode se apresentar é em forma de gel. Em altas concentrações em solução aquosa (acima de 20% p/p), ele se comporta como gel termorreversível (BOHORQUEZ et al., 1999). Quando colocado em temperatura ambiente, 25°C, ou abaixo desta, ele se apresenta na fase fluida (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014). No entanto, quando colocado na temperatura do corpo, cerca de 37°C, se apresenta na fase gel, gel sólido (AKASH; REHMAN; CHEN, 2014; ESCOBAR-CHÁVEZ, et al., 2006). Segundo a agência regulatória FDA (*Food and Drug Administration*), dos Estados Unidos, o copolímero F127 é

considerado um ingrediente inativo para diferentes tipos de preparações, tais como: solução oral, oftálmica, intravenosa, inalação, suspensões e formulações tópicas (GAWANDE; LEUNG; MADHYASTHA, 2014), podendo levar ao desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos para diversas vias de administração.

Muitos trabalhos (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; BUTT et al., 2012; EMAMI et al., 2018; ESTANQUEIRO, 2015; KUMARI; GHOSH; BISWAS, 2016; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MESHKINI; OVEISI, 2017; MOHAMED et al., 2018; MOREIRA, 2013; SANTOS, 2015; VARSHOSAZ et al., 2018; ZHANG et al., 2017) têm sido conduzidos utilizando o F127 com fármacos com propriedades anticancerígenas. Os resultados encontrados vêm sendo promissores, visto que o emprego das micelas permitiu um transporte eficiente da droga para as células tumorais, o que é particularmente importante para a redução dos efeitos adversos da terapia antineoplásica. Valenzuela Oses (2016) aponta que a incorporação da miltefosina (que tem atividade antineoplásica, com aplicação limitada devido ao seu potencial hemolítico) em micelas do F127, possa ser uma alternativa para o tratamento do câncer de pulmão e cervical. O autor afirma ainda, que houve redução da toxicidade com o emprego de tal sistema, tornando essa estratégia promissora para viabilizar o emprego dessa e de outras alquilfosfocolinas no tratamento do câncer.

Diversas formulações de Plurônico, dentre elas o F127, foram estudadas com o intuito de avaliar o encapsulamento e a biodisponibilidade após administração oral de acetato de magestrol, que é um fármaco hidrofóbico, utilizado no combate do câncer do endométrio e de mama e também tem aplicações no combate de determinadas patologias associadas ao HIV. Os resultados para o F127 mostraram um aumento na biodisponibilidade do fármaco de 1,5 a 2 vezes nos ratos modelos quando comparados ao sistema controle (ALAKHOV et al., 2010).

Uma associação entre o F127 e o composto doxorubicina (que é um potente anticancerígeno), foi desenvolvido com o intuito de levar a um direcionamento na entrega do fármaco. A doxorubicina (DOX) foi encapsulada tanto em nanomicelas do plurônico F127, como em nanomicelas funcionalizadas do F127, que foram ligadas a um peptídeo, o PV7 (F127-PV7), cuja função, era direcionar a entrega do fármaco no núcleo. Os resultados demonstraram eficiência de encapsulamento da droga nos percentuais de 88,57% e 72,68%, respectivamente. Sendo que, os melhores resultados referentes à liberação da droga, citotoxicidade e apoptose

foram obtidos com a nanomicela F127-PV7-DOX, sugerindo portanto, que esta pode ser uma alternativa de veículo de entrega de fármaco com direcionamento voltado para núcleo (YONG-YONG et al., 2013).

Diversas formulações têm sido investigadas e propostas para a administração de agentes antibacterianos no tratamento da doença periodontal iniciada por placa. Um sistema de entrega de drogas por intrusão, contendo hclato de Doxiciclina, um agente antibacteriano, foi proposto para a formulação de géis periodontais pela técnica de gelificação induzida por temperatura com a utilização do F127, que mostrou o fenômeno de transição sol-gel entre 27 e 37 °C. A formulação encontrada mostrou ser solúvel em temperatura ambiente e tem a característica de formar gel depois da instalação no bolso periodontal. Os resultados encontrados foram satisfatórios segundo os autores, uma vez que, houve aumento do tempo de retenção do ativo, lenta liberação do fármaco no local desejado, com um aumento na biodisponibilidade, sendo considerado uma boa alternativa e um sistema de entrega eficaz para a entrega de tal ativo para o tratamento da doença periodontal (GORLE; KHAIRNAR, 2018).

O antibiótico levofloxacino quando incorporado em nanopartículas poliméricas de F127 e de outros plurônicos, teve como resultados um aumento na inibição do crescimento bacteriano, uma vez que a concentração inibitória mínima (CIM) foi reduzida, possibilitando inclusive o uso destas formulações com levofloxacino em cepas que já apresentem algum grau de resistência (ALVES et al., 2016).

Nos trabalhos de Mendonça et al., (2019), a eficácia in vivo do Flau-A (um derivado da naftoquinona) que foi incorporado em um sistema de micelas à base de F127, foi avaliada em um modelo murino contra a infecção por *L. Amazonensis*. Anfotericina B (AmB) e Ambisome foram utilizados como controles. Os animais foram infectados e depois tratados com os compostos e após trinta dias do tratamento, parâmetros parasitológicos e imunológicos foram avaliados. Os resultados mostraram que os animais tratados com AmB, Ambisome, Flau-A ou Flau-A/Micela apresentaram um diâmetro de lesão médio e carga parasitária significativamente menores nos tecidos e órgãos avaliados, quando comparados aos grupos controle (solução salina e micela). Os camundongos tratados com Flau-A ou Flau-A/Micela apresentaram reduções mais significativas na carga parasitária, quando comparados com os demais. A ausência de toxicidade também foi observada, embora os ratos que receberam AmB tenham apresentado altos níveis

de marcadores de dano renal e hepático. Os autores sugerem que o resultado encontrado do composto Flau-A/Micela pode ser considerado como um possível alvo terapêutico a ser avaliado contra a leishmaniose humana (MENDONÇA et al., 2019). Outro trabalho semelhante com o composto clioquinol (ICHQ) foi realizado e resultados positivos e semelhantes quanto ao diâmetro de lesão médio, carga parasitária e toxicidade também foram encontrados após a adição do ICHQ no sistema micelar, sendo também colocados como um possível candidato para o tratamento da doença (TAVARES et al., 2019).

Hidrogéis a base de F127, com propriedade antibacteriana também vem sendo projetados para a cicatrização de feridas na pele. Os resultados encontrados vêm demonstrando aceleração significativa na taxa de cicatrização da ferida, com maior espessura de tecido de granulação, depósito de colágeno e fator de crescimento endotelial regulado positivamente, com desempenho hemostático eficiente e biocompatibilidade, sendo considerado um tratamento promissor para a cicatrização de feridas na pele das articulações (QU et al., 2018).

A utilização do F127, também mostrou grande potencial para aplicação clínica como uma vacina antitumoral eficaz para imunoterapia adicional. Os resultados encontrados mostraram que a combinação de nanopartículas carboxiladas NPs/ovalbumina de antígeno OVA/agonista CL264 do receptor-7, inibiram significativamente o crescimento tumoral, como também prolongou marcadamente a sobrevivência de camundongos portadores de tumores. Além disso, foi observado que o tamanho pequeno, 60 nm das micelas mistas, permite que elas penetrem rapidamente nos vasos linfáticos e consigam drenar os linfonodos após a injeção subcutânea (LI et al., 2018).

Uma característica de uma terapêutica ideal para uso nos pulmões e na traquéia é que a atividade antimicrobiana potente aconteça sem danificar os cílios que desempenham um papel crítico nesses tecidos. Potentes atividades antimicrobianas da ceragenina CSA-131 foram relatadas em alguns trabalhos, entretanto, alguns estudos realizados in vivo demonstraram que em concentrações necessárias para erradicar os biofilmes estabelecidos, uma perda da função ciliar foi notada. Ao formular o CSA-131 em micelas do F127, os danos aos cílios foram eliminados sem afetar a atividade antimicrobiana, sendo que a capacidade para redução das populações de patógenos fúngicos no tecido traqueal e pulmonar também foi observada. Os autores sugerem que tal ceragenina sendo formulada em

tais micelas, pode atuar como um potencial terapêutico para infecções polimicrobianas e que estejam relacionadas com biofilme no pulmão e na traquéia (HASHEMI et al., 2018).

O peptídeo antibacteriano catiônico Ceragenin CSA-13 obteve favorecimento também com a associação com o plurônico F127, uma vez sua atividade hemolítica foi inibida significativamente, levando a uma redução da toxicidade do fármaco (LESZCZYNSKA et al., 2011).

A funcionalização do Plurônico com diferentes grupos tem levado a um aumento na estabilidade das micelas obtidas, uma vez que possibilita que elas sejam diluídas na corrente, favorecendo sua remoção mais facilmente do organismo (SANTOS, 2015).

A estabilização de um sistema de entrega de droga formado por óxido de grafeno reduzido para incorporação da Doxorrubicina foi funcionalizada utilizando o F127 com terminações tióis. Os resultados apontaram a formação de ligações dissulfeto entre a matriz do Plurônico funcionalizada e o sistema de grafeno, além de aumento da eficiência de encapsulamento da Doxorrubicina (AL-NAHAIN et al., 2013).

Plurônico F127 e P123 foram funcionalizados com tocoferil succinado levando a formação de um sistema para incorporação do Paclitaxel, uma droga anticancerígena. Os resultados apontaram eficiência de encapsulamento 20% superior quando comparado aos sistemas não funcionalizados, sendo que tal sistema também mostrou maior estabilidade (TAO et al., 2013).

Estudos recentes também estão apontando a capacidade do F127 em aumentar o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica (GABATHULER, 2010; VALENZUELA OSES, 2016). Nanocarreadores micelares preparados com hidrato de morina acrescidos de F127 e/ou F123 para o controle da doença de Alzheimer foram estudados. Após a administração da formulação, observou-se que a concentração do fármaco no cérebro e no sangue era mais elevada para os nanocarreadores preparados com hidrato de morina otimizado em comparação com o hidrato de morina simples. No estudo, o tratamento crônico aumentou significativamente a memória na doença de Alzheimer induzida por cloreto de alumínio em ratos Wistar (SINGH et al., 2018).

A associação de nanopartículas de ouro (que atuam como transportador de fármacos em decorrência de suas características de superfície) com o Plurônico

F127 funcionalizado, se mostra também como um caminho promissor para o transporte biológico de drogas por permitir a construção de carreadores nanoestruturados termoresponsíveis, possibilitando a administração oral ou parenteral do medicamento, além de prolongar a permanência da droga no organismo (COELHO et al., 2010). Simon, Boca e Astilean (2012) sintetizaram nanopartículas de ouro com Plurônico F127 acima da CMC, sendo o azul de metileno incorporado no nanosistema. Os resultados encontrados apontam a dupla funcionalidade do sistema que pode ser utilizado para o transporte biológico de drogas e como sondas ópticas sensíveis.

O F127 também foi avaliado quanto à sua capacidade de favorecer a penetração de drogas nas unhas. Foi constatado que a laca hidroalcoólica elaborada com polipseexorotaxano ciclodextrina/poloxamer solúvel e lauril sulfato de sódio (SLS), permitiu que a taxa de difusão e penetração do ativo dentro da unha fosse significativamente maior do que aquelas utilizadas com as lacas de referência ao utilizar ciclopirox olamine ou clobetasol propionato que são ativos para tratamento local das unhas. Eles constataram que a presença de SLS produz uma melhoria na dispersão da solução na superfície da unha e promove a penetração da solução nos poros da unha (CUTRÍN-GOMES et al., 2018).

O potencial de geis formulados a base de F127 para aplicação no tratamento de fissuras anais crônicas (IVANOVA et al., 2018); incontinência fecal (LEE, H.; PARK, J. H.; PARK, J. H., 2017); diabetes mellitus (OH et al., 2014); nas inflamações e/ou infecções oculares (AL KHATEB et al., 2016; CUCINA et al., 2018; GONZALEZ-PIZARRO et al., 2018); lesão por queimadura (DUNG; HUONG; YOO, 2018); doença de Parkinson (RAO; AGRAWAL; SHIRSATH, 2017); como anestésico local com início rápido e ação prolongada para servir como uma alternativa à injeção de anestesia dolorosa durante a cirurgia odontológica (PANDIT; POL; KULKARNI, 2016); dentre outras condições, também vem sendo conduzidos e resultados promissores vem sendo encontrados.

Como se pode observar, cada vez mais trabalhos vêm demonstrando as vantagens do uso de micelas poliméricas de F127, como também de géis termorreversíveis como veículos de entrega de ativos no seu local de ação, pois estes podem ser usados como carreadores de genes, fármacos, vacinas, hormônios, peptídeos, dentre outros compostos. Sendo de suma importância a investigação,

bem como mais estudos da aplicabilidade deste copolímero com demais agentes com propriedades terapêuticas, como é o exemplo dos peptídeos antimicrobianos.

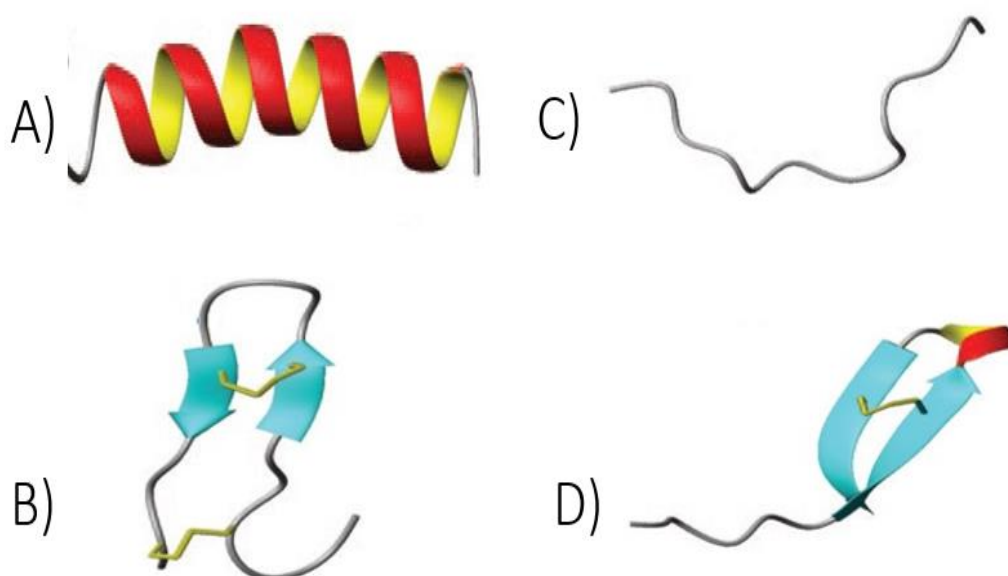
3.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:

Devido à sua grande versatilidade química, conformacional e funcional, os peptídeos estão cada vez mais em evidência no meio científico, sendo que muitas propriedades fisiológicas e farmacológicas importantes vem sendo descobertas nos últimos anos, por meio da aplicação destes (AMARAL, 2012; PUGLIESE; GELAIN, 2017).

Algumas das vantagens de se trabalhar com peptídeos são que estes podem ser menos susceptíveis à degradação; as metodologias sintéticas atuais fornecem a síntese de qualquer sequência de aminoácidos entre 5 – 50 resíduos; além do fato de que quando comparado às proteínas, estes apresentam maior simplicidade estrutural e sua síntese nas quantidades de 10 a 100 mg é relativamente fácil de ser obtida, enquanto que as proteínas são disponíveis apenas na faixa de sub-miligramas (AMARAL, 2012; PUGLIESE; GELAIN, 2017).

De acordo com sua estrutura secundária podem ser classificados em (Figura 2): alfa-hélice, folha-beta, ou a combinação de ambas, estruturas estendidas/aleatórias e estrutura em alça (ALVES; PEREIRA, 2014; JESSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; KANG et al., 2017).

Figura 2 – Classes estruturais dos peptídeos antimicrobianos. (A) Alfa-hélice; (B) Folha-beta; (C) Estrutura estendida; (D) Estrutura em alça



Fonte: Jessen, Hamill e Hancock (2006).
Adaptado pelo autor.

Devido a sua ampla atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos, vírus, leveduras e protozoários unicelulares (GUSMÃO, 2016; KANG et al., 2017; MAHLAPUU et al., 2016), os PAMs, são cotados como novos agentes com potencial farmacológico para o desenvolvimento de novos antibióticos, assim como potenciais fármacos para outras finalidades (ALVES; PEREIRA, 2014; CHAGAS, 2014; MARANI, 2015; VELTRI; KAMATH; SHEHU, 2018). As pesquisas nessa área ainda têm uma vantagem que é o fato de que PAMs estão disponíveis em quantidades relativamente altas, sendo possível obter de um único animal material que seja suficiente para se fazer a caracterização biológica e química dos compostos analisados (CHAGAS, 2014; NASCIMENTO et al., 2004).

PAMs são em sua maioria catiônicos (carga total positiva), são anfipáticos e apresentam resíduos hidrofóbicos (que lhes permite penetrar nas células e induzir a lise da membrana, sendo que um aumento na hidrofobicidade da sequência de aminoácidos dos PAMs se correlaciona com sua baixa seletividade e toxicidade para células humanas) (KANG et al., 2017; WANG; LI; WANG, 2016). Peptídeos catiônicos ligam-se com os componentes carregados negativamente na parede celular da bactéria por meio de interações eletrostáticas. No caso de bactérias gram-positivas, o componente é o ácido lipoteicóico, enquanto que nas gram-negativas são os lipopolissacarídeos, e essa ligação causa uma desestabilização na parede

bacteriana, podendo levar a lise da mesma (MAHLAPUU et al., 2016; SALAY et al., 2004, 2011, 2012). Tal fato não acontece com as membranas celulares dos mamíferos, visto que a composição da porção externa de sua membrana é composta de lipídeos com carga neutra, impossibilitando a ligação por interação eletrostática, o que confere uma habilidade seletiva para os PAMs (MAHLAPUU et al., 2016; KANG et al., 2017).

Modelos de mecanismo de ação para os PAMs já foram descritos na literatura, sendo que os mais aceitos são: Formação de Barril (*barrel stave*), Formação de Tapete (*carpet*) e Poro Toroidal. Vale ressaltar ainda, que características como estrutura conformacional, sequência, carga total positiva, hidrofobicidade, anfipaticidade são inter-relacionadas e irão influenciar no modo de ação dos PAMs (KANG et al., 2017). Além dos efeitos envolvendo a desestabilização das membranas biológicas, os PAMs podem se ligar a receptores da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Pela possibilidade de se translocarem através da membrana, podem agir intracelularmente, dificultando a síntese de metabólitos importantes para a sobrevivência do microrganismo (PERINI, 2013). Esses variados mecanismos de ação, inclusive diferentes dos antibióticos convencionais, acabam dificultando o desenvolvimento de resistência microbiana (AOKI; UEDA, 2013; KANG et al., 2017; ROSCIA et al., 2013).

A pele dos anfíbios tem sido fonte de uma vasta variedade de substâncias com propriedades biológica, todavia menos de 1/3 dos gêneros conhecidos foram avaliados (DALY et al., 2004). O interesse científico na atividade antimicrobiana apresentada por peptídeos provenientes da secreção de anfíbios surgiu após a purificação do peptídeo bombinin, originado da rã *Bombina variegata*, e teve um grande impulso com a caracterização do peptídeo magainis, de *Xenopus laevis* (NASCIMENTO et al., 2003). O primeiro medicamento com atividade antimicrobiana Locilex (creme de Pexinagam 0,8 %), foi aprovado pela FDA, e está na fase 3 dos ensaios clínicos. Tal medicamento é um peptídeo de 22 aminoácidos que foi isolado da pele de um anfíbio e terá como finalidade o tratamento antimicrobiano tópico de infecções de úlceras de pé diabético (KANG et al., 2017).

Atualmente, estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de descrever o isolamento e a caracterização de PAMs isolados de anuros do gênero *Leptodactylus* e um conjunto de resultados interessantes com potenciais aplicações terapêuticas vêm sendo reportados. O primeiro relato de isolamento e caracterização ocorreu em

2004 a partir do *Leptodactylus ocellatus*, quando foi proposto que todos os peptídeos obtidos a partir deste gênero *Leptodactylus* devem receber a denominação de "ocellatinas" (CHAGAS, 2014; GUSMÃO, 2016).

Os PAMs provenientes da secreção cutânea de anuros são caracterizados por apresentar de 10 a 48 resíduos de aminoácidos, contendo vários resíduos carregados positivamente, o que os tornam catiônicos. Além disso, aproximadamente, 50% dos resíduos presentes são representados por aminoácidos hidrofóbicos (CHAGAS, 2014; MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006). A conformação mais comumente encontrada é a α -hélice anfipática, onde as cadeias laterais dos aminoácidos polares são dispostas em um mesmo lado, ao passo que, as cadeias apolares ficam no lado oposto, o que permite que estes peptídeos possam interagir com membranas biológicas. Outra característica frequente é a ocorrência de amidação C-terminal, que leva ao favorecimento de uma maior carga positiva para a molécula, bem como maior estabilização das regiões helicoidais (CHAGAS, 2014; NASCIMENTO, 2007).

3.2.1 Peptídeo Antimicrobiano: *Ocellatina* PT1

Um dos peptídeos provenientes do *Leptodactyluspustulatus* que teve sua purificação, identificação e caracterização realizada recentemente foi a *ocellatina* PT1 (MARANI et al., 2015). O ensaio microbiológico foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e atividade hemolítica da *ocellatina* frente algumas cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados mostraram que o PAM *Ocellatina* PT1, conseguiu inibir o crescimento de cepas de bactérias gram-negativas em concentração superior a $\mu\text{g/mL}$ e também apresentou baixa atividade hemolítica (MARANI et al., 2015).

Ainda na caracterização do PAM *Ocellatina* PT1, foi observado que a sequência de seus aminoácidos mostra uma estrutura tripartite, compatível com o que já havia sido descrito na literatura para PAMs. A *ocellatina* identificada é um peptídeo longo, com 25 resíduos de aminoácidos na sua sequência primária: GVFDIIKDAGCQLVAHAMGKIAEKV, apresenta sequências hidrofóbicas, como também um C-terminal amidado e sua massa molecular é 2639,1 Da, e, em pH fisiológico este peptídeo têm uma tendência a ser protonado, uma vez que, o pI

encontrado na caracterização bioquímica foi 8.44, o que sugere carga residual superficial catiônica (Tabela 1) (MARANI et al., 2015).

Tabela 1 – Sequência, massa molar, ponto isoelétrico e momento hidrofóbico do Peptídeo *Ocellatina* PT1, isolado da secreção de *Leptodactylus pustulatus*

Nome	Sequência	Massa Molar (MM)	Ponto isoelétrico (pI)	Momento Hidrofóbico (μ H)
<i>Ocellatina</i> PT1	GVFDIIKDAGCQLVAHAMGKIAEKV	2639,1	8,44	0,267

Fonte: Marani et al., 2015.

Adaptado pelo autor.

Comparando os peptídeos do gênero *Leptodactylus* já descritos na literatura, com as oito novas *ocellatinas* (*Ocellatina* PT1 a *Ocellatina* PT8) descobertas por Marani et al. (2015), com exceção da *Ocellatina* PT3, nota-se que em todos os demais peptídeos, há a presença do aminoácido aromático fenilalanina, na posição 3 da cadeia peptídica, ao invés dos aminoácidos leucina ou valina, como pode ser observado na Tabela 2. No entanto, os autores citam que essa mudança é conservadora, uma vez que ambos os aminoácidos são apolares (hidrofóbicos) (MARANI et al., 2015).

As predições do modelo estrutural tridimensional dos novos peptídeos mostram que a presença de uma fenilalanina, na posição 3, favorece a formação de α -hélice na região N-terminal, assim como a glicina, na posição 8 (*ocellatinas* PT4, PT6, PT7 e PT8). A presença de isoleucina, na posição 3 (*ocellatina* PT3) ou ácido aspártico, na posição 8 (*ocellatinas* PT1 e PT2), provocou a redução do conteúdo da α -hélice. Este fato pode estar relacionado à atividade antimicrobiana contra *E. coli*, pois peptídeos com fenilalanina, na posição 3 e glicina na posição 8, apresentam MICs ligeiramente inferiores contra esta estirpe. A MIC encontrada para as *ocellatinas* PT1, PT3 e PT5 foi de 800 μ g/ml, a PT6 (400 μ g/ml), as *ocellatinas* PT4, PT7 e PT8 (200 μ g/ml) e a *ocellatina* PT2 (MIC encontrada foi acima de 800 μ g/ml), sendo a que apresentou os piores resultados de inibição contra *E. coli* (MARANI et al., 2015).

Tabela 2 – Sequência dos aminoácidos das *Ocellatinas* PT1 à PT8 isolados da secreção de *Leptodactylus pustulatus*

Nome	Sequência
<i>Ocellatina</i> PT1	G V F D I I K D A G K Q L V A H A M G K I A E K V ° - - - - -
<i>Ocellatina</i> PT2	G V F D I I K D A G K Q L V A H A T G K I A E K V ° - - - - -
<i>Ocellatina</i> PT3	G V I D I I K G A G K D L I A H A I G K L A E K V ° - - - - -
<i>Ocellatina</i> PT4	G V F D I I K G A G K Q L I A H A M G K I A E K V ° - - - - -
<i>Ocellatina</i> PT5	G V F D I I K D A G R Q L V A H A M G K I A E K V ° - - - - -
<i>Ocellatina</i> PT6	G V F D I I K G A G K Q L I A H A M E K I A E K V G L N K D G N
<i>Ocellatina</i> PT7	G V F D I I K G A G K Q L I A H A M G K I A E K V G L N K D G N
<i>Ocellatina</i> PT8	G V F D I I K G A G K Q L I A R A M G K I A E K V G L N K D G N

Fonte: Maraniet al., 2015.
Adaptado pelo autor.

A maior parte dos PAMs caracterizados até o momento apresentam uma carga líquida positiva, variando de aproximadamente +2 a +9, podendo conter um domínio catiônico altamente definido. Esta cationicidade é de grande importância para a atração eletrostática do PAM pela membrana fosfolipídica carregada negativamente de alguns microrganismos e podem influenciar no seu potencial de ação (PERINI, 2013). A presença dos aminoácidos ácido aspártico, na posição 8 (em *ocellatinas* PT1, PT2 e PT5), ácido aspártico, na posição 12 (*ocellatina*-PT3) e ácido glutâmico, na posição 19 (*ocellatina*-PT6) influenciam o valor do pI, o que pode estar relacionado à atividade contra outras cepas (MARANI et al., 2015). Já as *ocellatinas* PT4, PT7 e PT8 apresentaram valores de pI maiores do que as demais *ocellatinas* (9,53, 9,40 e 9,82 respectivamente). Esse fato pode explicar os valores de MICs mais baixos contra *E. coli*, como também as atividades contra *S. choleraesuis e/ou K. pneumoniae* e *S. aureus* encontradas. O único peptídeo que não apresentou atividade contra *E. coli*, foi a *ocellatina* PT2, e que muito provavelmente é pela presença do aminoácido treonina na posição 18 no lugar da metionina na mesma posição (Tabela 2) (MARANI et al., 2015).

É sabido que o potencial antimicrobiano dos PAMs depende de diversos fatores, como as características relacionadas as membranas celulares das células microbianas. Depende também da seletividade, carga superficial, hidrofobicidade, presença de aminoácidos em regiões estratégicas, bem como das características físico-químicas dos sistemas envolvidos (PERINI, 2013).

3.3 TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS DO F127

Em decorrência de sua natureza coloidal, dificuldades técnicas são comumente encontradas na caracterização físico-química dos nanomateriais, como é o caso das micelas poliméricas. Até o momento, não há diretrizes do FDA que tenham sido desenvolvidas especificamente para formulações baseadas em nanomateriais com finalidade terapêutica ou para diagnóstico e nem protocolos e/ou procedimentos padronizados para a caracterização desses materiais em nanoescala. As técnicas comumente utilizadas têm a finalidade de estudar o tamanho, a forma, composição, pureza, propriedades da superfície e estabilidade dos nanomateriais (LIN et al., 2014). O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode levar à sugestão de modelos que possam descrever em nível molecular como os nanomateriais são organizados.

Buscando compreender a interação do peptídeo *Ocellatina* PT1 com as micelas do F127, foram empregadas as técnicas Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espalhamento Dinâmico de luz (DLS) e o Espalhamento Dinâmico Eletroforético de Luz (DELS) ou Potencial Zeta.

3.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica termodinâmica poderosa, para medir as propriedades térmicas dos materiais, com o intuito de estabelecer uma conexão entre a temperatura e as propriedades físicas específicas das substâncias de interesse, determinando a entalpia associada a tal processo. Em outras palavras, o dispositivo é um instrumento de análise térmica que determina a temperatura e o fluxo de calor que estão associados às transições do material em análise, em função do tempo e da temperatura. Durante uma mudança de temperatura, o DSC mede uma quantidade de calor, que é absorvida ou irradiada excessivamente pela amostra com base em uma diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010).

Os ensaios de DSC consistem em resfriar e/ou aquecer volumes iguais da amostra e do material de referência à mesma taxa, de uma temperatura inicial até

uma temperatura final, mantendo a amostra e a referência na mesma temperatura, à pressão constante, com o intuito de monitorar as alterações físicas que determinam mudanças nas propriedades físico-químicas do sistema estudado, como capacidade térmica, entropia e entalpia que acompanham mudanças na conformação ou ligação da substância em análise (FEITOSA et al., 2009; RUSSEL; HANSEN, 2006). Logo, cada pico ou alteração apresentado no termograma (curva de variação na capacidade calorífica versus temperatura) está ligado a uma transição de fase ou estrutural que ocorre em torno de uma determinada faixa de temperatura “crítica”, cujo valor médio corresponde à temperatura máxima do pico, sendo atribuída a temperatura micelar crítica (FEITOSA et al., 2009; GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010). E a área do pico fornece informações sobre a energia ou entalpia (ΔH_m) envolvida nessa transição (LEMOS, 2015).

Considerando a capacidade de medir mudanças de entalpia e transições de fase, o DSC vem sendo muito utilizado para o desenvolvimento de medicamentos pela indústria farmacêutica. Tem aplicação para o estudo de uma ampla variedade de macromoléculas biológicas, sendo importante na investigação de proteínas e lipídeos, como também na análise de ligantes em proteínas, além de possibilitar o estudo de mudanças estruturais e conformacionais em sistemas coloidais e de proteínas (CHIU; PRENNER, 2011).

3.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Técnicas de espalhamento de radiação permitem explorar características físico-químicas de nanomateriais, como forma, estrutura, tamanho hidrodinâmico, estado de agregação e biomolecular (INAGAKI et al., 2013; LIN et al., 2014; SAPSFORD et al., 2011). O DLS, é uma das mais populares modalidades de espalhamento de luz, sendo amplamente utilizado para determinar o raio (ou o diâmetro D_H) hidrodinâmico de materiais formados por tipos diferentes de partículas que se encontram dispersas em meio líquido. A técnica investiga os movimentos térmicos das partículas em suspensão sobre os quais um laser é incidido (LEMOS, 2015). Assim, a intensidade da luz espalhada detectada, em um ângulo fixo, pode fornecer informações de tamanho, distribuição de tamanho, como também da polidispersividade dos materiais analisados (LIN et al., 2014). Características

importantes dos materiais como: velocidade de dissolução, estabilidade de dispersões coloidais, reatividade, eficácia de entrega de fármacos, dentre outras, podem ser influenciadas pelo tamanho das partículas (RAMOS, 2015).

Os principais pontos fortes dessa técnica incluem o fato de não ser invasiva, curta duração do experimento (em minutos), capacidade de medir amostras diluídas e numa ampla faixa de concentrações, precisão na determinação do tamanho hidrodinâmico, associado com um menor custo e uma medida mais reproduzível do que outros métodos (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; LIN et al., 2014).

No entanto, o DLS pode apresentar algumas desvantagens como dificuldade em correlacionar frações de tamanho com uma composição particular quando determinadas quantidades de agregados estão presentes, partículas de poeira também podem interferir na intensidade de espalhamento, além de possuir uma faixa relativamente pequena de partículas ou tamanho da molécula (1 nm – 3 μ m), embora essa limitação da escala não seja realmente problema para a caracterização de nanomateriais (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; LIN et al., 2014). Além disso, o DLS não é adequado para a medição precisa do tamanho de nanomateriais não-esféricos, uma vez que a natureza esférica de partículas já é assumida na análise das amostras (LIN et al., 2014; USKOKOVIC, 2012).

3.3.3 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta representa a carga de superfície das micelas/partículas, ao mesmo tempo em que é uma medida da magnitude da atração ou da repulsão eletrostática das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que podem afetar a estabilidade de determinados sistemas coloidais. Sua medição pode oferecer uma visão sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação, podendo ser utilizado para melhorar a formulação de dispersões, suspensões, emulsões, dentre outros (DE BATTISTI RIBEIRO, 2014).

A determinação do potencial ζ é feita através dos efeitos eletrocinéticos provocados pela interação entre a carga superficial das partículas e um campo elétrico aplicado ao meio, onde partículas com carga tendem a se mover em direção ao eletrodo que apresenta carga oposta. No entanto, as forças viscosas presentes no meio são contrárias a esse movimento. Quando o equilíbrio entre essas forças é

atingido, a velocidade das partículas torna-se constante (EHLERS; HEINÄMÄKI; YLIRUUSI, 2012; RIBEIRO, 2016). Considera-se que nanopartículas são mais estáveis quando seu potencial zeta é menor que - 30 mV e maior que + 30 mV, pois suspensões com partículas carregadas tendem a não se agregarem (FACHINETTI, 2013; HOW; ABDULLAH; ABBASALIPOURKABIR, 2011), uma vez que, em um sistema nanoestruturado que apresente uma carga de superfície elevada, as forças repulsivas tendem a evitar agregação em decorrência das colisões ocasionais que podem ocorrer entre as nanopartículas adjacentes (FACHINETTI, 2013; REUS, 2006).

Entre os métodos de avaliação do potencial zeta, a técnica de espalhamento de luz eletroforético (ELS), é a mais comumente utilizada e possibilita a medição simultânea das velocidades de muitas partículas, embora tenha sua precisão e reprodutibilidade da medição reduzida, pois sofre com a eletro-osmótica. Apesar da medição do potencial zeta de partículas suspensas após a diluição reduzir a dificuldade de penetração da luz na solução de amostra, é válido notar que o potencial zeta é uma propriedade sensível a alterações ambientais, incluindo pH e força iônica. Contudo, uma medição de potencial zeta precisa e reprodutível em uma solução diluída pode não refletir o verdadeiro valor de uma suspensão concentrada (LIN et al., 2014).

Sendo a *Ocellatina* PT1, um dos peptídeos recentemente descritos, não há, portanto, nenhum estudo analisando as interações moleculares deste peptídeo com nanoagregados poliméricos (MARANI et al., 2015). Assim, este é um tema praticamente inexplorado, que pode levar a melhor compreensão da aplicabilidade desse PAM, sendo a caracterização por meio das técnicas de análise físico-químicas um aliado nesse processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho foi dividida em duas etapas. A primeira foi dedicada à obtenção de informações a nível molecular e físico-químico do peptídeo *Ocellatina* PT1 e após ele ser incorporado nas micelas do Plurônico F127. As técnicas empregadas foram: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), que determina a temperatura de transição que correspondem a temperatura micelar crítica (CMT) e a entalpia de micelização do plurônico F127, na presença e ausência do peptídeo; O espalhamento dinâmico de luz (DLS), fornece informações do tamanho do agregado polimérico sozinho e na presença do peptídeo; A técnica de potencial zeta (ζ), que fornece informações sobre a estabilidade da micela do F127 e suas possíveis alterações com a interação do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina*. Já na segunda parte foi realizado um ensaio biológico, para avaliar se o sistema F127-*Ocellatina* PT1, apresenta uma melhor atividade antimicrobiana quando comparado com o peptídeo sozinho.

4.1 MATERIAL

Os materiais utilizados nos experimentos foram: peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 (OCEL PT1) com sequência de 25 resíduos de aminoácidos (GVFDIIKDAGCQLVAHAMGKIAEKV), que possui massa molecular 2639.1 g mol, o qual foi sintetizado na Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (UNB) e cedido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. José Roberto de Souza Almeida; Copolímero tribloco Plurônico F127 (SIGMA-ALDRICH); Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES) (SIGMA-ALDRICH); meio de cultivo BHI, cepa de *Escherichia coli* obtida de coleção de cultura da FioCruz, RJ (ATCC10536). A água utilizada para o preparo das soluções foi a ultrapura com resistividade de 18,22 M Ω cm⁻¹ a 25 °C.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Solução de Plurônico F127

As soluções de micelas poliméricas não iônicas do Plurônico F127 foram preparadas de acordo com o experimento realizado, em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM), representando concentrações abaixo e acima da concentração micela crítica (CMC). Não foi necessário determinar a (CMC), pois já sabemos que se encontra na faixa de 0,45 mM, com base em estudos prévios realizados por Souza (2018). Para os experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ζ), as amostras foram pesadas para diferentes concentrações e dissolvidas em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, e agitadas até a solubilização, com auxílio de agitador vortex.

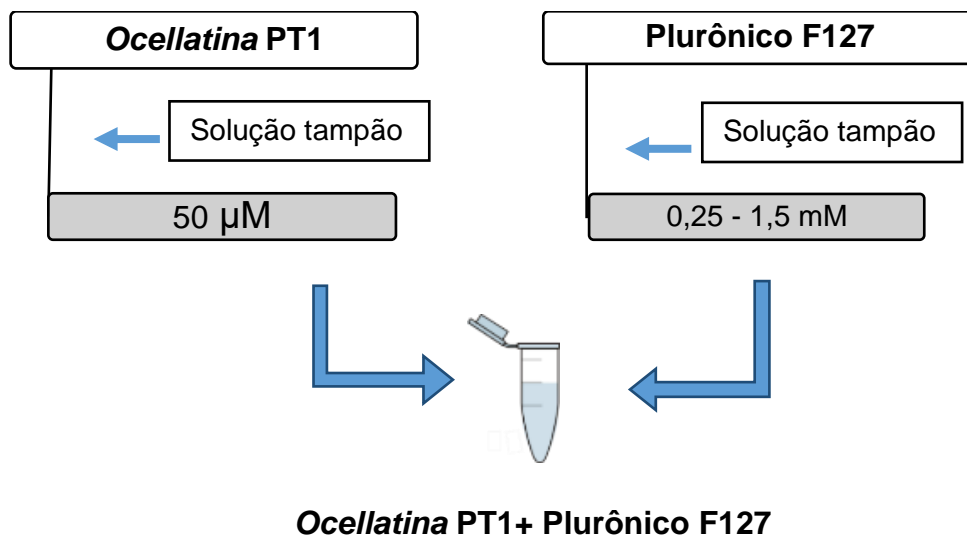
4.2.2 Solução de *Ocellatina* PT1

As soluções do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 foram preparadas no dia de cada experimento. A amostra foi pesada para valores iguais ou ligeiramente maiores da concentração necessária (50 μ M), e posteriormente diluída a 50 μ M em solução tampão. A solução tampão utilizada foi o tampão HEPES 10 mM, pH 7,4. A concentração de 50 μ M foi escolhida por está na faixa de concentração para estudos físico-químicos.

4.2.3 Mistura de *Ocellatina* PT1 e Plurônico F127

As soluções de plurônico F127 nas diferentes concentrações (0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM) foram adicionadas em uma massa do peptídeo antimicrobiano *ocellatina* PT1, de modo que a concentração final do peptídeo fosse 50 μ M, conforme observado na Figura 3. Todas as misturas foram solubilizadas com o auxílio do agitador vortex, e logo em seguida, utilizadas em cada experimento. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, 25°C e em solução tamponada em pH 7,4.

Figura 3 – Esquema do método de preparação da mistura do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 e Plurônico F127



Fonte: Santos, N. F. (2018).
Adaptado pelo autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICELAS POLIMÉRICAS DE PLURÔNICO F127 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DA *OCELLATINA* PT1 (OCEL PT1)

4.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do plurônico F127 na presença e ausência da *Ocellatina* PT1 (OCEL PT1)

Os ensaios foram realizados utilizando um microcalorímetro diferencial de varredura, modelo VP-DSC (Microcal, Inc., Northampton, EUA) de alta sensibilidade, do laboratório de Sistemas Coloidais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP, Campus de São José do Rio Preto". O instrumento é equipado com duas celas idênticas de 0,54 mL, uma para a amostra e a outra para referência. Quatro varreduras para cada amostra foram realizadas, alternando entre aquecimento e resfriamento, com uma velocidade de varredura de 1°C por minuto, no intervalo de 1°C a 60°C, a taxa de varredura de 60°C/h, e um tempo de pré-varredura de 15 minutos para a estabilização das soluções na cela. A

referência da linha de base foi obtida com as duas celas preenchidas com tampão HEPES 10 mM, pH 7,4. Para a análise dos resultados foi utilizado os termogramas da terceira e da quarta varredura, que eram idênticos aos da primeira e segunda varredura, porém como maior tempo de equilíbrio das amostras analisadas. O programa MicroCal Origin, v.5.0 foi utilizado para o tratamento dos dados.

A técnica de DSC foi realizada para determinar a temperatura de transição que corresponde a temperatura micelar crítica (CMT) e a entalpia de micelização do plurônico F127 em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM), na ausência e presença do AMP *Ocellatina* PT1 50 μ M.

4.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medições do D_H foram realizadas utilizando um equipamento fabricado pela (Brookhaven Instruments Corp, Hosltsville, EUA), do laboratório de Sistema Coloidais, do Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, em São Paulo. O aparelho é equipado com um laser de He-Ne, com comprimento de onda (λ) 633 nm, e um goniômetro motor-drive BI-200SM e potência ajustável de até 15 mW, com um ângulo de espalhamento ajustável e temperatura também ajustável, através de um banho termostaticável. As amostras são inseridas no tubo de ensaio e então colocadas em uma cuba de vidro que se encontra preenchida com decalina (deca-hidro naftaleno), líquido cujo índice de refração é próximo ao do vidro, com o intuito de diminuir reflexões na parede do tubo. Acoplados a essa cuba está um banho térmico para o controle da temperatura da amostra. O equipamento dispõe ainda de softwares para a aquisição e análise de dados, como também para o controle de alinhamento do sistema óptico.

A técnica de DLS foi utilizada para determinar o D_H micelar da solução de plurônico F127 em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM), na ausência e na presença do PAM *Ocellatina* PT1 (50 μ M), nas temperaturas de 25°C e 30°C, em solução tampão HEPES 10 mM, pH 7,4. Com relação à variação da temperatura, o intuito foi observar se tal variação pode

influenciar no diâmetro micelar. Todas as medidas de DLS foram realizadas em triplicata e agitadas durante 30 segundos, com o auxílio do vortex.

4.3.3 Potencial Zeta (ζ)

O (ζ) das amostras foi determinado utilizando o Espalhamento Dinâmico Eletroforético de Luz (DELS), equipamento modelo Zeta Pals (Brookhaven Instruments Corp, Hosltsville, EUA), também do laboratório de Sistema Coloidais, do Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, em São Paulo, que é equipado com um laser de diodo de alta potência de 35 mW. As amostras foram colocadas em uma cubeta de poliestireno e após, foram submetidas à leitura no equipamento em milivolts (mV), sendo que uma média de 5 leituras foi realizada, a uma temperatura de 25°C, em solução tampão HEPES 10 mM, em pH 7,4. A amostra é irradiada pelo laser e um campo elétrico é incidido, atribuindo as partículas movimento de translação associado ao movimento browniano, que irá fornecer um valor medido, dando importantes informações a respeito da estabilidade da partícula.

A medida do potencial zeta foi utilizada para investigar a interação do PAM *Ocellatina* PT1 com as micelas poliméricas do F127, como também para avaliar a estabilidade de tais micelas. Para avaliar o potencial, inicialmente se analisou as amostras de Plurônico F127 puro, em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM) e em seguida, a mistura do Plurônico F127 (nas diferentes concentrações já citadas), com uma concentração fixa de 50 μ M do PAM *Ocellatina* PT1, em solução tampão HEPES 10 mM, em pH 7,4.

4.4 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Preparo das soluções de *Ocellatina* PT1 e *Ocellatina* PT1 + Plurônico F127

Inicialmente foi preparada uma solução estoque do peptídeo de 1 mL, e posteriormente foi feita a diluição para as quatro concentrações (400, 600, 800 e 1000 μ g/ml) de *ocellatina* testadas. As soluções com o F127 foram preparadas

pesando o F127 em cada tubo de centrifuga de 1,5 mL, na respectiva concentração desejada (0,0176 mg) e posteriormente feita a diluição com o tampão HEPES. Logo após, as soluções foram agitadas até a solubilização, com auxílio de agitador vortex.

4.4.2 Ensaio de inibição

Neste ensaio foram utilizadas placas de petri previamente autoclavadas, que receberam cada uma 18 mL de meio agar BHI. Após a solidificação (30 minutos), a placa foi inoculada com auxílio de um swab estéril, cobrindo-se toda a superfície do agar. Em seguida foram perfurados 4 poços, em cada placa, utilizando uma ponteira estéril de pipeta de 20 µL, distribuídos em pontos afastados onde foram depositados, em cada um, 10 µL da solução na concentração a ser testada. Foi comparada a inibição do PAM *ocellatina* frente ao agregado OCEL PT1 + F127.

Como controles de atividade antimicrobiana foram utilizados discos do antibiótico ciprofloxacino. Também foi realizado o controle da atividade antimicrobiana do plurônico puro em poço. Os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata e os controles em duplicata. As placas foram incubadas e observadas após 15 e 24 horas. Os resultados foram documentados e os halos de inibição foram medidos utilizando régua milimétrica.

Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana da *Ocellatina* PT1 foram realizados na presença e ausência do plurônico F127 utilizando a técnica clássica de plaqueamento e difusão em agar por poços, adaptada da norma técnica do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Foi investigada a inibição de uma cepa de *Escherichiacoli* obtida de coleção de cultura da FioCruz, RJ (ATCC10536). Os ensaios foram realizados em colaboração com o laboratório de Microbiologia, do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da UESC.

Em todos os procedimentos foi utilizado meio Brain Heart Infusion (BHI) da marca Kasvi, (Liofilchem, Itália) em caldo e em agar. As soluções de cultivo foram previamente preparadas, e assim como todo o material utilizado, foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Os ensaios foram montados em câmara de fluxo laminar previamente limpa e esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta, e a incubação foi realizada em estufa microbiológica por 24 h, a 35 °C.

Previamente aos ensaios, foi realizada a ativação e a confirmação da pureza do cultivo original através da técnica de plaqueamento. Para tanto, o material foi transferido para tubos contendo caldo BHI que foram incubados nas condições pré-determinadas. Depois de 24 horas, uma alíquota foi transferida com auxílio de alça de platina para placa de Petri, contendo agar BHI, mediante a técnica de estriamento por esgotamento. Após incubação de 24 horas foram observadas a morfologia das colônias e logo procedeu-se à observação da morfologia das células, em microscopia óptica sob imersão, utilizando coloração de Gram. Neste caso obteve-se material de uma única colônia para confecção de esfregaço.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) DO PLURÔNICO F127 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *OCELLATINA* PT1

O estudo por DSC foi realizado para determinar a CMT e a entalpia de micelização do plurônico F127 em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM), tanto na ausência como na presença do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, à uma concentração fixa de 50 μ M, como também para avaliar a possível interação de tal peptídeo com o plurônico F127.

Copolímeros em tribloco, como o F127, apresentam comportamento bem definido quando em solução aquosa, que é resultado de interações intermoleculares bem como de suas características estruturais. Uma das características apresentadas por eles é a capacidade de se auto organizar em micelas espontaneamente quando estão acima da CMC e/ou da CMT, abaixo destas, tendem a se apresentar na forma de unímeros (NEACSU et al., 2016; PATIÑO AGUDELO, 2015).

O processo de micelização ocorre numa determinada concentração conhecida como concentração micelar crítica (CMC), desde que alguns parâmetros, como temperatura e pressão estejam constantes (PATIÑO AGUDELO, 2015). Neste trabalho, foi adotada a CMC do F127 utilizado em 0,45 mM, com base em estudos prévios realizados por Souza (2018). Vale ressaltar que a CMC do F127 possui valores diferentes na literatura, e que isto pode ocorrer tanto pelo método para determinação da CMC utilizado, como também pelo grau de pureza apresentada pelo produto (SEZGIN; YUKSEL; BAYKARA, 2006), como o produto utilizado neste trabalho apresentava as mesmas características do utilizado por Souza (2018), adotamos a CMC no valor já citado anteriormente.

A CMC de determinada substância pode ser afetada quando há variação na temperatura, sendo que pode ocorrer uma redução nesses valores à medida que há um aumento na temperatura do sistema. Isso se deve, provavelmente, ao fato das interações copolímero-água serem menos favoráveis em temperaturas maiores, contribuindo para o processo de micelização. A micelização de copolímeros triblocos também sofre influência e é dependente da estrutura deles. Batrakova et al. (1999)

estudou uma lista de 21 copolímeros (dentre eles o F127), e observou que uma redução da CMC era notada, à medida em que ocorria um aumento na massa molar total como também na massa molar do bloco hidrofóbico (PPO), o autor ainda cita que o processo de micelização é influenciado pelo tamanho do segmento PPO.

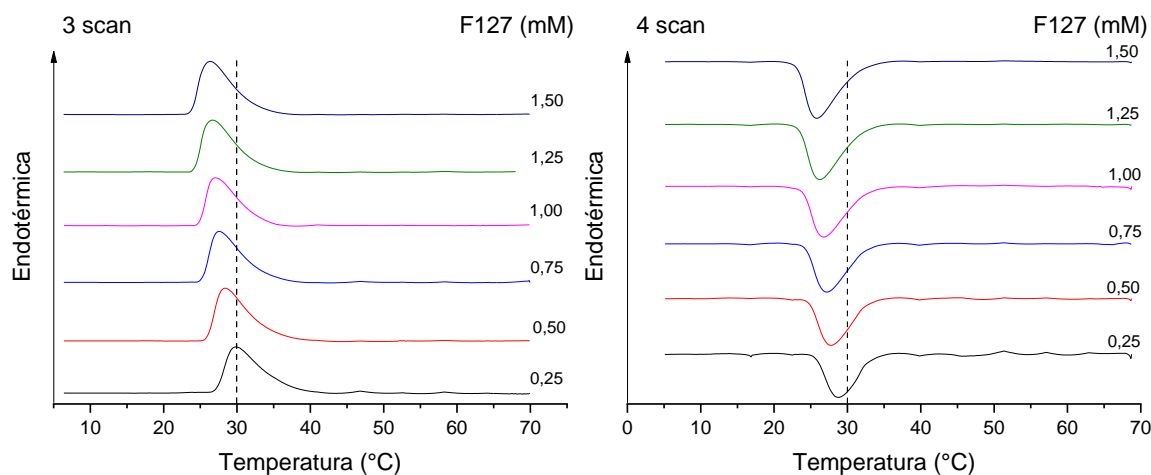
O processo de micelização como já citado, não só ocorre quando variações na concentração da molécula anfifílica acontecem, mas também quando há variações na temperatura, sendo esta denominada temperatura crítica de micelização (CMT) (DUTRA, 2012; PATIÑO AGUDELO, 2015). Alguns trabalhos vêm demonstrando que os valores da CMT para o F127 diminuem, quando há um aumento na concentração de tal copolímero (DUTRA, 2012; FEITOSA; WINNIK, 2010; LEMOS; 2015; PATIÑO AGUDELO, 2015).

É de suma importância a caracterização destes parâmetros (CMC, CMT, entalpia de micelização), visto que é durante esse processo de micelização que a solubilização dos fármacos nas micelas poliméricas acontece (KABANOV; ZHU; ALAKHOV, 2005), e que a depender de suas características estas substâncias podem ser solubilizadas em locais diferentes. No caso das micelas do F127, seu núcleo hidrofóbico é composto de PPO, o que permite que substâncias que sejam apolares possam ser solubilizadas nele. Caso apresentem características polares, as substâncias podem ser solubilizadas na coroa hidrofílica de tal micela, que é composta de PEO. Caso o composto apresente uma taxa hidrofóbica/hidrofílica intermediária, a solubilização pode ocorrer na interface núcleo-coroa (TORCHILIN, 2001).

Para a análise dos resultados foi utilizado os termogramas da terceira e da quarta varredura, que eram idênticos aos da primeira e da segunda varredura, porém como um maior tempo de equilíbrio das amostras analisadas. As curvas dos termogramas de DSC do plurônico F127 apresentaram tanto no aquecimento (endotérmicas - scan 3), quanto no resfriamento (exotérmicas - scan 4), um único evento de transição nas diferentes concentrações de F127 testadas (0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM), como pode ser observado na Figura 4. Sendo que este evento de transição, que é representado por um único pico, tanto na varredura de aquecimento quanto na varredura de resfriamento, está torno de uma mesma CMT, demonstrando um perfil idêntico (imagens em espelho), nos quais os picos apresentam simetria, sendo um indicativo que o processo demonstrado é termo reversível.

O evento endotérmico do aquecimento demonstra o processo de micelização do plurônico F127. Acima da CMT os unímeros de F127 tendem a se agregar e formar as micelas. Caso ocorra uma redução na temperatura e ela fique em um valor menor que a CMT, as micelas que haviam sido formadas tenderão a se desagregar e voltar a forma de unímeros, ocorrendo assim o processo da desmicelização. Segundo Feitosa, Winnik (2010), um indicativo de que o processo micelização/desmicelização é reversível é a ausência de histerese térmica.

Figura 4 – Termogramas de DSC do plurônico F127 em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h

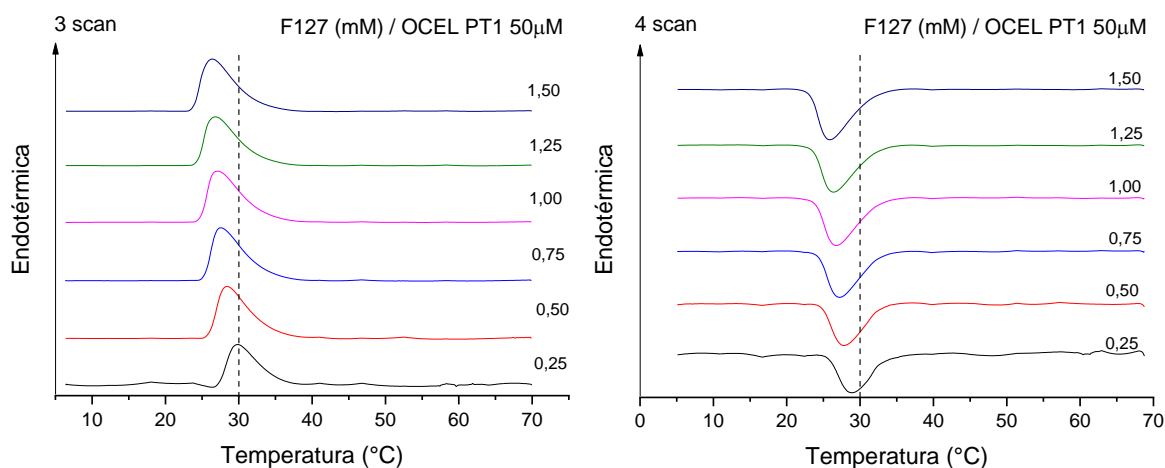


Resultados semelhantes observados nos trabalhos de Feitosa, Winnik (2010) e no de Liu, Li (2015) quanto a termorreversibilidade do processo de micelização e também sobre a interferência do aumento da concentração do plurônico F127 na CMT também foram encontrados nesse estudo. Na Figura 4, pode-se observar que com o aumento da concentração de F127, um pequeno deslocamento do centro do pico para a esquerda é notado, indicando uma redução na CMT dele, o que pode ser justificado pelo fato de que com o aumento da concentração de F127, fica mais fácil para que ocorra o colapso das gaiolas de moléculas de água que circundavam os unímeros, levando ao rompimento delas e favorecendo a formação das micelas.

Quanto aos termogramas das curvas de DSC da interação do peptídeo *Ocellatina* PT1, à 50 μ M com o plurônico F127 em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM) (Figura 5), observa-se também, que somente um evento de transição pôde ser notado em todas as concentrações

testadas, tanto no evento de aquecimento (scan 3) quanto no resfriamento (scan 4). O evento endotérmico representa o processo de micelização do F127 na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1. Nota-se que tal evento também foi reversível, uma vez que não foi notada histerese térmica. Acredita-se que este único pico de transição apresentado no termograma, represente a interação do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 (50 μ M) com as micelas do plurônico F127 nas diferentes concentrações testadas, pois quando o peptídeo *Ocellatina* PT1 foi submetido ao experimento de calorimetria diferencial de varredura (dados não mostrados), ele não apresentou nenhum pico de transição que indicasse sua desnaturação.

Figura 5 – Termogramas de DSC da interação do plurônico F127 em diferentes concentrações em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4, com o peptídeo *Ocellatina* PT1, à 0 μ M, obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h

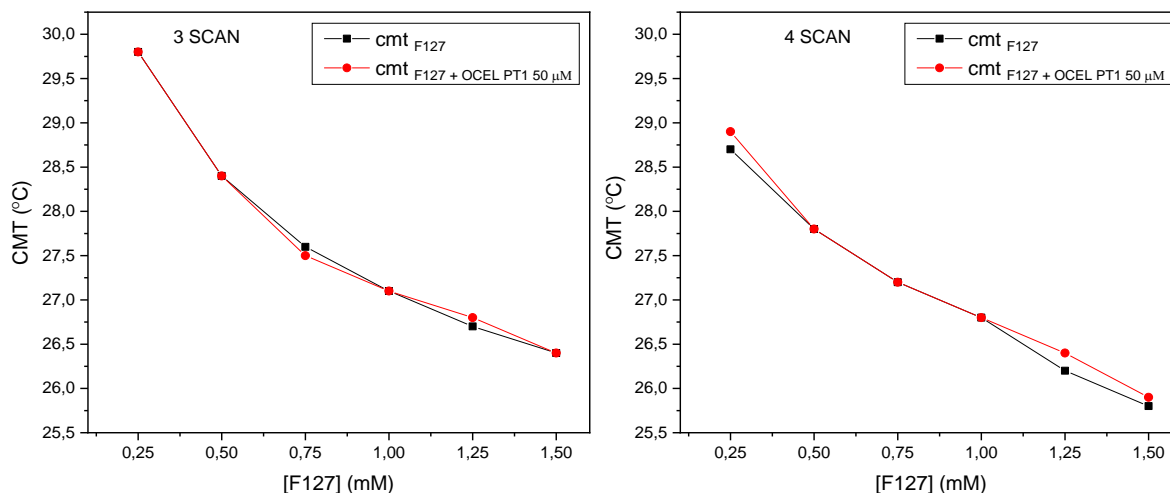


Os fatos mencionados acima podem ser mais bem visualizados na Figura 6, em que se nota um declínio da CMT à medida que a concentração do plurônico F127 aumenta. Essa tendência (comportamento) está presente para o F127 sozinho como para quando a *ocellatina* foi adicionada, e pode ser visto tanto no scan 3 como no 4. O valor da CMT encontrado na menor concentração (0,25 mM) de F127 foi de 29,8°C (scan 3) e 28,7°C (scan 4), ao passo que na maior concentração de F127 (1,5 mM), a CMT foi de 26,4°C (scan 3) e 25,8°C (scan 4). Para o F127 com a adição do peptídeo, os valores encontrados foram 29,8°C (scan 3) e 28,9°C (scan 4) para o F127 na concentração de 0,25 mM, e na maior concentração de F127 (1,5 mM), a CMT foi de 26,4°C (scan 3) e 25,9°C (scan 4).

Para as concentrações de F127/OCEL PT1 (0,5 mM, 0,75 mM e 1,0 mM) a CMT foi igual à do F127 sozinho, sendo respectivamente 27,8°C, 27,2°C e 26,8°C (scan 4). Para a endoterma de aquecimento (scan 3), nas concentrações (0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM) não houve alteração na CMT quando o peptídeo *Ocellatina* PT1 foi adicionado as micelas do F127.

É perceptível ainda, que o acréscimo do peptídeo provocou discreta mudança nos valores da CMT para algumas das concentrações testadas. No scan 4, a CMT do F127/OCEL PT1, nas concentrações (0,25 mM, 1,25 mM e 1,5 mM) foi um pouco maior que para o F127 sozinho nas mesmas concentrações. Nas concentrações de 0,75 mM e 1,25 mM houve uma discreta mudança na CMT (scan 3), sendo que na concentração de 0,75 mM a CMT do F127 foi um pouco maior do que quando o peptídeo foi adicionado (27,6°C F127 e 27,5°C F127/OCEL PT1). Já na concentração de 1,25 mM a CMT foi um pouco maior na presença do peptídeo (26,7°C F127 e 26,8°C F127/OCEL PT1). Apesar do peptídeo antimicrobiano utilizado ser diferente do deste estudo, resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Souza (2018), em que uma discreta mudança na CMT foi observada quando o peptídeo Jeleina I foi incorporado ao F127. Vale ressaltar ainda, que embora discreta essa variação observada nos valores da CMT do F127/OCEL PT1 quando comparado ao F127 sem a presença do peptídeo, demonstra que possivelmente houve interação do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 com as micelas do plurônico F127.

Figura 6 – Variação da Temperatura Micelar Crítica (CMT) em função da concentração de F127 (mM), na ausência e na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1, à 50 μM , obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h



Tal fato pode ser confirmado quando se investiga a entalpia de micelização (ΔH_m) do F127 e do F127 na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1 à 50 μM (F127/OCEL PT1), (Figura 7). Tanto no scan 3 quanto no 4, é notória variação na entalpia de micelização tanto quando houve acréscimo na concentração do F127, como quando o peptídeo *Ocellatina* PT1 foi adicionado.

A influência da concentração do F127 e o reflexo na variação da entalpia de micelização podem ser explicados pelo fato de que com o aumento da concentração F127, a formação das micelas é facilitada, devido ao colapso das moléculas de água. Patiño Agudelo (2015) cita que a força motriz para a formação de micelas dos copolímeros em tribloco, como é o caso do Plurônico F127, é de natureza entrópica, ou seja, devido ao efeito hidrofóbico.

Quando moléculas de água solvatam regiões hidrofóbicas, elas devem ser estruturadas de modo que possam realizar o maior número de ligações de hidrogênio possíveis, o que leva a uma orientação específica da água fazendo com que seus graus de liberdade sejam reduzidos. Quando há um aumento na hidrofobicidade, as moléculas começam a se associar, e no momento em que isto acontece moléculas de água são liberadas com consequente aumento na entropia do sistema. O valor da entalpia padrão de micelização é um indicativo da magnitude do efeito hidrofóbico e para copolímeros em soluções diluídas o valor é alto,

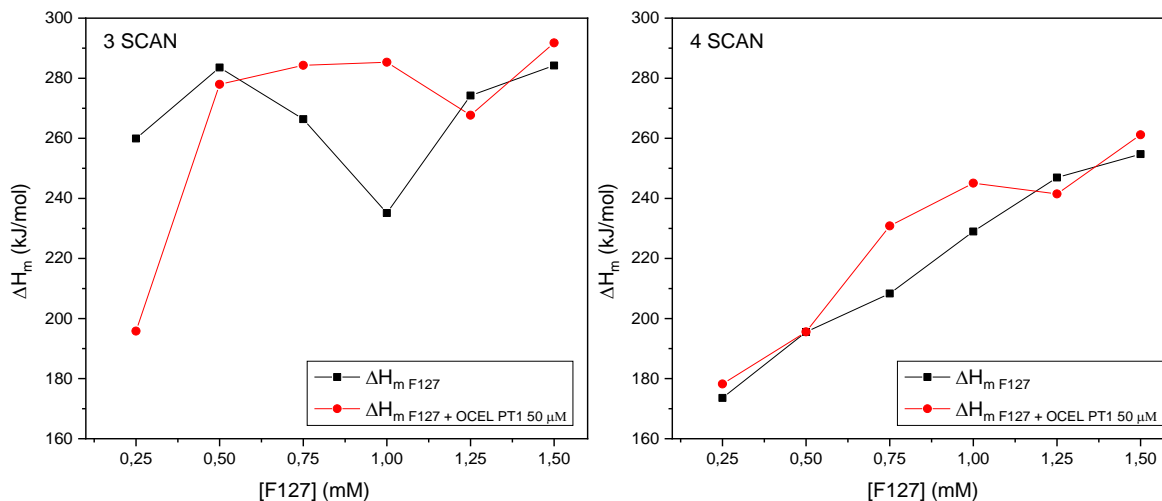
podendo variar entre 150 a 350 kJ/mol, o que concorda com a faixa de valor encontrado nesse trabalho (DUTRA, 2012).

As diferenças no tamanho das micelas, morfologia, número de agregados formados e interações intermoleculares, dentre outros fatores, podem ter levado a valores distintos de entalpia para as diferentes concentrações testadas.

Quando se analisa o scan 3 (aquecimento) do F127 sem a presença do peptídeo, nenhum padrão/tendência quanto à variação da entalpia de micelização pode ser notada (grandes variações na ΔH_m entre uma concentração e outra estão presentes). Ao passo que quando o peptídeo foi adicionado, nota-se que a medida que há um aumento na concentração do F127, um aumento na entalpia de micelização também é observada, o que pode indicar que na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1, o processo de micelização ocorre de forma mais lenta, necessitando assim de um maior gasto de energia para que os monômeros comecem a se agregar e formar as micelas, a única exceção é quando o F127 muda da concentração de 1,0 mM para a concentração de 1,25 mM, pois nessa concentração houve uma redução na ΔH_m , mas que novamente aumenta quando há um incremento na concentração de F127. Vale ressaltar que nas concentrações de (0,50 mM, 0,75 mM e 1,0 mM) do F127/OCEL PT1, os valores da entalpia de micelização foram quase constantes.

No scan 4 (resfriamento), observa-se que a medida em que aumenta a concentração de F127, um aumento na entalpia de micelização também é notada, isso ocorre tanto para o F127 sozinho como também para o F127/OCEL PT1, o que mais uma vez pode ser um indicativo que a concentração do copolímero também pode interferir no processo de micelização, sendo que a medida em que há um aumento na concentração dele, há uma tendência de que o processo de micelização ocorra de forma mais lenta, necessitando assim de um maior gasto de energia para que os monômeros comecem a se agregar e formar as micelas. Patiño Agudelo (2015) cita que a medida em que há um aumento na concentração do copolímero, há uma tendência a ocorrer uma saturação energética no sistema, fazendo com que os unímeros se difundam para a parte interna de tal sistema, levando a formação dos agregados micelares.

Figura 7 – Entalpia micelização (ΔH_m) pela concentração de F127 (mM), na ausência e na presença do peptídeo *Ocellatina* PT1 à 50 μM , obtidos por aquecimento (scan 3) e resfriamento (scan 4), com tempo de pré - varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h



É perceptível também, que a presença do peptídeo também contribuiu para o aumento da ΔH_m , a única redução no valor da entalpia de micelização ocorreu quando o F127/OCEL PT1 muda da concentração de 1,0 mM para a concentração de 1,25 mM, pois nessa concentração houve uma redução na ΔH_m , mas que novamente tende a aumentar quando há um incremento na concentração de F127, fato que também foi observado no scan 3. Essa redução na entalpia de micelização para o F127 na presença do peptídeo (da concentração de 1,0 mM para a concentração de 1,25 mM), também foi observada no trabalho de Souza (2018), utilizando o peptídeo Jeleína I (JI).

Comparando os valores da ΔH_m do F127 sozinho e com o acréscimo da Jeleína I uma redução na ΔH_m do F127+JI foi encontrada, fato contrário ao observado neste estudo com a *Ocellatina* PT1. A autora ainda cita que a adição do peptídeo Jeleína I, favoreceu o processo de micelização, pois um menor gasto energético foi necessário para agregar ou desagregar os monômeros. Vale ressaltar que as características apresentadas pelos peptídeos podem ter influenciado nesse processo de micelização. A JI é um peptídeo curto, com apenas 8 resíduos de aminoácidos na sua sequência primária: PFKISHL-NH₂, sua massa molecular é 953,24 Da, ao passo que a OCEL PT1 é um peptídeo longo, com 25 resíduos de aminoácidos na sua sequência primária: GVFDIIKDAGCQLVAHAMGKIAEKV-NH₂ e

sua massa molecular é 2639,1 Da. Ambos são considerados peptídeos catiônicos, apresentam um C-terminal amidado, como também sequências hidrofóbicas. As diferenças de tamanho, massa, quantidades de sequências hidrofóbicas levam a formação de diferentes arranjos estruturais, alterando as forças de interação presentes o que pode favorecer ou não o processo de formação das micelas.

Vale ressaltar ainda, que o presente trabalho teve como objetivo o estudo das características físico-químicas para entender a possível interação do peptídeo com as micelas do F127. Mas, levando em consideração a CMT encontrada para esse sistema que variou entre 26°C e 30°C aproximadamente, nas diferentes concentrações testadas, é válido pensar em uma possível aplicação no organismo humano, visto que segundo Dutra (2012), a faixa de temperatura considerada de interesse para a aplicação farmacológica é de 25°C a 37°C.

A taxa de liberação do fármaco pode ser afetada pelo estado físico das nanopartículas, isso porque a força de interação entre o fármaco e o núcleo micelar pode ser influenciado. Sabe-se também, que uma característica apresentada pelo F127 é que quando está em uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a corpórea ele tem a tendência a formação de géis, desde que esteja em uma concentração adequada, o que torna tais misturas interessantes para uma administração subcutânea de medicamentos. No estado gel é esperado uma maior interação entre o fármaco e o núcleo em decorrência do maior empacotamento do sistema, fazendo com que sua mobilidade fique mais restrita e a taxa de liberação do fármaco ser melhor controlada (DUTRA, 2012). Logo, como a variação no valor da CMT foi muito discreta, mais estudos ainda são necessários (como por exemplo, microscopia eletrônica, para avaliar o formato das micelas, comportamento reológico, dissolução, dentre outras), para se definir o mecanismo de interação e as características do sistema formado por OCEL PT1/F127. Além disso, também podem ser analisados outros fatores que possam interferir ou modificar as características desse sistema podendo levar a melhor compreensão e possíveis aplicações dele.

5.2 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

Pode-se observar na análise por DLS, que o diâmetro hidrodinâmico médio das micelas de todas as concentrações de F127 à 25 °C foi menor quando

comparado ao das micelas de F127+OCEL PT1, para a mesma concentração de F127 (Figura 8), resultado semelhante também foi encontrado por Souza (2018), embora tenha utilizado um peptídeo antimicrobiano diferente do deste estudo. O diâmetro médio (D_H) do sistema formado por F127+OCEL PT1 variou de aproximadamente 22,9 a 50,1 nm, enquanto que o do F127 puro ficou entre 15,6 a 32,9 nm (Tabela 3). Observa-se também que nos intervalos (0,25 – 0,75 mM) e (1,00 – 1,50 mM), pequenas alterações no (D_H) podem ser notadas.

Um aumento mais significativo no (D_H), ocorre entre 0,75 a 1,00 mM, como pode ser observado na Figura 8, e pode ser decorrente da presença de nanoagregados com maiores diferenças de formatos. Santos (2014) cita que as interações interfaciais podem interferir na curvatura e formato assumido pela micela, e que isso pode impactar tanto no tipo, tamanho e distribuição dos nanoagregados formados. Sabe-se também, que as características dos surfactantes utilizados e das condições do meio em que eles se encontram também são de fundamental importância. Um mesmo surfactante pode formar diferentes geometrias de micelas, e essas geometrias diferenciadas podem impactar tanto nas propriedades termodinâmicas do sistema, como também na capacidade para serem transportadas.

Figura 8 – Diâmetro hidrodinâmico das micelas do Plurônico F127 (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1,0 mM; 1,25 mM e 1,5 mM) na ausência e na presença do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, na concentração 50 μ M, a 25°C

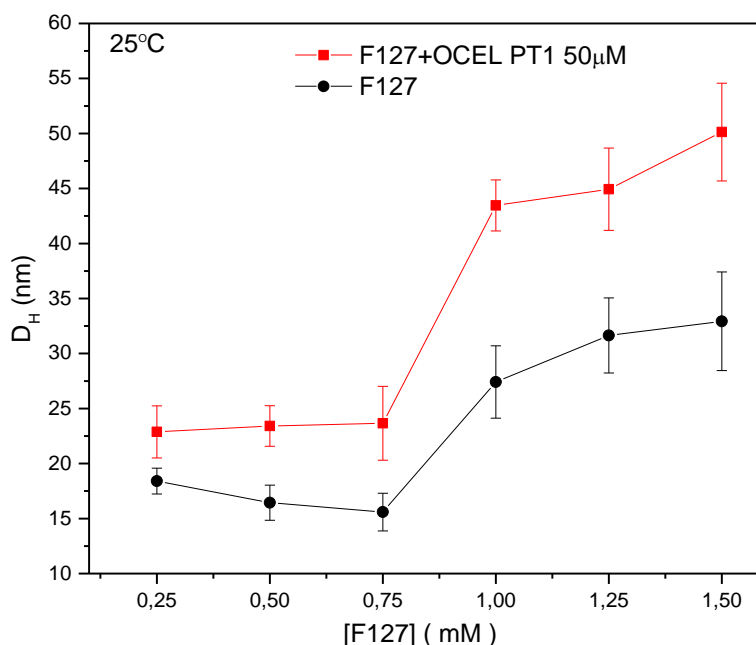


Tabela 3 – Diâmetro médio (D_H) das micelas de F127 e do F127+*Ocellatina* PT1 à 50 μ M, na temperatura de 25°C

[F127] (mM)	D_H (nm) F127, 25°C	D_H (nm) F127+OCEL PT1, 25°C
0,25	18,4	22,9
0,50	16,4	23,4
0,75	15,6	23,7
1,00	27,4	43,7
1,25	31,6	44,9
1,50	32,9	50,1

O tamanho de partícula é um fator de suma importância durante a formulação de sistemas carreadores de fármacos, uma vez que podem influenciar na cinética de liberação dos ativos, bem como nos perfis de biodistribuição e posterior eliminação (VALENZUELA OSES, 2016). Os valores para o diâmetro médio das micelas poliméricas do plurônico F127 na temperatura de 25°C, estão de acordo com a literatura, a qual relata que o diâmetro das micelas de plurônico pode variar de 10 a

100 nm (ANDRADE et al., 2015; BATRAKOVA; KABANOV, 2008; TRONG; DJABOUROV; PONTON, 2008).

É sabido que a temperatura pode afetar significativamente o tamanho das micelas, sendo que há uma tendência de que com o aumento da temperatura as micelas reduzam de tamanho. Essa tendência tem sido justificada pelo fato de que em temperaturas menores a energia cinética das moléculas de água é menor e, portanto, as interações de hidrogênio com a porção de PEO presente nas micelas seja favorecida, resultando em um maior diâmetro hidrodinâmico delas, ao passo que o aumento na temperatura pode levar à desidratação da porção de PEO e consequente diminuição no tamanho das micelas (VALENZUELA OSES, 2016). Essa redução no tamanho das micelas de F127 influenciados pelo aumento da temperatura tem sido reportado na literatura em trabalhos prévios (AKKARI et al., 2016; ANDRADE et al., 2015; TRONG; DJABOUROV; PONTON, 2008; VALENZUELA OSES, 2016). Segundo Basak e Bandyopadhyay (2013), isso ocorre porque o aumento da temperatura expulsa o solvente do núcleo micelar, levando a um aumento na hidrofobicidade desse núcleo, o que acaba resultando em uma micela mais compacta e consequentemente com menor tamanho.

Os resultados do D_H das micelas poliméricas de F127 + OCEL PT1 à 25 °C, não podem ser comparados com outros dados, por não existir relatos na literatura com tal peptídeo. No entanto, os resultados encontrados são positivos, por indicarem que uma possível interação entre o F127 e o peptídeo *Ocellatina* PT1 ocorreu, uma vez que após a adição do peptídeo houve um aumento do tamanho de tais micelas. Além do fato de que como tais micelas apresentaram um diâmetro entre 22 a 50 nm, podem ter aplicação na entrega de fármacos, pois de acordo com a literatura, micelas poliméricas com diâmetro entre 10 a 100 nm são excelentes para o uso em aplicações farmacêuticas, como no sistema de entrega controlada de fármaco (*drug delivery*) (TORCHILIN, 2001). Segundo Yokoyama (2011), a escala de tamanho das micelas com diâmetro médio < 80 nm (como as obtidas neste estudo), é considerada ideal para alcançar a estabilidade e maior tempo de circulação do sistema carreador na corrente sanguínea, uma vez que com tal tamanho essas micelas conseguem evadir a filtração renal o que faz com que o seu tempo de circulação sistêmica seja aumentado sem que ocorra o risco de bloquear os vasos sanguíneos. O autor ainda cita que com o passar do tempo as cadeias que formam o copolímero serão dissociadas em monômeros, para posterior excreção renal.

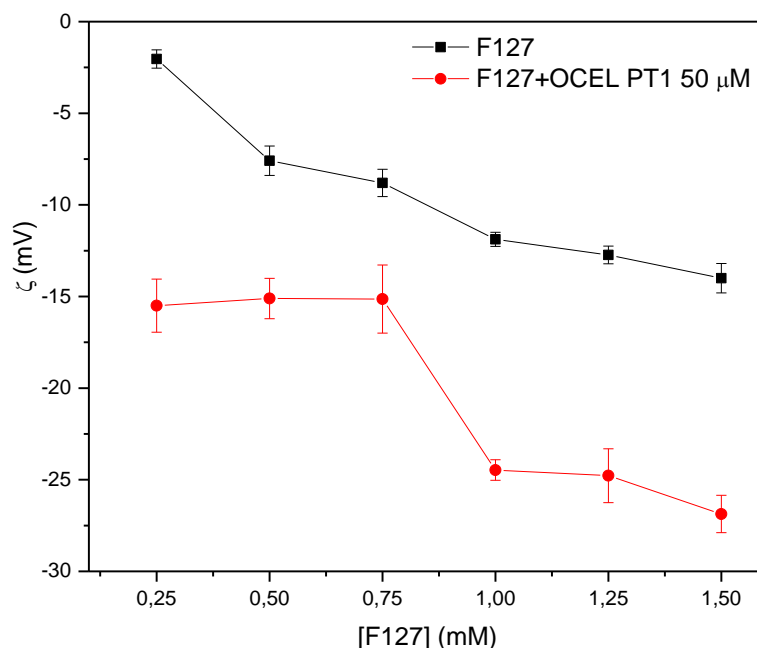
5.3 POTENCIAL ZETA (Z)

É o potencial eletrostático na superfície de cisalhamento de partículas coloidais, e que serve para determinar a mobilidade de tais partículas quando um campo elétrico está presente. O (ζ) é uma técnica que fornece informações do estado eletrônico da superfície, importante na compreensão da estabilidade das dispersões coloidais (LEMOS, 2015; OLIVEIRA, 2014).

Assim, o potencial zeta foi utilizado para avaliar a estabilidade das micelas do plurônico F127 em diferentes concentrações (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM), na ausência e na presença do PAM *Ocellatina* PT1 (50 μ M), a 25°C (Figura 9). Os resultados de ζ encontrados para o F127 sem a presença do peptídeo variaram de - 2,0 mV a - 14,0 mV. Resultados semelhantes para o ζ de F127 foram relatados nos trabalhos de Souza 2018 (- 4,8 mV a -10,8 mV) e Sezgin, Yukssel e Baykara (2006) (- 3 mV a -11 mV). Pode-se notar no presente estudo que a medida em que a concentração de F127 aumenta, uma redução para o potencial (ζ) é observada. Essa tendência também foi observada por Lemos (2015), que ainda justifica que tal redução pode ter ocorrido em função da alteração na densidade superficial das cargas.

Os valores do potencial para o F127+OCEL PT1 variaram de (- 15 mV a - 27 mV). A interação do PAM *Ocellatina* PT1 50 μ M com as micelas de F127 resultaram na mudança de potencial das micelas em todas as concentrações testadas do F127, sendo que houve uma redução no ζ na presença de tal peptídeo. Essa mudança pode ter sido influenciada pela carga do peptídeo que é positiva, o que pode ter provocado mudanças na interface entre o sistema particulado e o meio dispersante, que podem ter sido provocadas em razão da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície das partículas ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (RIBEIRO, 2016).

Figura 9 – Potencial Zeta das micelas do Plurônico F127 (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1,0 mM; 1,25 mM e 1,5 mM) na ausência e na presença do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, na concentração 50 μ M, a 25°C



Pode-se observar que nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM e 0,75 mM, os valores do potencial foram semelhantes (em torno de -15 mV). Uma mudança mais significativa foi notada quando o F127 teve sua concentração aumentada de 0,75 mM para 1,0 mM (variação do ζ de -15 mV para -24 mV), fato também observado no estudo por DLS, e que mais uma vez pode ser pela presença de nanoagregados com maiores diferenças de formatos, acabando refletindo no tamanho das micelas formadas. E os formatos adquiridos pelas micelas nessa faixa de concentração podem ter auxiliado para melhorar a estabilização delas. Um exemplo de alteração no formato, refletindo em características que podem impactar na estabilidade do sistema formado é citado por Santos (2014), em que a viscosidade de um nanoagregado em soluções aquosas contendo micelas cilíndricas é significativamente maior do que soluções com micelas com formatos globulares e esféricas. Nas concentrações de 1,0 mM, 1,25 mM e 1,5 mM a mudança de potencial não foi tão significativa, tendo variado de -24 mV a -27 mV.

Levando em conta que para um colóide ser considerado estável, o valor absoluto do potencial ζ deve ser maior ou igual à 30 mV (RIBEIRO, 2016), nas concentrações testadas, as que apresentam valores mais próximos para tal estabilidade foram 1,0 mM (-24,47 mV), 1,25 mM (-24,78 mV) e 1,5 mM (-26,87 mV). Vale ressaltar ainda, que embora os valores do (ζ) estejam fora dos parâmetros

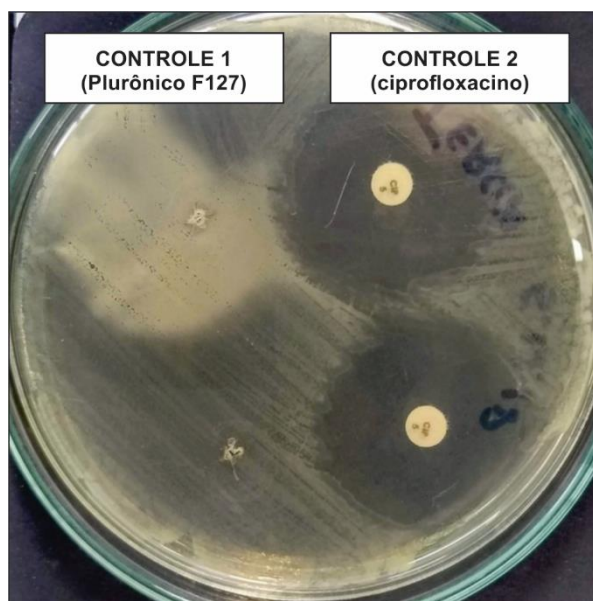
de estabilidade das partículas, esta não é uma regra, uma vez que durante a preparação delas, materiais que proporcionem uma carga às partículas, impedindo fenômenos de agregação podem ser acrescentados.

Além disso, embora não seja o caso dos resultados apresentados neste estudo, alguns trabalhos vêm demonstrando algumas vantagens quando partículas apresentam cargas de superfície próximas da neutralidade, pois podem ser utilizadas para aplicação de nanocarreadores para sistema de *drug delivery*, como por exemplo por via parenteral, uma vez que, por promoverem menores taxas de opsonização, podem aumentar o tempo de circulação desses nanocarregadores na corrente sanguínea. Partículas que apresentam superfícies neutras ou relativamente negativas, não conseguem interagir com proteínas do soro e nem com o sistema imunológico, o que segundo (AGGARWAL, 2009; MARTINS, 2011; ZUPANCICI, et al., 2014) podem garantir um maior tempo de circulação, maior proteção e estabilidade para tais partículas. Owens e Peppas (2006), também afirmam que superfícies formadas por cadeias hidrofílicas longas, como a dos polímeros não iônicos (plurônicos), também ajudam a reduzir o efeito da opsonização.

5.4 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana da *Ocellatina* nas concentrações de 400, 600, 800 e 1000 µg/ml, na presença e ausência do plurônico F127 foi investigada utilizando a técnica clássica de plaqueamento e difusão em agar por poços, adaptada da norma técnica do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para a análise foi investigada a inibição de uma cepa de *Escherichia coli*. Como controles de atividade antimicrobiana foram utilizados o plurônico puro (Controle 1) e discos do antibiótico ciprofloxacino (Controle 2). Como pode ser visualizado na Figura 10, observou-se um marcado halo de inibição ao redor do controle 2 e nenhum halo de inibição ao redor do controle 1, o que demonstrou a falta de atividade do plurônico puro (Figura 10).

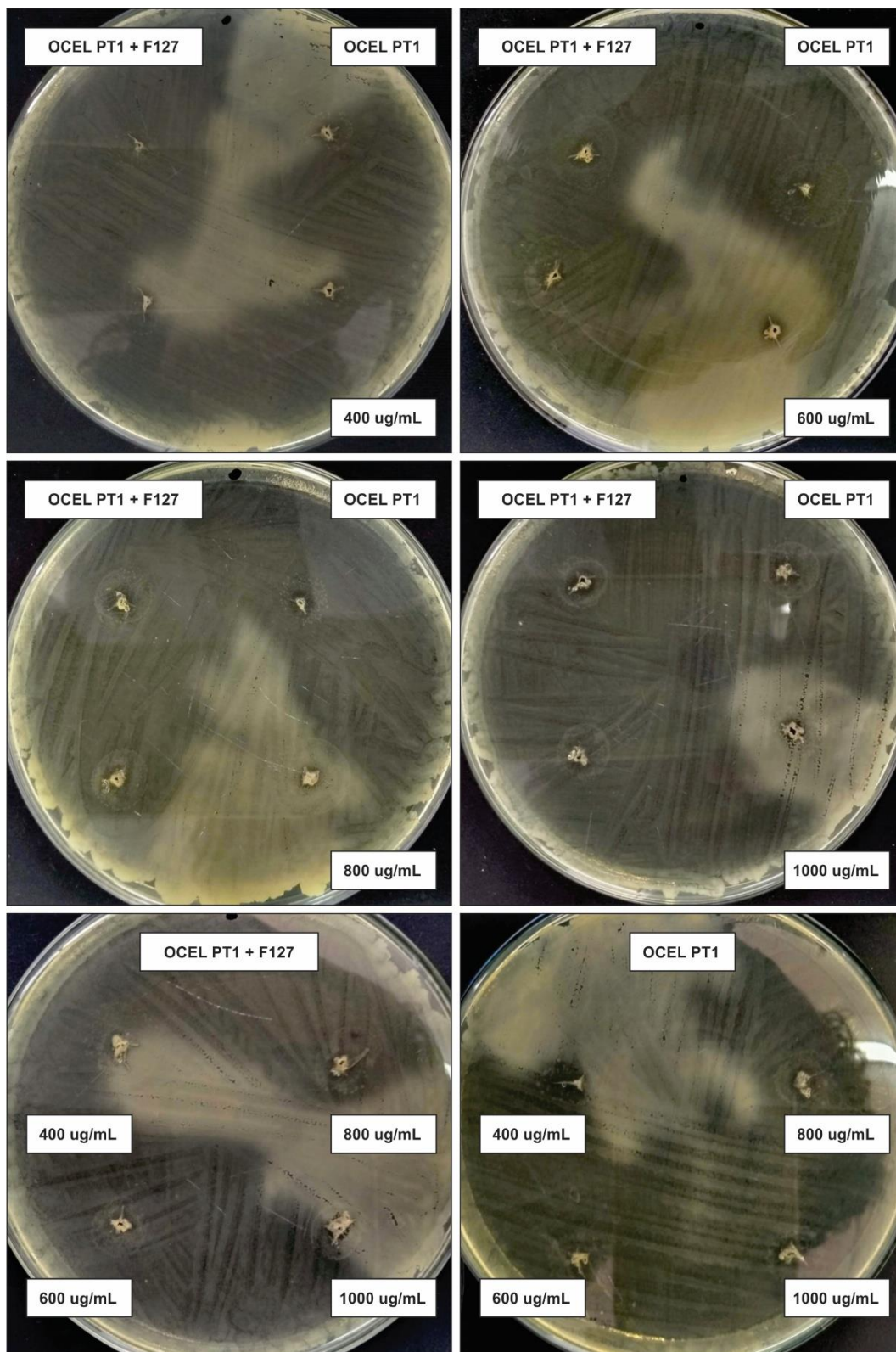
Figura 10 – Controles utilizados nos testes biológicos



Os resultados observados nas placas foram documentados, entretanto, como os valores das medições dos halos foram inferiores a 2 mm, optou-se por analisar o aspecto do crescimento ao redor do poço. Nas primeiras 15 horas, nas concentrações de 600, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, tanto para a OCEL PT1 quanto para o agregado OCEL PT1 + F127, foi observado uma inibição ao redor do poço (dados não mostrados), que não se manteve ao final das 24 horas. Ao final das 24 horas de ensaio, não foram observados halos bem definidos ao redor dos poços o que pode indicar baixa atividade ou nenhuma inibição, tal como pode ser visualizado na Figura 11.

Os testes antimicrobianos com a *Ocellatina* pura e com a adição do F127 mostraram que, nas concentrações de 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, uma interferência negativa no crescimento do tapete microbiano de *E. coli* pode ser evidenciada, pois uma distribuição diferenciada ao redor dos poços pode ser notada, e, que a presença do plurônico não potencializou tal atividade. Observou-se também que a *ocellatina* teve atividade sob altas concentrações, mas que a interação com o plurônico não potencializou a atividade antimicrobiana no ensaio de difusão em placa realizado. Estes resultados demonstram a necessidade de ampliação deste estudo incluindo outros testes antimicrobianos (como atividade hemolítica, MIC com outras cepas, com concentrações maiores que 1000 $\mu\text{g/ml}$ de *ocellatina* PT1), além de testar a atividade contra outros patógenos.

Figura 11 – Teste de atividade antimicrobiana: Resultados após 24 horas, contra *E. coli* (ATCC10536), utilizando o peptídeo *Ocellatina* PT1 nas concentrações de 400, 600, 800 e 1000 µg/ml, na presença (lado esquerdo) e na ausência (lado direito) do Plurônico F127



OCEL PT1 – *Ocellatina* PT1; F127 – Plurônico F127.

Embora a *ocellatina* PT1 apresente uma atividade relativamente menor quando comparada com outros PAMs provenientes da secreção de anuros, ela pode ser importante por ser seletiva para microorganismos e não para células de humanos (Marani et al., 2015). Essa redução de toxicidade para humanos, é um requisito importante do ponto de vista do potencial para aplicações futuras (MARANI et al., 2015). Além disso, a terapia combinada com antibióticos já disponíveis é um tópico que também pode ser explorado, pois PAMs podem agir sinergicamente promovendo uma melhoria da ação do fármaco (MARANI et al., 2015). Um exemplo clássico para os fatos mencionados é a associação da amoxicilina + clavulanato de potássio. Hoje, várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados na prática clínica, como exemplo a amoxicilina (AZEVEDO, 2014). Este fármaco possui amplo espectro de atividade antibacteriana, apresenta boa eficácia clínica e segurança, e atua na enzima transpeptidase, única em bactérias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Porém, algumas bactérias adquiriram a capacidade de produzir “beta-lactamases”, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico, inativando a ação deste antibiótico e de outros das classes das penicilinas (AZEVEDO, 2014). Para melhorar a ação deste fármaco e prevenir possíveis quadros de resistência, foi acrescentado em algumas formulações, os inibidores de β -lactamases, como por exemplo o clavulanato de potássio (AZEVEDO, 2014). Este inibidor, quando associado ao antibiótico da classe das penicilinas pode recuperar, e muitas das vezes ampliar, a sua ação contra bactérias produtoras desta enzima (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Alguns outros exemplos de fármacos associados e que tiveram seu potencial de ação aumentado são as sulfonamidas e trimetoprim, tazobactam e piperacilina, sulbactam e ampicilina, dentre outros (AZEVEDO, 2014; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Pode-se ainda investigar o potencial para aplicação de tal peptídeo para patógenos ambientais (ROLLINS-SMITH et al., 2005). Estes PAMs podem ser importantes para o sistema de defesa do hospedeiro, e poucos estudos têm sido conduzidos sobre cepas de bactérias que ocorrem naturalmente no ambiente, tais como as que estão presentes na pele de anfíbios (ROLLINS-SMITH et al., 2005). Outro fato interessante é que normalmente a produção dos PAMs ocorre em grandes quantidades nestes anuros. Essa grande produção, pode compensar a menor efetividade, visto que sua concentração pode exceder em massa o valor de

CIM de muitos patógenos para o qual o animal pode ser exposto na natureza (ROLLINS-SMITH et al., 2005).

A potência de um peptídeo particular contra um microrganismo é determinada por uma interação complexa de fatores como carga líquida, hidrofobicidade, conformação (grau de helicidade), anfipaticidade, a composição de aminoácidos, dentre outros fatores (MARANI et al., 2015; YEAMAN; YOUNT, 2003). Alterações e/ou acréscimos na sequência dos aminoácidos podem levar a diferenças nos potenciais de atividades antimicrobianas. A presença de uma carga negativa proveniente do ácido aspártico na posição 8 da *Ocellatina* PT1, produz uma redução do conteúdo da α -hélice anfipática. Essa alteração pode ser a causa da baixa atividade antimicrobiana encontrada nesta *ocellatina*, em comparação com às *ocellatinas* PT4, PT7 e PT8 (MARANI et al., 2015). Além disso, como já citado, alterações na estrutura da *Ocellatina* PT1 podem ser realizadas, de modo que uma melhora da atividade antimicrobiana possa ser obtida.

Apesar dos resultados microbiológicos não terem sido conclusivos sobre a real influencia do F127 para a melhora na eficiência microbiológica, essa não é a única finalidade de incorporá-lo a um peptídeo. As micelas do F127 podem servir para proteger o peptídeo da degradação enzimática, melhorar a permeabilidade nas membranas biológicas, aumentar a meia-vida, oferecer proteção e direcionamento a alvos específicos no organismo, melhorando a biodisponibilidade do ativo. Nesse sentido, mais estudos ainda devem ser conduzidos para melhor compreender o impacto dessas micelas e a interferência que podem causar a nível molecular como também possíveis impactos e aplicações desses sistemas, a fim de otimizar suas atividades biológicas, estruturais, podendo levar ao desenvolvimento de nanomateriais com aplicações na área farmacológica e/ou ambiental.

6 CONCLUSÕES

Foi possível observar a interação do peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1 com as micelas poliméricas não-iônicas do F127, por diversas técnicas através da caracterização físico-química. Algumas das características apresentadas pelos nanoagregados F127/OCEL PT1 foram: diâmetro micelar adequado (variando de 22 nm a 50 nm), carga de superfície com alguns valores próximos da estabilidade (-15 mV a -27 mV), pequenas alterações na CMT e mudanças mais significativas na entalpia quando o peptídeo foi adicionado as micelas do F127 (endoterma de aquecimento variando de 29,8°C a 26,4°C e endoterma de resfriamento variando de 28,9°C a 25,9°C), sendo que uma redução na CMT foi notada a medida que a concentração de F127 aumentava. Tais características são importantes e podem servir para o desenvolvimento de nanocarreadores para sistemas de entrega controlada de fármaco.

Com relação a atividade antimicrobiana, foi observado que a *ocellatina* PT1 tem atividade sob altas concentrações e que o F127 não levou a uma potencialização da atividade do peptídeo, o que demonstra a necessidade de ampliação deste estudo incluindo outros ensaios antimicrobianos e outros patógenos.

Diante disso, acredita-se que no futuro com estudos complementares, os nanoagregados micelares de F127 poderão ser utilizados como nanocarreadores para o peptídeo antimicrobiano *Ocellatina* PT1, com potencial uso terapêutico no desenvolvimento de um novo antibiótico seja para terapia isolada e/ou combinada, que é de suma importância diante do quadro de bactérias resistentes vivenciados na atualidade.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 428-437, 2009.
- AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Pluronic F127-based thermosensitive gels for delivery of therapeutic proteins and peptides. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 573-597, 2014.
- AKKARI, A. C. S. et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. **Materials Science & Engineering C**, 2016.
- AL KHATEB, K. et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 502, n. 1-2, p. 70-79, 2016.
- ALAKHOV, V. et al. Pluronic block copolymers and Pluronic poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 10, p. 1233-1241, 2010.
- ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96 n. 1-2. p. 1-46, 1995.
- ALEXANDRIDIS, P.; TSIANOU, M. Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization. **European Polymer Journal**, v. 7, n. 2, p. 569-583, 2011.
- AL-NAHAIN, A. et al. Triggered pH/redox responsive release of doxorubicin from prepared highly stable graphene with thiol grafted Pluronic. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 208-217, 2013.
- ALVARES, D. S. **Estudo da formação de domínios em bicamadas lipídicas induzidos por peptídeos antimicrobianos**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.
- ALVES, D. A. et al. Preparation of thermosensitive gel for controlled release of levofloxacin and their application in the treatment of multidrug-resistant bacteria. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 1-10, 2016.
- ALVES, D.; PEREIRA, M. O. Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. **Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 30, n. 4, p. 83-99, 2014.
- AMARAL, G. C. **Estudo da interação de peptídeos auto-organizáveis que respondem às mudanças de pH com modelos de membranas lipídicas para o**

- potencial desenvolvimento de biomateriais nanoestruturados.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Modelagem em Materiais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2012.
- ANDRADE, F. et al. Solid state formulations composed by amphiphilic polymers for delivery of proteins: characterization and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 2-3, p.195-206, 2015.
- AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceutics (Basel)**, v. 6, n. 8, p. 1055-1081, 2013.
- ARCHILHA, N. L. **Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolípidios.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física, Departamento de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and pH. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 29, n. 13, p. 4350-4356, 2013.
- BATRAKOVA, E. et al. Fundamental relationships between the composition of Pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 9, p. 1373-1379, 1999.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98-106, 2008.
- BOHORQUEZ, M. et al. A study of the temperature-dependent micellization of Pluronic F-127. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 216, n. 1, p. 34-40, 1999.
- BONFERONI, M.C. et al. Palmitoyl glycol chitosan micelles for corneal delivery of cyclosporine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 1, p. 231-240, 2016.
- BUTT, A. M. et al. In Vitro Characterization of Pluronic F127 and D-Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 11, 2012.
- CHAGAS, A. D. S. **Efeitos antiproliferativos sobre células tumorais das secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phillomedusa azurea* e de seus peptídeos biologicamente ativos sobre o fungo *Candida albicans*.** 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 1, p. 303-317, 2007.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-59, 2011.

COELHO, J. F. et al. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. **EPMA Journal**. v. 1, n. 1, p. 164-209, 2010.

CUCINA, A. et al. Dual 0.02% chlorhexidine digluconate - 0.1% disodium EDTA loaded thermosensitive ocular gel for Acanthamoeba keratitis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, p. 330-337, 2018.

CUTRÍN-GOMES, E. et al. Effect of Penetration Enhancers on Drug Nail Permeability from Cyclodextrin/Poloxamer-Soluble Polypseudorotaxane-Based Nail Lacquers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 2018.

DALY, J. W. et al. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 8, p. 805-815, 2004.

DE BATTISTI RIBEIRO, A. P. **Avaliação da atividade leishmanicida de soluções de Pluronic F-127 contendo anfotericina B para o tratamento da leishmaniose visceral murina**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2014.

DIGESU, C. S. et al. From diagnosis to treatment: Clinical applications of nanotechnology in thoracic surgery. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 26, n. 2, p. 215-228, 2016.

DUNG, T. H.; HUONG, L. T.; YOO, H. Morphological Feature of Pluronic F127 and Its Application in Burn Treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 2, p. 829-832, 2018.

DUTRA, L. M. U. **Sistemas micelares de F127®, P123® e suas misturas como nanocarreadores dos fármacos griseofulvina e mangiferina**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

EHLERS, H.; HEINÄMÄKI, J.; YLIRUUSI, J. Particuology particle size and packing characterization by diffuse light transmission. **Particuology**, v. 10, n. 5, p. 619-627, 2012.

EMAMI, J. et al. A novel mixed polymeric micelle for co-delivery of paclitaxel and retinoic acid and overcoming multidrug resistance: synthesis, characterization, cytotoxicity, and pharmacokinetic evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 5, p. 729-740, 2018.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. Applications of termo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 339-358, 2006.

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

FACHINETTI, N. **Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para a administração cutânea de trans-resveratrol**. 2013. 77 f. Graduação (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

FEITOSA, E. et al. DODAB and DODAC bilayer-like aggregates in the micromolar surfactante concentration domain. **Colloid and Polymer Science**, v. 287, n. 5, p. 591-599, 2009.

FEITOSA, E.; WINNIK, F. Interaction between Pluronic F127 and dioctadecylmethylammonium bromide (DODAB) vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 26, n. 23, p. 17852-17857, 2010.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FREIRE, D. O. **Atividade antimicrobiana do novo peptídeo Synoeca-MP isolado da peçonha de *Synoeca surinama* frente a bactérias resistentes**. 2014. 60 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 48-57, 2010.

GAUCHER, G. et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 169-188, 2005.

GAWANDE, P. V.; LEUNG, K. P.; MADHYASTHA, S. Antibiofilm and antimicrobial efficacy of DispersinB - KSL- W peptide-based wound gel against chronic wound infection associated bacteria. **Current Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 635-641, 2014.

GILL, P.; MOGHADAM, T. Y.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 4, p. 167-193, 2010.

GJERDE, N. et al. Effect of PCL end-groups on the self-assembly process of Pluronic in aqueous media. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 4, p. 2716-2723, 2018.

GONZALEZ-PIZARRO, R. et al. In situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 175, p. 365-374, 2018.

GORLE, A. P.; KHAIRNAR, D. P. An approach to Improve Therapeutic Efficacy of Doxycycline Hyclate in Treatment of Periodontitis. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 1550-1562, 2018.

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

GUSMÃO, K. A. G. **Sequenciamento, síntese, atividade biológica, estudos biofísicos e estudos estruturais por RMN de três peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus***. 2016. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

HASHEMI, M. M. et al. Antibacterial and Antifungal Activities of Poloxamer Micelles Containing Ceragenin CSA-131 on Ciliated Tissues. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.

HOW, C. W.; ABDULLAH, R.; ABBASALIPOURKABIR, R. Physicochemical properties of nanostructured lipid carriers as colloidal carrier system stabilized with polysorbate 20 and polysorbate 80. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1684-1689, 2011.

HSIAO, F. et al. In vitro and in vivo assessment of delivery of hydrophobic molecules and plasmid DNAs with PEO-PPO-PEO polymeric micelles on cornea. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 869-878, 2018.

INAGAKI, S.; GHIRLANDO, R.; GRISSHAMMER, R. Biophysical characterization of membrane proteins in nanodiscs. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 287-300, 2013 ou 2014.

IVANOVA, N. A. et al. In vitro and ex vivo studies on Diltiazem hydrochloride-loaded microsponges in rectal gels for chronic anal fissures treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 557, p. 53-65, 2018.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

KABANOV, A.; ZHU, J.; ALAKHOV, V. Pluronic block copolymers for gene delivery. **Advances in Genetics**, v. 53, p. 231-261, 2005.

KANG, H-K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-12, 2017.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUMARI, P.; GHOSH, B.; BISWAS, S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 3, p. 179-191, 2016.

LEE, H.; PARK, J. H.; PARK, J. H. Administration of a Sol-Gel Formulation of Phenylephrine Using Low-Temperature Hollow Microneedle for Treatment of Intermittent Fecal Incontinence. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 12, p. 2809-2816, 2017.

LEE, K.; SHIN, S-C.; OH, I. Fluorescence spectroscopy studies on micellization of Poloxamer 407 solution. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 8, p. 653-658, 2003.

LEMOES, M. **Transição vesícula micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio quaternário com Pluronic® F127**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

LESZCZYNSKA, K. et al. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 229-238, 2011.

LI, C. et al. Synthetic polymeric mixed micelles targeting lymph nodes trigger enhanced cellular and humoral immune responses. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 3, p. 2874-2889, 2018.

LIN, P. C. et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014.

LIU, S.; LI, L. Molecular interactions between PEO–PPO–PEO and PPO–PEO–PPO triblock copolymers in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, p. 485-497, 2015.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 194, p. 1-12, 2016.

MANDAL, S. M. et al. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 633-637, 2009.

MARANI, M. M. et al. Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1495-1504, 2015.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 468-472, 2006.

MARTINS, S. et al. Physicochemical properties of lipid nanoparticles: Effect of lipid and surfactant composition. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 7, p. 815-824, 2011.

MECKE, A. et al. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 6, p. 4043-4050, 2005.

MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4085-4092, 2005.

MELO, C. S.; JUNIOR, A. S. C.; FIALHO S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 469-477, 2012.

MENDONÇA, D. V. C. et al. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 779-787, 2019.

MESHKINI, A.; OVEISI, H. Methotrexate-F127 conjugated mesoporous zinc hydroxyapatite as an efficient drug delivery system for overcoming chemotherapy resistance in osteosarcoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.158, p. 319-330, 2017.

MOHAMED, E. A. et al. Polymeric micelles for potentiated antiulcer and anticancer activities of naringin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1009-1027, 2018.

MOREIRA, J. R. L. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama**. 2013. 38 f., il. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

NASCIMENTO, A. C. C et al. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p 227-238, 2003.

NASCIMENTO, A. C. C. C. DO. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases**. 2007. 73 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

NASCIMENTO, A. C. C. et al. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The Protein Journal**, v. 23, n. 8, p. 501–508, 2004.

NEACSU, M. V. et al. Interaction between albumin and Pluronic F127 block copolymer revealed by global and local physicochemical profiling. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 18, p. 4258–4267, 2016.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review Antimicrobiol Resistance**. p.1–16. 2014.

OH, K. S. et al. Sol-gel transition of nanoparticles/polymer mixtures for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 3, p. 664-669, 2014.

OLIVEIRA, S. S. A. M. D. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2014. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93–102, 2006.

PACHIONI, J. et al. Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 2, p. 205-218, 2016.

PANDIT, A. P.; POL, V. V.; KULKARNI, V. S. Xyloglucan Based In Situ Gel of Lidocaine HCl for the Treatment of Periodontosis. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

PATIÑO AGUDELO, A. J. **Efeito de líquidos iônicos sobre micelização de copolímeros tribloco**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Magister Scientiae) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

PERINI, F. M. **Análise teórica do potencial antibacteriano de peptídeos oriundos da clivagem *in silico* da eritropoetina humana**. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

PUGLIESE, R.; GELAIN, F. Peptidic biomaterials: From self-assembling to regenerative medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 35, p. 145-158, 2017.

QU, J. et al. Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. **Biomaterials**, v. 183, p. 185-199, 2018.

RAMOS, A. P. Espalhamento de luz dinâmico aplicado à caracterização de nanopartículas. In DA ROZ, A. L. et al. (Org.). **Técnicas de Nanocaracterização: Princípios e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

RAO, M.; AGRAWAL, D. K.; SHIRSATH C. Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 1, p. 142-150, 2017.

REUS, M. **Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de sistemas coloidais como carreadores para a administração ocular do agente antitumoral 5-fluorouracil**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

RIBEIRO, E. B. **Desenvolvimento de nanocarreadores formados por micelas de Pluronic F127 ou nanoemulsões para veiculação de Interferon gamma e avaliação do potencial imunomodulador**. 2016. 177 f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

ROLLINS-SMITH, L. A. et al. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). **Regulatory Peptides**, v. 124, n. 1-3, p. 173-178, 2005.

ROSCIA, G. et al. The Development of Antimicrobial Peptides as New Antibacterial Drugs. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, n. 8, p. 641-649, 2013.

RUSSELL, D.; HANSEN, L. D. Calorimeters for biotechnology. **Thermochemica Acta**, v. 445, n. 2, p. 151-159, 2006.

SALAY, L. C. et al. Dermaseptin 01 as antimicrobial peptide with rich biotechnological potential: study of peptide interaction with membranes containing *Leishmania amazonensis* lipid-rich extract and membrane models. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 10, p. 700-707, 2011.

SALAY, L.C. et al. Headgroup specificity for the interaction of the antimicrobial peptide tritrpticin with phospholipid Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 95-102, 2012.

SALAY, L.C. et al. Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritrpticin in planar lipid bilayers. **FEBS Letters**, v. 565, n. 1-3, p. 171-175, 2004

SANTOS, D. C. **Investigação de parâmetros de síntese e de potencialidades dos sistemas de nanopartículas de ouro empregando Pluronic F127 e Pluronic F127 tiolado como redutor/estabilizador**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa De Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

SANTOS, M. S. **Teoria de micelização: Propriedades de soluções de surfactantes via minimização da energia livre de Gibbs**. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio De Janeiro, Rio De Janeiro, 2014.

SANTOS, N. F. **Estudo da interação do peptídeo Indolicidina com nanoagregados poliméricos**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos) – Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

SAPSFORD, K. E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4453-4488, 2011.

SEVCSIK, E. et al. Interaction of Il-37 with model membrane systems of different complexity: Influence of the lipid matrix. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 12, p. 4688-4699, 2008.

SEZGIN, Z.; YÜKSEL, N.; BAYKARA, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 261-268, 2006.

SILVA, V. L. D. **Micelas poliméricas e nanopartículas de lípidos sólidos contendo Paclitaxel, para terapêutica de cancro da mama**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

SIMON, T.; BOCA, S. C.; ASTILEAN, S. Pluronic-Nanogold hybrids: Synthesis and tagging with photosensitizing molecules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 77-83, 2012.

SINGH, M. et al. Development and characterization of morin hydrate-loaded micellar nanocarriers for the effective management of Alzheimer's disease. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 2, p. 137-148, 2018.

SOUZA, A. Z. DE. **Interações moleculares do peptídeo antimicrobiano Jeleína I com micelas poliméricas do Plurônico F127 e sua atividade antimicrobiana**. 2018. 58 f. Tese (Doutorado em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos) – Programa De Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

TAO, Y. et al. Nano-formulation of paclitaxel by vitamin e succinate functionalized Pluronic micelles for enhanced encapsulation, stability and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, n. 1, p. 604-610, 2013.

TAVARES, G. S. V. et al. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology International**, v. 68, n. 1, p. 63-72, 2019.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p.137-172, 2001.

TRONG, L. C. P.; DJABOUROV, M.; PONTON, A. Mechanisms of micellization and rheology of PEO–PPO–PEO triblock copolymers with various architectures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, n. 2, p. 278-287, 2008.

TYRRELL, Z. L.; SHEN, Y.; RADOSZ, M. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 9, p. 1128-1143, 2010.

USKOKOVIC, V. Dynamic light scattering based microelectrophoresis: main prospects and limitations. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 33, n. 12, p. 1762-1786, 2012.

VALENZUELA OSES, J. K. **Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

VARSHOSAZ, J. et al. Poly (butylene adipate-co-butylene terephthalate) nanoparticles prepared by electrospraying technique for docetaxel delivery in ovarian cancer induced mice. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 6, p. 1012-1022, 2018.

VARSHOSAZ, J. et al. Self-assembly micelles with lipid core of cholesterol for docetaxel delivery to B16F10 melanoma and HepG2 cells. **Journal of Liposome Research**, v. 25, n. 2, p. 157-165, 2015.

VELTRI, D.; KAMATH, U.; SHEHU, A. Deep Learning Improves Antimicrobial Peptide Recognition. **Bioinformatics**, 2018.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 1087-1093, 2016.

WANG, J. C. et al. Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F-68, a hydrophilic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation. **Neurochemistry International**, n. 109, p. 126-140, 2017.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (Suiça). Global action plan on antimicrobial resistance. Genebra, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (Suiça). Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Genebra, 2017.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YOKOYAMA, M. Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 3, n. 4, p.151-158, 2011.

YONG-YONG, L. et al. Pluronic F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2698-2707, 2013.

ZHANG, T. et al. Polysialic acid and Pluronic F127 mixed polymeric micelles of docetaxel as new approach for enhanced antitumor efficacy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 11, p. 1827-1835, 2017.

ZUPANCIC, E. et al. Development of a novel nanoparticle-based therapeutic vaccine for breast cancer immunotherapy. **Procedia in Vaccinology**, v. 8, p. 62-67. 2014.