



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA PAULA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PLGA CARREGADAS COM O PEPTÍDEO CROTALICIDINA [15-34]**

FORTALEZA

2019

ANA PAULA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS
DE PLGA CARREGADAS COM O PEPTÍDEO CROTALICIDINA [15-34]

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia. Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tamara Gonçalves de Araújo

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S233d Santos, Ana Paula dos.
Desenvolvimento e atividade antifúngica de nanopartículas de PLGA carregadas com o peptídeo Crotalicidina [15-34] / Ana Paula dos Santos. – 2019.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Gandhi Radis Baptista.
Coorientação: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo.
1. Nanopartículas. 2. PLGA. 3. Crotalicidina [15-34]. 4. Antifúngicos. I. Título.

CDD 615

ANA PAULA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PLGA CARREGADAS COM O PEPTÍDEO CROTALICIDINA [15-34]

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia. Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tamara Gonçalves de Araújo

Aprovada em: 23 / 04 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Gandhi Rádís Baptista (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Angelo Roncalli Alves e Silva
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meu país, Pedro e Dete.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas a mim durante a vida.

Aos meus pais, Pedro e Dete, por todo amor, apoio incondicional e confiança.

Ao meu companheiro, Eduardo, por estar sempre ao meu lado segurando a minha mão, me apoiando e me motivando.

Aos meus irmãos, Antônio, Humberto e Gilberto, pelo apoio e confiança.

À professora Tamara, pela parceria, orientação, confiança e apoio emocional.

Ao professor Gandhi, pela orientação, parceria e confiança.

À minha amiga Roberta, e a todos os demais que formam a equipe do laboratório de Cosmetologia, pelo companheirismo e parceira na pesquisa.

À Professora Kalyne, à Bianca e ao CEFAC, pelo auxílio nas atividades de pesquisa.

A todos que fazem o LabPIM, pela disponibilidade e auxílio nas atividades de pesquisa.

À colega Lidiane e ao MarMoBio Lab, pela disponibilidade e ajuda na execução desse trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo e Angelo Roncalli Alves e Silva, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Universidade Federal do Ceará, pelo apoio recebido.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada.

RESUMO

As infecções fúngicas que acometem o ser humano, na forma de infecções tópicas ou como infecções sistêmicas, vêm se tornando uma causa significativa de morbidade. Aliado a isso, os antifúngicos normalmente utilizados para tratar essas infecções têm apresentado resultados terapêuticos limitados devido a efeitos colaterais tóxicos, baixa eficácia e o aparecimento de patógenos resistentes, tornando de grande interesse o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos na área farmacêutica. Neste sentido, o presente estudo objetivou desenvolver uma formulação otimizada de nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)) para veicular o peptídeo Crotalicidina [15-34], um promissor agente antifúngico derivado de uma catelicidina da glândula de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de dupla emulsificação/evaporação de solvente e tiveram suas características físico-químicas, estabilidade, liberação e atividade antifúngica avaliadas. O nanossistema obtido apresentou partículas homogêneas, com tamanho médio de $213,2 \pm 2,00$ nm, índice de polidispersividade de $0,044 \pm 0,04$ e potencial zeta de $-16,03 \pm 1,20$ mV, com perfeita estabilidade desses parâmetros por 30 dias a 4 °C. Uma excelente eficiência de encapsulação foi obtida, em torno de $93,3 \pm 0,10$ % e o perfil de liberação apresentado contou com uma liberação inicial rápida do peptídeo, aproximadamente 27% nas primeiras 24 horas, seguido de uma liberação sustentada por pelo menos 16 dias. Outro aspecto relevante é que as nanopartículas potencializaram a atividade antifúngica do peptídeo quando comparado à sua forma livre, em concentração equivalente, representando uma próspera abordagem terapêutica para a veiculação do Crotalicidina [15-34].

Palavras-chave: Nanopartículas. PLGA. Crotalicidina [15-34]. Antifúngicos.

ABSTRACT

Human fungal infections, in the form of topical infections or as systemic infections, have become a significant cause of morbidity. In addition, the antifungal agents normally used to treat these infections have shown limited therapeutic results due to toxic side effects, low efficacy and the emergence of resistant pathogens, making the development of new antifungal agents in the pharmaceutical area of great interest. In this sense, the present study aimed to develop an optimized formulation of PLGA (poly (lactic acid-co-glycolic acid)) nanoparticles to load the Ctn[15-34] peptide, a promising antifungal agent derived from a cathelicidin of the venom gland of the snake *Crotalus durissus terrificus*. The nanoparticles were synthesized by the double emulsion/solvent evaporation method and had their physicochemical characteristics, stability, release and antifungal activity evaluated. The obtained nanosystem presented homogeneous particles, with a mean size of 213.2 ± 2.00 nm, polydispersity index of 0.044 ± 0.04 and zeta potential of -16.03 ± 1.20 mV, with perfect stability of these parameters by 30 days at 4 °C. An excellent entrapment efficiency was obtained, around $93.3 \pm 0.10\%$ and the release profile showed a rapid initial release of the peptide, approximately 27% in the first 24 hours, followed by sustained release for at least 16 days. Another relevant aspect is that the nanoparticles potentiated the antifungal activity of the peptide when compared to its free form, in equivalent concentration, representing a thriving therapeutic approach for the delivery of Ctn[15-34].

Keywords: Nanoparticles. PLGA. Ctn[15-34]. Antifungals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	–	Estrutura tridimensional do peptídeo crotalicidina e dos seus fragmentos, Ctn[1-14] e Ctn[15-34].....	17
FIGURA 2	–	Representação esquemática de diferentes tipos de nanocarreadores usados para a veiculação de medicamentos.....	21
FIGURA 3	–	Hidrólise do PLGA.....	23
FIGURA 4	–	Visão esquemática do procedimento de emulsão dupla/evaporação de solvente para a produção de nanopartículas poliméricas carregadas com ativos hidrofílicos.....	24
FIGURA 5	–	Mecanismos de estabilização estérica e eletrostáticas de partículas dispersas.....	27
FIGURA 6	–	Desenho do estudo.....	34
GRÁFICO 1	–	Distribuição percentual dos tamanhos de NP-CF-Ctn[15-34] recém formuladas em triplicata.....	42
GRÁFICO 2	–	Curva de calibração de CF-Ctn[15-34], por fluorescência, e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação linear.....	43
GRÁFICO 3	–	Liberção cumulativa <i>in vitro</i> do CF-Ctn[15-34] das nanopartículas de PLGA em meio PBS (pH7,4).....	44
GRÁFICO 4	–	Atividade antifúngica de CF-Ctn[15-34] e NP-CF-Ctn[15-34] contra <i>Cryptococcus neoformans</i>	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estrutura primária e propriedades físico-químicas do peptídeo crotalicidina e dos seus fragmentos, Ctn[1-14] e Ctn[15-34].....	18
TABELA 2 – Peptídeos derivados de veneno veiculados em nanocarreadores para aplicação farmacêutica.....	30
TABELA 3 – Tamanho (nm) de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier® e Ultra-Turrax®) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).....	40
TABELA 4 – IPD de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier® e Ultra-Turrax®) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).....	40
TABELA 5 – Potencial zeta (mV) de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier® e Ultra-Turrax®) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).....	41
TABELA 6 – Características físico-químicas (tamanho de partícula, IPD e potencial zeta) de NP-CF-Ctn[15-34] avaliadas em diferentes tempos de armazenamento.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CF-Ctn[15-34]	Crotalidina fração [15-34] marcado com carboxifluoresceína
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
Ctn	Crotalidina
Ctn[1-14]	Crotalidina fração [1-14]
Ctn[15-34]	Crotalidina fração [15-34]
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EE%	Eficiência de encapsulação
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPD	Índice de Polidispersividade
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NP-CF-Ctn[15-34]	Nanopartículas carregadas com CF-Ctn[15-34]
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PVA	Álcool Polivinílico
PVAc	Poli(acetato de vinila)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Infecções fúngicas.....	14
2.2	Peptídeo Crotalidina.....	15
2.3	Peptídeos naturais como agentes terapêuticos.....	18
2.4	Nanotecnologia como estratégia para a veiculação de fármacos.....	20
2.4.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	20
2.4.2	<i>Nanopartículas poliméricas à base de PLGA.....</i>	21
2.4.2.1	<i>Definição e polímeros comumente utilizados.....</i>	21
2.4.2.2	<i>Estratégias de formulação.....</i>	23
2.4.2.3	<i>Avaliação físico-química.....</i>	25
2.4.2.4	<i>Aplicações terapêuticas de nanocarreadores.....</i>	28
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Desenho e local do estudo.....	34
4.2	Materiais e equipamentos.....	35
4.3	Pré-formulação de nanopartículas de PLGA não carregadas.....	35
4.4	Avaliação físico-química das nanopartículas não carregadas: Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta.....	36
4.5	Nanopartículas carregadas com peptídeo – NP-CF-Ctn[15-34].....	36
4.5.1	<i>Procedimento de preparo.....</i>	36
4.5.2	<i>Avaliação físico-química.....</i>	37
4.5.3	<i>Eficiência de encapsulação.....</i>	37
4.5.4	<i>Perfil de liberação in vitro.....</i>	38
4.5.5	<i>Atividade antifúngica.....</i>	38
4.6	Processamento e análise dos dados.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Pré-formulação de nanopartículas de PLGA não carregadas.....	40
5.2	Nanopartículas carregadas com peptídeo – NP-CF-Ctn[15-34].....	41

5.2.1	<i>Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta</i>	41
5.2.2	<i>Eficiência de encapsulação</i>	42
5.2.3	<i>Perfil de liberação in vitro</i>	43
5.2.4	<i>Atividade antifúngica</i>	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas representam atualmente uma ameaça contínua e séria para a saúde humana. Os indivíduos estão vulneráveis cotidianamente a uma série de infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas causadas por fungos, que podem variar desde infecções do pé e das unhas até doenças disseminadas (GUPTA; SHARMA; CHAUHAN, 2017). As últimas duas décadas testemunharam um aumento da incidência dessas infecções, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados (SAWANT; KHAN, 2017).

Atualmente, quatro classes principais de agentes antifúngicos (azóis, equinocandinas, polienos e análogos da pirimidina) são usadas por via oral, tópica ou intravenosa para o tratamento de infecções fúngicas, além da classe das alilaminas e outros compostos (CAMPOY; ADRIO, 2017). Apesar do potencial terapêutico, muitos desses agentes têm apresentado resultados limitados, em virtude de efeitos colaterais tóxicos, baixa eficácia e surgimento de patógenos resistentes (WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013). Mesmo com o aumento da incidência de infecções fúngicas e das restrições dos antifúngicos existentes, apenas alguns novos agentes terapêuticos foram introduzidos nos últimos anos (CIOCIOLA et al., 2016). Tais condições ressaltam a importância da busca por novos compostos e novos alvos antifúngicos, juntamente com o aprimoramento das formulações existentes, a fim de se alcançar melhorias da terapia atual (SOUZA; AMARAL, 2017).

A descoberta de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de ocorrência natural despertou crescente atenção na busca por novos agentes antifúngicos devido às suas propriedades únicas (CIOCIOLA et al., 2016) como atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa tendência de induzir resistência microbiana (ALMAAYTAH et al., 2017). O peptídeo Crotalidina (Ctn) é um PAM promissor do grupo das catelicidinas recentemente descrito, oriundo da glândula de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Esse peptídeo e especialmente a sua fração Ctn[15-34] demonstraram excelente atividade contra bactérias, fungos, e também células tumorais. Essa fração, inclusive, reduziu a toxicidade do Ctn contra células eucarióticas saudáveis, ao passo que a fração Ctn[1-14] perdeu as propriedades terapêuticas do peptídeo original. Assim, Ctn[15-34] surge como o peptídeo mais interessante derivado do Ctn, mais até que este próprio, do ponto de vista terapêutico, podendo vir a ser uma estratégia atraente aos agentes antifúngicos convencionais (FALCAO

et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2016).

Apesar de promissores, os PAMs têm aplicação terapêutica limitada em virtude de sua baixa biodisponibilidade, suscetibilidade à degradação de proteases e potencial toxicidade. A veiculação desses compostos utilizando nanotecnologia pode representar uma abordagem inovadora para superar esses impedimentos, com capacidade de minimizar a toxicidade dos peptídeos em células de mamíferos, protegendo-os de proteólise e de interações indesejadas com fluidos biológicos, e assegurando uma liberação controlada e duradoura das moléculas carregadas (SANDRESCHI et al., 2016). A eficácia de agentes antimicrobianos também pode ser melhorada quando estes agentes são nanocarreados (ZAZO; COLINO; LANAO, 2016).

Recentemente, vários PAMs foram incorporados em diferentes formas de nanoestruturas. Entre estas, as nanopartículas poliméricas representam a aplicação mais comum e são consideradas como a abordagem mais promissora para a veiculação terapêutica desses peptídeos (ALMAAYTAH et al., 2017), em especial as nanopartículas poliméricas à base de poli (ácido láctico-co-glicólico), o PLGA (ALLAHYARI; MOHIT, 2016). Este polímero tem ganhado importante destaque para aplicação biológica devido a sua biodegradabilidade, segurança e biocompatibilidade, além de ser um dos poucos polímeros sintéticos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico humano (VYSLOUŽIL et al., 2014).

Neste cenário, levando em conta o impacto das infecções fúngicas no mal-estar e na saúde humana, a necessidade de se ampliar cada vez mais o arsenal de possibilidades terapêuticas contra essas doenças, a excelente atividade antifúngica já documentada de Ctn[15-34] e todas as vantagens das nanopartículas poliméricas para veiculação de peptídeos bioativos, o presente trabalho visa desenvolver e avaliar a atividade antifúngica de nanopartículas de PLGA carregadas com Ctn[15-34]. Bons resultados já foram obtidos com a incorporação de diversos peptídeos e proteínas em nanocarreadores, mas nenhum desses achados trata do carregamento do peptídeo Ctn ou de seus derivados. Assim, hipotetizou-se que Ctn[15-34] poderia ser eficientemente incorporado em nanopartículas de PLGA e teria suas propriedades terapêuticas melhoradas. É a primeira vez que essa abordagem é realizada e avaliada para esse peptídeo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções fúngicas

No início dos anos 90 foi relatado um aumento do número de infecções graves causadas por fungos patogênicos e oportunistas (GUPTA; SHARMA; CHAUHAN, 2017). As infecções fúngicas acometem o ser humano na forma de infecções tópicas da pele e das membranas mucosas ou, mais seriamente, como infecções invasivas e sistêmicas de órgãos internos. Estima-se que cerca de 20 a 25% da população humana sofram de micoses superficiais, estas infecções fazem parte das principais razões para visitas de pacientes a dermatologistas. Além disso, infecções fúngicas invasivas pode ser uma causa significativa de morbidade e mortalidade em pessoas imunocomprometidas. Estima-se que o número de mortes resultantes de infecções fúngicas invasivas seja de um milhão e meio de pessoas por ano (SOLIMAN, 2017). Essas infecções tendem a ocorrer mais frequentemente como infecções oportunistas em pacientes com um sistema imunológico enfraquecido, como pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, diabetes mellitus ou leucemia, ou em pacientes que receberam terapia imunossupressora ou quimioterapia (QIU et al., 2015).

Além da relevante morbidade e mortalidade causada por essas doenças, elas também estão associadas a custos médicos diretos e substanciais que impõem uma carga econômica considerável ao sistema de saúde. Nos Estados Unidos, o custo total estimado das hospitalizações por doenças fúngicas em 2014 foi de US \$ 4,6 bilhões. Especificamente, 84% dos custos totais e 48% das hospitalizações por infecções por *Candida* foram devido à candidíase invasiva. Pacientes com infecções invasivas incorrem em custos adicionais, passam por internações mais longas e têm taxas de mortalidade mais altas do que pacientes semelhantes sem essas doenças. Já as consultas ambulatoriais custaram cerca de US \$ 2,7 bilhões, sendo que mais da metade delas foram devido a infecções por dermatófitos (4.981.444 consultas), resultando em um custo nacional de US \$ 821 milhões. É possível ainda que esses resultados subestimem seus verdadeiros custos, porque eles são subdiagnosticados (BENEDICT et al., 2018).

As infecções superficiais são especialmente causadas por espécies de *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon* e *Hortae*, que infectam o epitélio queratinizado, os folículos capilares e o aparelho ungueal (KAUSHIK; PUJALTE; REESE, 2015). Enquanto que as infecções invasivas são frequentemente causadas por patógenos de levedura, como *Candida* e

Cryptococcus, fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Fusarium* ou *Mucor*, ou menos frequentemente fungos dimórficos, incluindo *Coccidioides*, *Blastomyces* ou *Histoplasma* (CHANG et al., 2017).

Atualmente, alguns tipos de fármacos, como os polienos (anfotericina B, nistatina), azóis (clotrimazol, miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol), equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina), análogos da pirimidina (flucitosina) e outros, estão disponíveis para tratar as diversas infecções causadas por fungos (KAUSHIK; PUJALTE; REESE, 2015; CARMONA; LIMPER, 2017). No entanto, essas substâncias têm várias desvantagens em termos de toxicidade, espectro de atividade, segurança e propriedades farmacocinéticas (CAMPOY; ADRIO, 2017). Devido a esses fatores, tem-se procurado melhorar o tratamento utilizando diferentes abordagens, tais como obtenção de efeito sinérgico, através da combinação de agentes antifúngicos, desenvolvimento de novas formulações e utilização de carreadores nanoparticulados. Reduzir a toxicidade, aumentar a biodisponibilidade, melhorar o espectro antifúngico e combater a resistência são esforços que devem aumentar a eficácia dos antifúngicos disponíveis, à medida que novos compostos e novos alvos antifúngicos são identificados (SCORZONI et al., 2017).

Os resultados terapêuticos limitados, em especial o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos atuais, têm levado grandes esforços ao desenvolvimento de novos fármacos, com diferentes mecanismos de ação que alvejem a biossíntese de proteínas, lipídios e a parede celular de fungos. Historicamente, a abordagem mais comum para a identificação de moléculas antifúngicas tem sido rastrear grandes bibliotecas de pequenas moléculas sintéticas ou produtos naturais. De fato, duas classes de fármacos antifúngicos aprovados, equinocandinas e polienos, foram descobertas por triagem de produtos naturais (CAMPOY; ADRIO, 2017).

2.2 Peptídeo Crotalicidina

Um conjunto promissor de compostos que poderia formar a base para uma nova classe de agentes terapêuticos são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Trata-se de peptídeos que estão presentes naturalmente no sistema de defesa dos organismos vivos, dotados de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. Esses compostos exercem seu efeito antimicrobiano principalmente por romper membranas biológicas, levando à despolarização, lise e morte celular. Os PAMs são geralmente pequenos (10 a 50

aminoácidos), catiônicos (carga total de +2 a +9) e possuem vários resíduos hidrofóbicos para facilitar sua interação nas membranas lipídicas (WANG et al., 2015). Porém, outros mecanismos de ação ainda permanecem discutíveis. Estudos recentes apontaram que os PAMs poderiam ainda atuar sobre alvos intracelulares, tais como em ácidos nucleicos e/ou na síntese proteica, e em organelas, como as mitocôndrias, onde a apoptose poderia ser iniciada. Assim, devido o amplo espectro de atividade e menor probabilidade de induzir resistência, a aplicação prospectiva terapêutica de peptídeos antimicrobianos tem recebido grande atenção, visando torná-los uma alternativa atraente aos antibióticos convencionais (CAVALCANTE et al., 2016).

Diversos peptídeos antimicrobianos já foram encontrados em uma gama de animais como abelhas, formigas, escorpiões, caracóis marinhos, serpentes, aranhas, lacraias e vespas, e juntos somam cerca de 170 compostos ativos contra bactérias, fungos, protozoários, e/ou vírus, com potência considerável e concentração inibitória mínima (CIM) suficientemente baixa. Um fator limitante para muitos desses peptídeos é a ação inespecífica em outros sistemas biológicos, podendo apresentar atividade hemolítica em doses específicas, por exemplo, necessitando de estratégias adicionais para torná-los viáveis para a terapia antimicrobiana (PRIMON-BARROS; JOSÉ MACEDO, 2017).

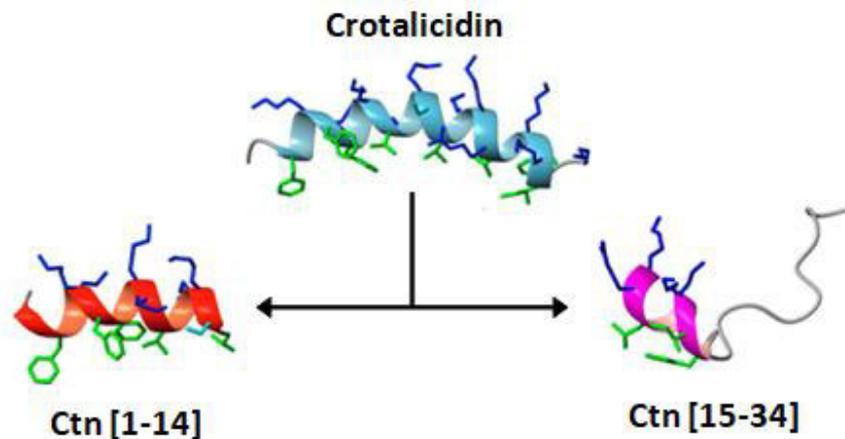
As catelicidinas estão entre os integrantes mais importantes dos PAMs. Encontram-se distribuídos em diversas espécies animais, desde lampreias primitivas aos seres humanos, e possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana. O LL37 é o único peptídeo antimicrobiano da família das catelicidinas identificado em humanos até agora. Precursores dessa classe foram relatados em glândulas de veneno de serpentes da América do Sul. Esses precursores, denominados coletivamente viperidinas, foram deduzidos por análise de bibliotecas de cDNA de glândulas do veneno, sintetizadas e testadas contra bactérias, mostrando excelente atividade especialmente contra espécies Gram-negativas (FALCAO et al., 2014).

Uma dessas viperidinas, o peptídeo Crotalidina (Ctn), oriundo do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, apresentou atividade antibacteriana bastante efetiva contra cepas padrões e clínicas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, com a CIM muitas vezes inferior a do antibiótico gentamicina, utilizado como controle no teste. O peptídeo Ctn também teve sua atividade antitumoral comprovada, mas, por outro lado, demonstrou toxicidade também contra fibroblastos e eritrócitos humanos limitando o potencial terapêutico desse peptídeo

(FALCAO et al., 2015).

Para melhor explorar as regiões minimamente bioativas, o Ctn teve sua estrutura dissecada em dois fragmentos denominados Ctn[1-14] e Ctn[15-34] (Figura 1). Os fragmentos foram preparados como C-terminal carboxamidas e, assim como o peptídeo original, foram obtidos por síntese em fase sólida com alta pureza (> 95% por HPLC - High Performance Liquid Chromatography) e com características estruturais (tabela 1) e atividades biológicas distintas. Mesmo mantendo a estrutura α -helicoidal do Ctn, o Ctn[1-14] perdeu a atividade antibacteriana e anticancerígena do peptídeo original. Por outro lado, o fragmento Ctn[15-34], apesar de ter mais de 40% de redução de tamanho em relação ao Ctn, manteve as propriedades antibacterianas, apresentando um perfil antimicrobiano apenas ligeiramente inferior ao do peptídeo original, e novamente melhor que o controle gentamicina em termos de CIM contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Streptococcus pyogenes*. O Ctn[15-34] também manteve as propriedades anticancerígenas e, além disso, reduziu a toxicidade do Ctn contra células eucarióticas saudáveis (FALCAO et al., 2015).

Figura 1 – Estrutura tridimensional do peptídeo crotalícidina e dos seus fragmentos, Ctn[1-14] e Ctn[15-34]



Fonte: Adaptado de Falcão et al. (2015).

Cavalcante et al. (2016) também avaliaram a atividade antifúngica de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] contra diferentes leveduras oportunistas e cepas de dermatófitos. O Ctn foi o peptídeo mais ativo contra dermatófitos e novamente mais tóxico para células eucarióticas, confirmando sua baixa seletividade. Já os fragmentos, especialmente o

Ctn[15-34], foram menos tóxicos e mais ativos contra leveduras, porém o Ctn[1-14] apresentou apenas uma atividade anti-levedura intermediária. A citotoxicidade contra células renais humanas e a atividade hemolítica do Ctn[15-34] foram inferiores, inclusive, que a da anfotericina B, um importante antifúngico usado na clínica, compensando a atividade anti-levedura levemente mais baixa do peptídeo comparado a esse antibiótico. Destaca-se também a atividade sinérgica entre esses peptídeos e a anfotericina B, com consequente redução da CIM de ambos, fármaco e peptídeo, especialmente do Ctn[15-34].

Tabela 1 – Estrutura primária e propriedades físico-químicas do peptídeo crotalicidina e dos seus fragmentos, Ctn[1-14] e Ctn[15-34]

Peptídeo	Sequência ^a	Massa Molecular ^b	Pureza ^c	Carga ^d	Hidrofobicidade, H ^e	Momento Hidrofóbico, μH^e
Crotalicidin (Ctn)	KRFKKFFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	4151,41 (4151,39)	98%	+ 16	0,263	0,440
Ctn [1-14]	KRFKKFFKKVKKSV	1797,30 (1797,31)	96%	+9	-0,012	0,763
Ctn [15-34]	KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	2371,10 (2371,11)	98%	+8	0,455	0,311

Fonte: Adaptado de Falcão et al. (2015).

^aasterisco (*) indica locais de clivagem putativos de elastase (http://web.expasy.org/peptide_cutter/). Peptídeos são amidas C-terminais. ^bDeterminado por LC-MS. Massa teórica, entre parênteses, de (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-propertycalculator.asp>). ^cPor HPLC analítico. ^dEm pH neutro, de (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-propertycalculator/peptide-property-calculator.asp>). ^eA partir de (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

Assim, do ponto de vista terapêutico, Ctn[15-34] acaba por ser o peptídeo mais interessante derivado do Ctn, mais até que este próprio, com propriedades anti-infecciosas e antitumorais promissoras, além de ser menos tóxico para células saudáveis. O principal mecanismo estudado do Ctn[15-34] envolvido na atividade antifúngica contra cepas clínicas e padrões de *C. albicans* foi a ruptura da membrana celular da levedura, confirmada por vazamento de lactato desidrogenase e biomarcadores de morte celular mediada por necrose. Outros mecanismos também podem estar envolvidos, mas ainda não foram abordados (CAVALCANTE et al., 2017).

2.3 Peptídeos naturais como agentes terapêuticos

Proteínas e peptídeos terapêuticos são muito atraentes do ponto de vista

farmacêutico, devido a sua alta potência e seletividade (SANTALICES et al., 2017). Mais de 7.000 peptídeos que ocorrem naturalmente foram identificados, e estes frequentemente têm papéis cruciais na fisiologia humana, incluindo atuações como hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, ligantes de canal iônico ou agentes anti-infecciosos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Porém, isso reflete apenas uma pequena parte da diversidade química presente nesses organismos, estima-se que há muito potencial ainda para ser aproveitado (KING, 2011). Os peptídeos podem representar uma fonte ilimitada de estruturas únicas para o design racional de novos compostos terapêuticos, podendo ser utilizados sozinhos, em sinergia com fármacos existentes, ou conjugados a outros compostos (CIOCIOLA et al., 2016).

Fármacos derivados de peptídeos ou proteínas animais já foram aprovados pela FDA para o tratamento de diversas condições médicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2 (exenatide – Byetta[®], derivado do veneno do mostro de gila *Heloderma suspectum*) (ROBINSON; SAFAVI-HEMAMI, 2017), hipertensão arterial (captopril, derivado do veneno da serpente *Bothrops jararaca*) (HORTA et al., 2016), distúrbios da hemostasia (tirofiban - Aggrastat[®], derivado do veneno de *Echis carinatus* (KOH; KINI, 2012), eptifibatide - Integrilin[®], derivado do veneno de *Sistrurus miliarius barbouri* (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011), e bivalirudin - Hirulog[®], derivado da saliva da sanguessuga medicinal *Hirudo medicinalis* (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018) e dor crônica (ziconotide – Prialt[®], derivado do veneno do caracol marinho *Conus magus*) (SADEGHI et al., 2017). Vários outros peptídeos animais estão atualmente em desenvolvimento pré-clínico ou em estudos clínicos e têm potencial para tratar uma gama de outras condições clínicas, dentre elas o câncer, acidente vascular cerebral e doença autoimune (ROBINSON et al., 2017).

Apesar do alto potencial do desenvolvimento de peptídeos como novos fármacos, uma série de limitações acompanham esses compostos, dificultando o processo de convertê-los em agentes terapêuticos. Estabilidade baixa, meia vida curta e biodisponibilidade oral reduzida são algumas dessas barreiras (YE; CHI, 2018). A toxicidade muitas vezes também pode ser um fator limitante para peptídeos derivados de veneno (SAHA et al., 2014), e essa característica já foi responsável pela descontinuação do estudo de muitas dessas substâncias (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018). Uma estratégia promissora que vêm sendo desenvolvida para contornar esses inconvenientes é a incorporação dessas moléculas em nanocarreadores. Estas plataformas de liberação são capazes de superar as limitações e aumentar a eficácia e utilidade de compostos peptídicos (JALLOUK et al., 2015).

2.4 Nanotecnologia como estratégia para a veiculação de fármacos

2.4.1 Aspectos gerais

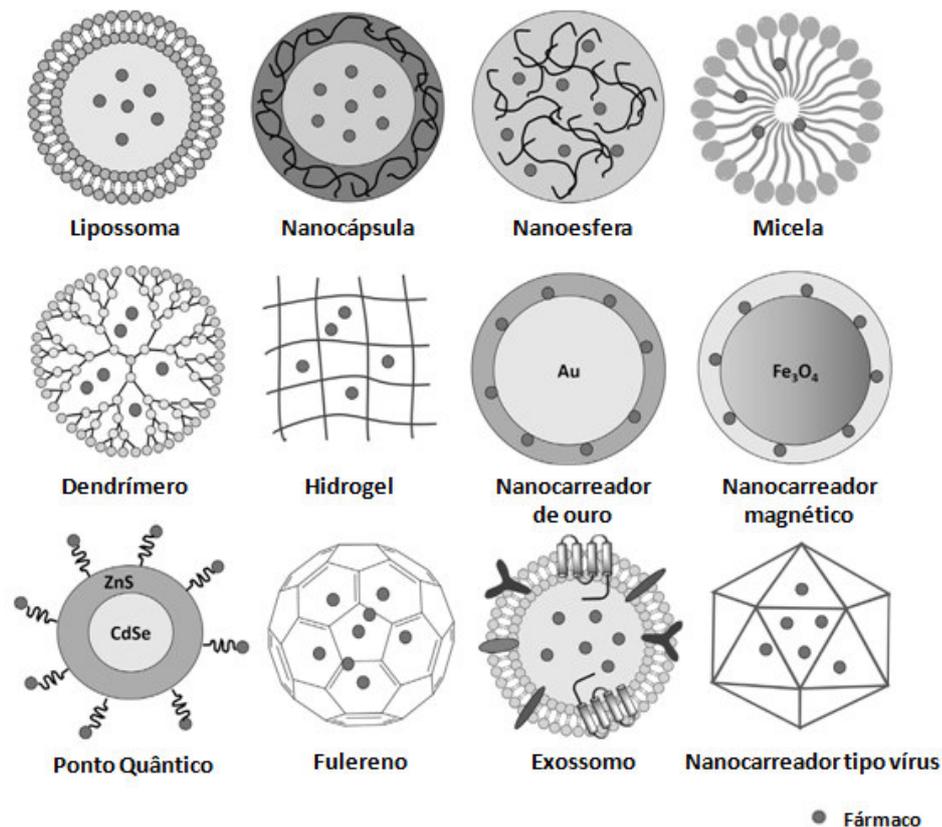
A nanotecnologia é definida como o desenho, caracterização, produção e aplicação de materiais, dispositivos e sistemas cuja forma e tamanho se encontram em nanoescala (RAMSDEN, 2018). Numerosas definições de nanomateriais foram propostas por várias organizações governamentais, industriais e de padronização. Essas definições são frequentemente inconsistentes em seus elementos e escopo, o que pode levar a confusão na determinação se um material é ou não considerado um nanomaterial. Por convenção, 1 a 100 nm é a faixa de tamanho mais comumente usada em referência a nanomateriais, mas não há linha que demarque claramente a nanoescala de uma perspectiva química ou biológica. A extremidade superior de 100 nm é um corte arbitrário, pois o comportamento dependente do tamanho dos materiais não começa ou encerra abruptamente a 100 nm. Muitas propriedades características da nanoescala, como a solubilidade, a dispersão da luz e os efeitos da área de superfície, são características previsíveis e contínuas dos materiais a granel. Em uma tentativa de incluir todas as características importantes, algumas autoridades expandiram a faixa superior da nanoescala para bem mais além de 100 nm (BOVERHOF et al., 2015).

A nanotecnologia pode ser muito útil no direcionamento de medicamentos e na terapêutica para prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Nanocarreadores têm sido extensivamente estudados como sistemas de liberação não só de fármacos convencionais, mas também são capazes de transportar outras moléculas terapêuticas, como peptídeos, proteínas, anticorpos, ou até mesmo ácidos nucleicos (SOUSA et al., 2019). Esses sistemas são atrativos especialmente em virtude de apresentarem tamanho submicrônico e elevada área de superfície em relação ao volume. Tais características conferem diferenças-chave em comparação com materiais convencionais, incluindo alterações nas propriedades bioquímicas, magnéticas, ópticas e eletrônicas (CHEN; RIVIERE, 2016), resultando também em propriedades diferenciadas na entrega de fármacos (LEE; YUN; PARK, 2015).

Diferentes variedades de nanocarreadores, compostos de vários tamanhos, formas e excipientes, com numerosas substâncias químicas e propriedades já foram formulados (AKHTAR; VERMA; PATHAK, 2015). Lipossomas, micelas, nanocarreadores poliméricos

(nanocápsulas e nanoesferas), dendrímeros, hidrogéis, nanocarreadores metálicos, pontos quânticos, nanocarreadores cerâmicos, nanocarreadores à base de carbono, exossomos e vírus (SOUSA et al., 2019), além de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), são exemplos de carreadores nanotecnológicos já estudados para veiculação de fármacos (WILCZEWSKA et al., 2012), alguns deles ilustrados a seguir (Figura 2). Nessas estruturas as substâncias ativas podem ser carregadas aprisionadas no interior da matriz, distribuída nesta e/ou fixadas na superfície (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Figura 2 – Representação esquemática de alguns tipos de nanocarreadores usados para a veiculação de medicamentos



Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2019).

2.4.2 Nanopartículas poliméricas à base de PLGA

2.4.2.1 Definição e polímeros comumente utilizados

Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas têm

se destacado como plataformas de veiculação de agentes terapêuticos. Essas estruturas podem ser distinguidas em dois tipos principais: nanocápsulas e nanoesferas (Figura 2). As nanocápsulas se caracterizam por uma estrutura vesicular que atua como reservatório para os ativos carreados, em que estes permanecem no núcleo líquido aquoso ou não aquoso, envoltos pela camada polimérica solidificada. Por outro lado, as nanoesferas se apresentam como uma massa sólida esférica de polímero em que os ativos estão dispersos em toda a matriz polimérica, tanto no núcleo da partícula como adsorvido à sua superfície (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

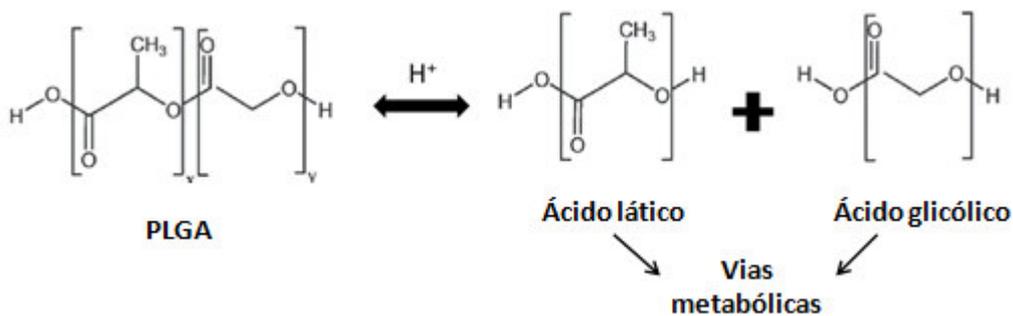
As nanopartículas poliméricas são formadas por polímeros como poli(ácido láctico) (PLA), PLGA, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), quitosana, alginato ou gelatina (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2015). Destes, o PLGA é o que mais tem se destacado no desenvolvimento de medicamentos. Este polímero pode conferir características de liberação prolongada às formulações, é passível de modificações na sua superfície favorecendo interações biológicas eficazes, protege fármacos da degradação, pode alcançar órgãos ou células específicas e sobre ele há preparações bem descritas e abordagens de síntese de acordo com vários tipos de fármacos, desde moléculas pequenas hidrofílicas ou hidrofóbicas a macromoléculas (MIR; AHMED; REHMAN, 2017).

O PLGA é um copolímero sintético composto por monômeros de ácido glicólico (ácido 2- hidroxietanóico) e ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico). É biodegradável, biocompatível e aprovado pela FDA e pela European Medicines Agency (EMA) para sistemas de veiculação de fármacos. Em meio aquoso, o PLGA é submetido à hidrólise de suas ligações éster (Figura 3), resultando em um grupo OH e um grupo COOH por cada ligação hidrolisada (MIR; AHMED; REHMAN, 2017). Estes fragmentos resultantes são ainda degradados para produzir novamente ácido láctico e ácido glicólico, derivados também biodegradáveis e não tóxicos, que são biologicamente inertes para as células em crescimento e são eliminados do corpo através de vias metabólicas comuns, tornando esse material um candidato atraente para utilização em nanomedicina (YE; CHI, 2018).

A razão molar dos componentes individuais dos monômeros (lactídeo e glicolídeo) na cadeia polimérica influencia diretamente muitas propriedades do PLGA, tais como grau de cristalinidade, resistência mecânica, comportamento de intumescimento, temperatura de transição vítrea e capacidade de hidrólise. Neste sentido, a fim de se alcançar resultados específicos, várias marcas de PLGA estão disponíveis em diferentes proporções de ácido láctico e ácido glicólico, a exemplo, 50:50, 65:35, 75:25, 85:15. Estruturas baseadas em

PLGA têm sido extensivamente estudadas para a veiculação de uma grande variedade de agentes terapêuticos, incluindo macromoléculas (como fatores de crescimento humanos, peptídeos, genes, antígenos, etc.) e fármacos comparativamente menores (hidrofílicos ou hidrofóbicos) (MIR; AHMED; REHMAN, 2017). A substância ativa pode ser incorporada às nanopartículas de duas formas, através da sua adição no momento da produção, ou pela sua absorção/adsorção após a síntese, incubando a nanoestrutura com uma solução concentrada da substância (KUMAR et al., 2017).

Figura 3 – Hidrólise do PLGA



Fonte: Adaptado de Noviendri (2014).

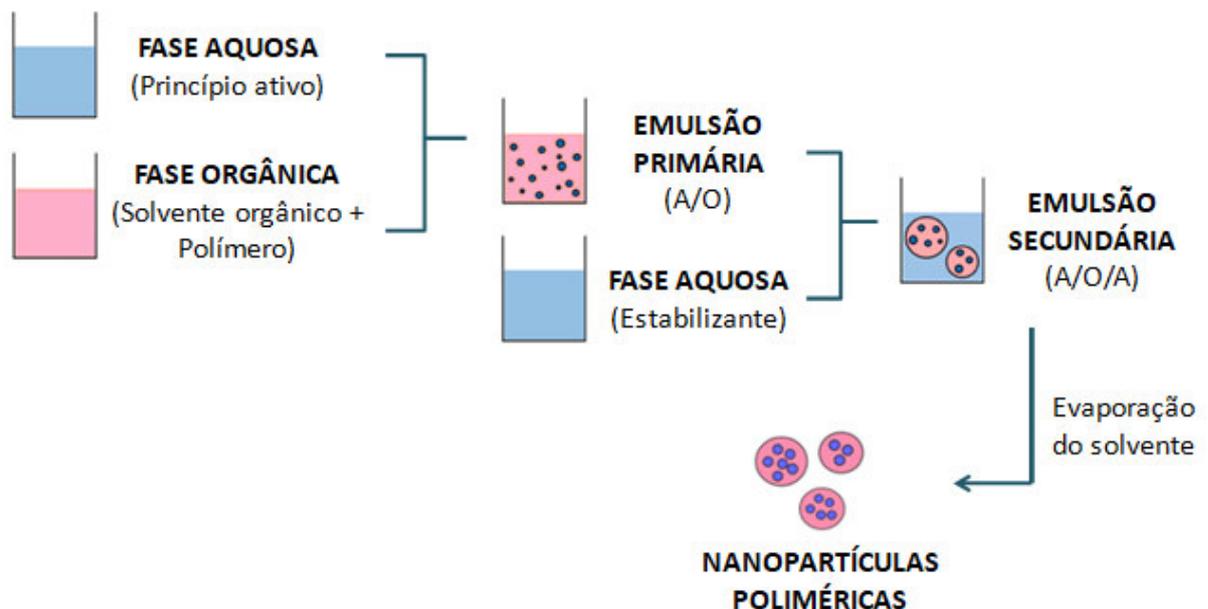
2.4.2.2 Estratégias de formulação

Nanopartículas poliméricas podem ser formulados a partir de diversos tipos de materiais e metodologias, sendo preferidos aqueles biocompatíveis e com reduzido potencial para induzir toxicidade aos sistemas biológicos (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Os métodos, em geral, são divididos em duas categorias principais, bottom-up e top-down. A primeira baseia-se em uma abordagem construtiva, em que as nanoestruturas são formadas a partir da união de substâncias menores e mais simples. Já a outra, ao contrário, consiste numa abordagem destrutiva, na qual substâncias maiores são quebradas em menores e convertidas em nanoestruturas (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Assim, procedimentos como emulsão/evaporação de solvente, nanoprecipitação, salting-out, tecnologia de fluido supercrítico e diálise podem ser utilizados para formular nanopartículas a partir de polímeros pré-formados. Por outro lado, utilizando mecanismos como polimerização radical controlada, emulsão, emulsão livre de surfactante, miniemulsão, microemulsão e polimerização interfacial, nanopartículas são formados pela polimerização de monômeros menores (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

De modo geral, o método ideal produziria nanopartículas com uma distribuição de tamanho estreita e com população unimodal, alta taxa de incorporação do fármaco, capacidade de controlar o conteúdo de fármaco de forma eficaz em uma ampla faixa, e relativa facilidade de produção de partículas (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007).

Se tratando do carregamento de fármacos altamente hidrofílicos, como peptídeos e proteínas, o método de emulsão dupla/evaporação do solvente é um dos mais adequados, aplicável tanto em escala de laboratório como industrial (MOHAMMADI-SAMANI; TAGHIPOUR, 2014). Também conhecido como método A/O/A, esta estratégia confere maior proteção e maior eficiência de encapsulação a peptídeos e proteínas (CHEREDDY et al., 2014, IQBAL et al., 2015). No procedimento (Figura 4), uma solução aquosa contendo o ativo é emulsionada em uma fase orgânica contendo um polímero, como o PLGA. A seguir uma nova emulsão é formada adicionando a emulsão primária à uma solução aquosa contendo um agente estabilizante/surfactante, formando a emulsão dupla, seguida da evaporação do solvente orgânico (SHARMA et al., 2016). Os dois processos de emulsificação requerem o uso de fontes de alta energia (homogeneização, sonicação ou vortex de alta velocidade no caso de pequenos volumes) (SANTALICES et al., 2017).

Figura 4 – Visão esquemática do procedimento de emulsão dupla/evaporação de solvente para a produção de nanopartículas poliméricas carregadas com ativos hidrofílicos



Fonte: Adaptado de Pagels e Prudhomme (2015).

Os surfactantes são amplamente utilizados durante a formulação de sistemas de

liberação de fármacos nanoparticulados, pois estabilizam as emulsões formadas durante a síntese de partículas, impedem a agregação das mesmas, além de influenciar diversos outros aspectos dessas estruturas. O álcool polivinílico (PVA) é um estabilizante comumente utilizado para a preparação de sistemas poliméricos biodegradáveis. Apresenta um excelente perfil de segurança e fornece reprodutibilidade e controle sobre a estabilidade, tamanho e distribuição de tamanho e encapsulamento do fármaco (YANG et al., 2014).

O PVA é obtido por polimerização via radical livre do acetato de vinila, resultando em poli(acetato de vinila) (PVAc), seguido por um processo de hidrólise dos grupos acetato localizados ao longo de cadeias. Devido ao fato de que essa reação nem sempre é completa, o PVA pode ser obtido com diferentes graus de hidrólise, de parcialmente até totalmente hidrolisado (TEODORESCU; BERCEA; MORARIU, 2019). Atualmente, encontram-se disponíveis PVAs de diferentes composições, com diferentes percentuais de hidrólise, os quais, dependendo de sua estrutura e mistura estereoquímica, influenciam em propriedades específicas do produto final, refletindo na capacidade de absorção de água e disposição da estrutura tridimensional do produto (ALCÂNTARA et al., 2010).

Nanopartículas com diferentes características podem ser obtidas através da variação de diversos parâmetros do processo de formulação, tais como o tipo e a concentração do polímero, o estabilizante e a sua concentração utilizada, o tipo e o volume do solvente orgânico, a concentração do fármaco na fase aquosa interna, o instrumento e o tempo utilizado para unir as fases, além da forma de evaporação do solvente (CRUCHO; BARROS, 2017). Alterando o método de síntese ou funcionalizando a superfície, por exemplo, é possível projetar nanocarreadores sob medida para alcançar propósitos específicos da administração de medicamentos (DING; LI, 2017).

2.4.2.3 Avaliação físico-química

Atualmente, não existem metodologias padronizadas ou protocolos da FDA ou de outros órgãos regulatórios para a caracterização de nanocarreadores. No entanto, é bem conhecido que as interações fisiológicas dessas estruturas dependem diretamente das suas propriedades físico-químicas (CRUCHO; BARROS, 2017). Após a administração em um sistema biológico, ou descarga no meio ambiente, o destino e o impacto desses nanomateriais serão determinados por suas interações com as moléculas circundantes (CHEN; RIVIERE, 2016). É imprescindível, então, entender características como tamanho, propriedades de

superfície, estabilidade, capacidade de incorporação e de liberação dos fármacos, já que esses fatores podem influenciar diretamente o comportamento desses compostos (LIN et al., 2014, KUMAR et al., 2017). Além disso, é muito importante ter uma compreensão da reprodutibilidade e escalabilidade do processo de fabricação (BOBO et al., 2016).

O tamanho é um fator crucial que regula a circulação de nanoestruturas na corrente sanguínea, penetração através de barreiras biológicas, direcionamento a locais específicos e indução de respostas celulares (LIN et al., 2014), sendo o parâmetro mais importante para avaliar a capacidade de captação celular e transporte *in vivo*. No geral, nanopartículas esféricas de tamanho na faixa de 200 nm são capazes de ser internalizadas pelas células, ao contrário de nanopartículas maiores, que exigem maior energia para a captação celular (ZHAO et al., 2016).

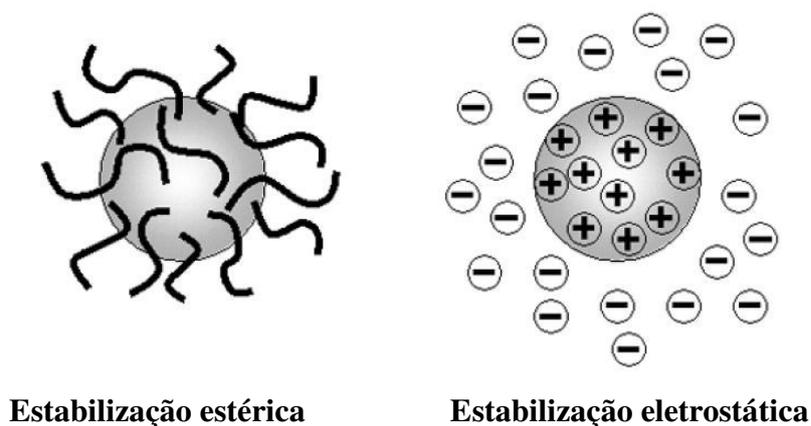
Além do tamanho, a distribuição do tamanho das partículas também é uma propriedade importante, determinada pelo índice de polidispersividade (IPD) (FECZKÓ et al., 2011b). Seu valor numérico varia de 0,0 a 1,0, para uma amostra perfeitamente uniforme ou altamente dispersa, respectivamente. Para nanopartículas poliméricas, valores de IPD iguais ou menores a 0,2 são considerados satisfatórios (DANAEI et al., 2018). O tamanho das partículas é altamente dependente do tipo de instrumento e energia aplicada durante a mistura das fases orgânica e aquosa. Adicionalmente, a concentração do polímero e o tipo e quantidade de estabilizantes adicionados à formulação podem afetar a distribuição do tamanho de partícula (SANTALICES).

Outra característica a considerar é a propriedade de superfície das partículas. A maioria delas adquire uma carga elétrica de superfície quando posta em contato com um meio aquoso, devido, principalmente, à dissolução de íons e à ionização de grupos na sua superfície. Essa carga superficial influencia a distribuição de íons presentes no meio aquoso, ou seja, íons de carga oposta à da superfície, denominados de contra íons, são atraídos em direção à superfície da partícula. O resultado é a formação de uma dupla camada elétrica. As duas partes da dupla camada estão separadas por um plano, o plano de Stern. Além dos íons na camada de Stern, certa quantidade de solvente também estará ligada aos íons e à superfície carregada. Essa camada solvatante é mantida junto à superfície, e as bordas dessa camada, chamada de superfície ou plano de cisalhamento, representam a fronteira de movimento relativo entre o sólido e o líquido. O potencial neste plano de cisalhamento é chamado de potencial zeta, ζ , ou potencial eletrocinético (AULTON, 2005). Esta medida expressa a diferença potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido ligado à

partícula dispersa, sendo usualmente medido em milivolt (mV) (HONARY; ZAHIR, 2013a). Dependendo do polímero e da modificação da superfície, podem ser alcançados valores de potencial zeta positivos, neutros ou negativos (DANHIER et al., 2012).

O potencial zeta é frequentemente utilizado para prever a estabilidade coloidal de partículas carregadas em suspensão. Um alto valor absoluto de potencial zeta resultará em repulsão eletrostática suficiente entre as partículas, reduzindo a aglomeração, e, portanto, aumentando a estabilidade coloidal das suspensões. Valores acima de 30 mV são geralmente necessários para prover uma estabilização eletrostática satisfatória, embora a estabilização estérica possa suplementar uma estabilização eletrostática relativamente baixa (NUCHUCHUA et al., 2017). Na estabilização estérica, polímeros do revestimento da partícula são suficientes para manter as partículas separadas por repulsões estéricas entre as camadas de polímero, nessas separações as forças de van der Waals são muito fracas para fazer com que as partículas adiram (Figura 5) (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2017). A carga superficial também pode ter efeito na ligação de partículas a receptores e na penetração de barreira fisiológicas (LIN et al., 2014). Além disso, pode ser usada para determinar se um material ativo incorporado encontra-se no centro da nanopartícula ou na superfície (SARAVANAN et al., 2017).

Figura 5 – Mecanismos de estabilização estérica e eletrostática de partículas dispersas



Fonte: Malvern Instruments Limited (2017).

Outra característica, a eficiência de encapsulação (EE%), é definida pela concentração do material incorporado (o princípio ativo, por exemplo) sobre a concentração inicial usada do mesmo para fazer a formulação. Assim, quanto maior a EE%, maior é a

quantidade de fármaco retida nas nanopartículas (PIACENTINI, 2016). É um fator importante, do ponto de vista terapêutico, mas principalmente do ponto de vista econômico, especialmente quando o agente ativo é caro, como os fármacos proteicos (FECZKÓ et al., 2011a).

Quanto às características de liberação, nanopartículas de PLGA podem apresentar uma ou mais fases de liberação dos ativos incorporados (mono-, bi-, ou trifásica, por exemplo). A primeira é a fase de liberação rápida inicial, seguida de uma segunda fase de liberação sustentada. Uma terceira fase pode também estar presente, constituída por uma liberação rápida adicional após a segunda fase de liberação lenta (XU et al., 2016). A liberação inicial é principalmente controlada por difusão, dando lugar à degradação/erosão no final do período de liberação (ALLAHYARI; MOHIT, 2016). A taxa na qual o fármaco é liberado depende da sua solubilidade, expulsão ou difusão através da matriz do sistema, bem como da degradação dessa matriz ou da combinação de ambos os processos de degradação e difusão (KUMAR et al., 2017).

Vários fatores estão relacionados às mudanças no perfil de liberação de nanopartículas de PLGA. Substâncias hidrofílicas, por exemplo, devido à sua maior solubilidade em água, são liberadas inicialmente de maneira mais rápida quando comparadas a substâncias hidrofóbicas. Da mesma forma, a taxa de degradação e a liberação do fármaco aceleram com a redução do peso molecular do PLGA (XU et al., 2016). Copolímeros de PLGA com alto teor de ácido láctico são menos hidrofílicos e, por isso, degradam mais lentamente. A degradação mais rápida está relacionada a polímeros com uma proporção 50:50 de ácidos láctico e glicólico quando comparado a outras proporções (SWIDER et al., 2018). Partículas maiores possuem uma liberação inicial menor do que as partículas menores, isso por que à medida que o tamanho das partículas aumenta, o comprimento do caminho de difusão também aumenta, influenciando negativamente a taxa de liberação. Fatores relacionados ao ambiente, como pH, temperatura, força iônica, sais, surfactantes e outros, também podem influenciar a taxa de liberação das substâncias incorporadas (ALLAHYARI; MOHIT, 2016).

2.4.2.4 Aplicações terapêuticas de nanocarreadores

A incorporação em nanocarreadores pode solucionar muitos problemas da veiculação de agentes terapêuticos em formulações convencionais e, conseqüentemente,

impulsionar o desenvolvimento de novos medicamentos. As vantagens incluem a melhora da solubilidade e biodisponibilidade de compostos ativos, da capacidade de atravessar barreiras biológicas (RIZVI; SALEH, 2018), e também da estabilidade e vida útil dessas substâncias, além de propiciar a liberação prolongada de compostos, reduzindo a quantidade diária administrada e, potencialmente, os efeitos tóxicos. Outro aspecto considerável é a possibilidade do uso de vias de administração não invasivas, que seriam inviáveis para determinadas substâncias livres, contribuindo positivamente para a adesão do paciente ao tratamento (JAIN, 2017).

As nanopartículas podem ser administradas no corpo humano através de diferentes vias possibilitando administração oral, pulmonar, tópica, parenteral, além da injeção intravenosa (ZHAO et al., 2016). Estudos já reportam a utilidade das nanoestruturas para uma diversidade de aplicações clínicas tais como melhora da eficácia da terapia antimicrobiana (ZAZO; COLINO; LANA, 2016) e da terapia anticancerígena (JURJ et al., 2017), capacidade de ultrapassagem de fármacos pela barreira hematoencefálica (SARAIVA et al., 2016) e melhora da terapia gênica (CHEN, J. et al., 2016) e do tratamento da trombose vascular (RASHID; AHMAD; TAJUDDIN, 2019).

Referindo-se especificamente à incorporação de peptídeos e proteínas, os nanocarreadores podem conferir propriedades adicionais e benéficas à utilização dessas moléculas como agentes terapêuticos, auxiliando na redução da degradação *in vivo*, no aumento do tempo de meia-vida, na liberação controlada e no direcionamento a alvos biológicos, melhorando assim a segurança e a eficácia da terapia. A nanotecnologia também tem propiciado a administração de proteínas por rotas alternativas e mais atrativas como a via oral, nasal, pulmonar e transdérmica. (YU et al., 2016). Diversos nanocarreadores já foram desenvolvidos para carrear essas moléculas. Algumas formulações orais de peptídeos, inclusive, já se encontram disponíveis no mercado ou em pesquisa clínica, dentre elas, uma nanoemulsão de ciclosporina (Neoral[®]) para prevenção da rejeição de órgãos após transplante e lipossomas de insulina para tratamento do diabetes mellitus, respectivamente (SANTALICES et al., 2017).

Além das vantagens já destacadas, peptídeos derivados de venenos, especificamente, como os PAMs e outros, podem se beneficiar adicionalmente da nanotecnologia pela redução da toxicidade em sistemas biológicos saudáveis (JALLOUK et al., 2015). Diversos peptídeos derivados de venenos foram veiculados em nanocarreadores a fim de se alcançar essas e outras melhorias como mostra a tabela 2, reforçando a utilidade

dessa abordagem para o aproveitamento dessas moléculas com finalidade terapêutica.

Tabela 2 – Peptídeos derivados de veneno veiculados em nanocarreadores para aplicação farmacêutica (continua)

Peptídeo/ Atividade biológica	Nanocarreador	Vantagens	Referências
Exendin 4/ Agonista do receptor do GLP-1	Nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da permeação transmembranar <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. • Sistema potencial para administração oral. 	WANG et al., 2012
	Nanopartículas lipídicas	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da captação e do transporte celular <i>in vitro</i>. • Capacidade de transporte através do epitélio intestinal <i>in vivo</i>. • Efeito hipoglicêmico em camundongos diabéticos. • Sistema potencial para administração oral. 	CHEN et al., 2015
Neurotoxina/ Efeito analgésico	Nanopartículas de PLA modificadas com quitosana	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema para administração intranasal. • Melhora do transporte do peptídeo ao cérebro através da barreira hematoencefálica. 	ZHANG et al., 2013
Melittina/ Atividade citotóxica e antitumoral	Nanopartículas de Perfluorocarbono	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial para atenuar a infectividade do HIV. • Redução da toxicidade contra espermatozoides e células de epitélio vaginal <i>in vitro</i>. 	HOOD et al., 2012; JALLOUK et al., 2014
		<ul style="list-style-type: none"> • Manutenção do efeito antitumoral. • Redução da hemólise <i>in vitro</i>. • Redução de sinais de toxicidade <i>in vivo</i>. • Aumento do tempo de meia vida da melittina. 	SOMAN et al., 2009
	Nano-lipossomas com poloxamer 188	<ul style="list-style-type: none"> • Manutenção da atividade antitumoral. • Redução da toxicidade <i>in vivo</i>. 	MAO et al., 2017

Tabela 2 – Peptídeos derivados de veneno veiculados em nanocarreadores para aplicação farmacêutica (conclusão)

Peptídeo/ Atividade biológica	Nanocarreador	Vantagens	Referências
TsAP-1/ Atividade citólítica e antitumoral	Nanocompostos de micelas de núcleo rígido polimérico	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da atividade antitumoral. 	MISRA; SCHWARTZ- DUVAL; PAN, 2017
NKCT1/ Atividade antitumoral	Nanopartículas de ouro	<ul style="list-style-type: none"> • Potencialização do efeito antitumoral. • Redução da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. 	SAHA et al., 2014; BHOWMIK et al., 2017
	Nanopartículas de ouro peguiladas.	<ul style="list-style-type: none"> • Potencialização do efeito antitumoral 	BHOWMIK et al., 2013
Bothrops – II/ Atividade leishmanicida	Lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade seletiva contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> com redução da toxicidade contra a célula hospedeira. 	DE BARROS et al., 2016
CID-85/ Atividade Antitumoral	Nanopartículas de alginato de sódio	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da toxicidade contra células tumorais <i>in vitro</i>. • Diminuição da toxicidade contra células normais. 	MORADHASELI et al., 2013; MIRAKABADI; MORADHASELI , 2013

Fonte: Dados da pesquisa. GLP-1 (glucagon-like peptide-1)

A eficácia de agentes antimicrobianos também pode ser melhorada quando esses agentes são veiculados em nanoestruturas. Tanto nanocarreadores inorgânicos quanto orgânicos foram capazes de aumentar a atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica e antiparasita de diferentes tipos de fármacos (ZAZO; COLINO; LANA, 2016). A entrega de nanopartículas para o local da infecção pode ser alcançada por modificação da superfície com ligantes direcionados ou pela responsividade do microambiente, ambos podem melhorar ainda mais a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos antimicrobianos (ZHU et al., 2014). Ativamente, as nanopartículas podem ser direcionadas através da adição de ligantes (por exemplo, anticorpos) que se conectam a receptores (por exemplo, antígenos) em locais de infecção, de modo que doses mais altas de fármacos possam ser administradas no local infectado, superando assim os mecanismos de resistência existentes com menos

efeitos adversos ao paciente. As nanopartículas também podem dirigir-se a sítios de infecção passivamente, através do extravasamento nesses locais, onde a inflamação levou ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Além disso, a ação antimicrobiana das nanopartículas pode ser ativada por certos estímulos, como espécies reativas de oxigênio ou baixo pH no local da infecção (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Nesta perspectiva, a nanotecnologia tem se tornado uma estratégia interessante para melhorar a eficácia de antifúngicos tradicionais, permitindo alcançar menor toxicidade e melhor biodistribuição e direcionamento de fármacos, com resultados promissores *in vitro* e *in vivo*. O exemplo mais bem sucedido é o Ambisome®, uma formulação lipossômica, onde a anfotericina B está inserida numa bicamada lipossômica unilamelar de cerca de 45-80 nm. Essa formulação apresenta menor toxicidade e permanece em altos picos na circulação, com alta biodistribuição, em relação à formulação convencional. Para contornar problemas de toxicidade, foram desenvolvidas também outras formulações lipídicas carregadas com anfotericina B, incluindo, complexos lipídicos (Abelcet®) e dispersões coloidais (Amphocil®/Amphotech®) (SOUZA; AMARAL, 2017).

Todas essas vantagens têm estimulado cada vez mais a incorporação de fármacos em nanocarreadores, a fim de se progredir com o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes (JURJ et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a atividade antifúngica de nanopartículas de PLGA carregadas com o peptídeo Ctn[15-34].

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas de PLGA carregadas com o peptídeo Ctn[15-34];
- Avaliar os aspectos físico-químicos e, a partir destes, avaliar também a estabilidade das nanopartículas obtidas;
- Avaliar a eficiência de encapsulação do peptídeo;
- Avaliar o perfil de liberação do peptídeo;
- Demonstrar através de testes *in vitro* a atividade antifúngica do peptídeo incorporado às nanopartículas.

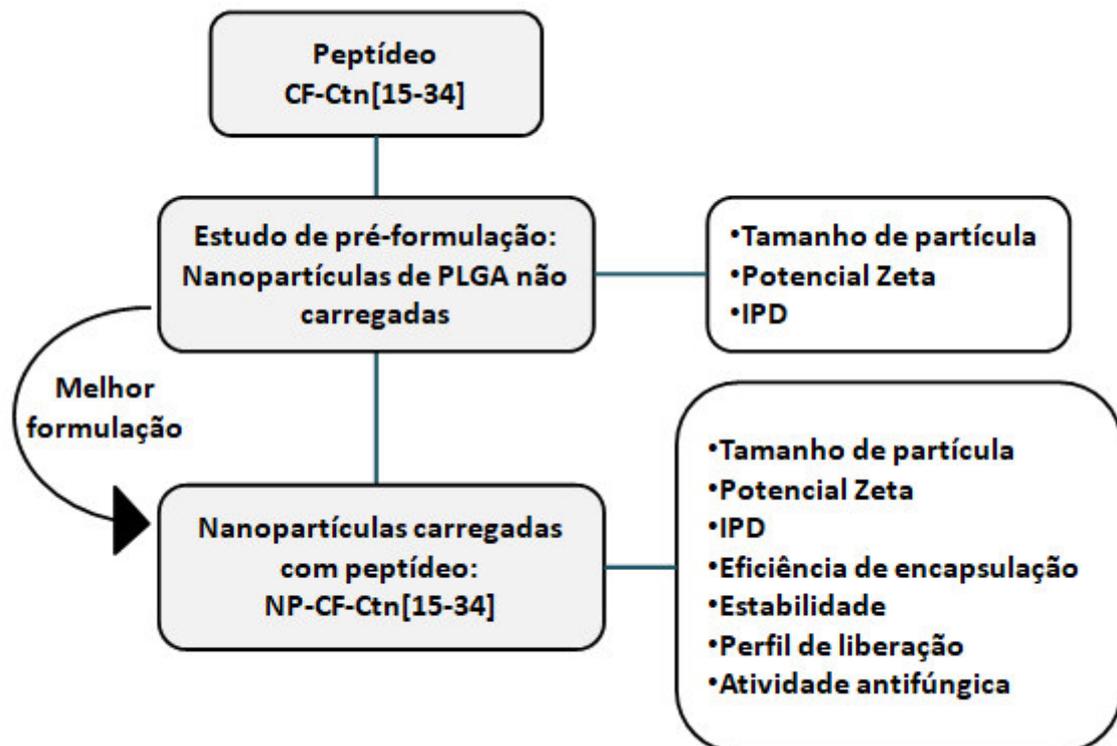
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e local do estudo

O trabalho desenvolvido foi do tipo experimental, realizado na Universidade Federal do Ceará - no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia (MarMoBio Lab) do Instituto de Ciências do Mar; no Laboratório de Cosmetologia e no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; e no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.

Inicialmente foi realizado um estudo de pré-formulação a fim de se desenvolver uma formulação de nanopartículas de PLGA com características físico-químicas otimizadas para só então carrear o peptídeo Ctn[15-34]. A partir daí as nanopartículas carregadas com o peptídeo foram sintetizadas e avaliadas quanto aos seus aspectos físico-químicos e em relação à estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e atividade antifúngica (Figura 6).

Figura 6 – Desenho do estudo



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Materiais e equipamentos

Para realização dos ensaios foram utilizados os seguintes materiais: Peptídeo Ctn[15-34] sintético marcado com carboxifluoresceína – CF-Ctn[15-34] – cadastrado sob número A1D1ACF (Patrimônio Genético/CTA - MMA, Conselho de gestão), PLGA 50:50 (Purasorb® 5004, Corbion Purac), PVA 87-89% hidrolisado (Mw 13,000-23,000) e PVA 98-99% hidrolisado (Mw 31,000-50,000) (Sigma-Aldrich), água ultrapura (sistema de purificação de água Simplicity®, Millipore®), diclorometano (Neon), dispositivo de filtração/centrifugação Amicon® Ultra-15 100 KDa (Millipore®), meio de cultura RPMI 1640, cepa clínica de *Cryptococcus neoformans* cedida pelo hospital São José (Ceará, Brasil) e BacTiter-Glo™ (Promega). Os equipamentos utilizados foram Ultra-Turrax® T-25 IKA, Sonifier® Branson, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®), centrífuga 5810 R (Eppendorf), liofilizador Savant MicroModulyo, espectrofotômetro, e leitor de microplacas de multidetecção Synergy HT (BioTek).

4.3 Pré-formulação de nanopartículas de PLGA não carregadas

Diante dos diferentes materiais e equipamentos disponíveis para formular nanopartículas poliméricas, um estudo de pré-formulação foi realizado combinando dois tipos de PVAs e dois equipamentos distintos na preparação de nanopartículas não carregadas (sem ativo ou peptídeo) a fim de se escolher aqueles que produzissem nanoestruturas com melhores características físico-químicas e utilizá-las para carrear o peptídeo CF-Ctn[15-34] numa formulação otimizada.

As nanopartículas não carregadas foram preparadas por um método de emulsão dupla/evaporação de solvente (A/O/A) modificado de Geng et al. (2011) e Chereddy et al. (2014). Assim, 100µl de água ultrapura foram adicionados a 5 ml de uma solução de PLGA a 2% em diclorometano e emulsionados por homogeneização à alta velocidade em equipamento Ultra-Turrax® T-25 IKA (15.000 RPM / 2min.) ou por sonicação em equipamento Sonifier® Branson (50% de amplitude / 15 seg. em banho de gelo) formando a primeira emulsão, do tipo A/O. Depois, esta emulsão foi adicionada a 10 ml de uma solução aquosa contendo 1% de PVA 87-89% hidrolisado ou de PVA 98-99% hidrolisado e novamente homogeneizada em Ultra-Turrax® (24.000 RPM / 5min.) ou em Sonifier®, nas mesmas condições utilizadas anteriormente, formando assim a emulsão final, do tipo A/O/A. Posteriormente, as

formulações foram deixadas sob agitação durante a noite para evaporação do solvente resultando nas nanopartículas em suspensão.

4.4 Avaliação físico-química das nanopartículas não carregadas: Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta

Após o preparo, as nanopartículas não carregadas foram avaliadas físico-quimicamente pela determinação do tamanho de partícula, IPD e potencial zeta. O tamanho de partícula e o IPD das amostras foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano-S90 (Malvern Instruments®, UK), que mede a variação da intensidade da luz dispersa ao longo do tempo para determinar o coeficiente de difusão e o diâmetro hidrodinâmico de esfera equivalente média de partículas em suspensão (NUCHUCHUA et al., 2017). O potencial zeta foi determinado pelo mesmo equipamento e equivale à carga superficial das partículas em suspensão. Para tanto, as nanodispersões foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:1000 (v/v) e analisadas em triplicata a um ângulo fixo de 90° a 25 °C.

Os melhores resultados das nanopartículas não carregadas, isto é, menores valores de tamanho de partícula e IPD, e maiores valores em módulo de potencial Zeta, foram utilizados para escolher os melhores parâmetros de produção e formular nanopartículas otimizadas com o peptídeo, já que estas características físico-químicas são de fundamental importância para determinar a qualidade e entender o comportamento das nanoestruturas (KUMAR et al., 2017).

4.5 Nanopartículas carregadas com peptídeo – NP-CF-Ctn[15-34]

4.5.1 Procedimento de preparo

Para preparar NP-CF-Ctn[15-34] foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3 utilizando os parâmetros de produção escolhidos. Assim, 330µg de CF-Ctn[15-34] foram dissolvidos na água utilizada para formar a primeira emulsão e prosseguiu-se com os demais passos descritos. Ao final, as nanopartículas foram coletadas do meio utilizando um dispositivo de ultrafiltração/centrifugação Amicon® Ultra-15 100 kDa. Os filtrados foram utilizados para quantificar o peptídeo livre, que não foi incorporado às nanopartículas, e

calcular indiretamente a eficiência de encapsulação. O peptídeo livre possui massa molecular de apenas 2,37 kDa e, portanto, não é retido pelo filtro.

4.5.2 Avaliação físico-química

A análise do tamanho de partícula, IPD e potencial zeta foi realizada também para NP-CF-Ctn[15-34], conforme método descrito no item 4.4, no tempo zero, logo depois do preparo das nanopartículas, e após 30 e 60 dias de armazenamento em suspensão aquosa a 4°C, para confirmar as boas condições físico-químicas do sistema e sua estabilidade nessas condições de armazenamento.

4.5.3 Eficiência de encapsulação

A concentração de CF-Ctn[15-34] incorporado às nanopartículas foi determinada indiretamente por quantificação da fluorescência em leitor de microplacas de multidetecção Synergy HT (BioTek), com comprimentos de ondas de excitação e emissão máximos fixados em 485 nm e 525 nm, respectivamente. Para isso, foi determinada a fluorescência emitida por 50 µl de CF-Ctn[15-34] em solução aquosa nas concentrações de 12,5 µM (33,75µg/ml) a 0,78 µM (2,12 µg/ml) obtidas por diluições seriadas. Com as fluorescências obtidas foi construída uma curva de calibração de CF-Ctn[15-34]. Após a separação da suspensão de NP-CF-Ctn[15-34], por meio de ultrafiltração/centrifugação, foi quantificada a fluorescência de 50 µl do filtrado obtido e a concentração do peptídeo livre, não incorporado, foi determinada utilizando a curva de calibração elaborada previamente. Posteriormente, a eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada através da equação 1.

$$E.E \% = \frac{(CPI - CPL)}{CPI} \times 100 \quad (1)$$

Onde: CPI corresponde à concentração teórica de peptídeo adicionada inicialmente à formulação e CPL é a concentração do peptídeo livre, não incorporado às nanopartículas após o processo de produção.

4.5.4 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação do peptídeo incorporado às nanopartículas de PLGA foi determinado por análise *in vitro* ao longo de um período de 16 dias, adaptando uma metodologia descrita anteriormente por Chereddy et al. (2014). Assim sendo, 30 mg de NP-CF-Ctn[15-34] liofilizadas foram dispersos em 3 ml de tampão fosfato-salino (PBS) e mantidos sob agitação à temperatura ambiente durante todo o ensaio. Após 1 hora, e após 1, 2, 5, 7, 9 e 16 dias o sobrenadante (1 ml) foi recolhido do meio através de ultrafiltração/centrifugação e a mesma quantidade de PBS foi adicionado ao meio de liberação. A quantidade de CF-Ctn[15-34] liberado nos tempos determinados, presente nos sobrenadantes, foi determinada por fluorescência como descrito previamente e descritos como percentual cumulativo do peptídeo liberado em função do tempo.

4.5.5 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi mensurada através da determinação da viabilidade de células de levedura, após incubação com as amostras testadas, por um ensaio metabólico adaptado de Cavalcante et al. (2016), que utiliza ATP das leveduras para liberar luz com o uso da enzima luciferase e seu substrato luciferina. Neste ensaio sensível, o sinal luminescente registrado é proporcional à quantidade de ATP presente, e ao número de células viáveis em cultura.

Assim, a cepa teste de *Cryptococcus neoformans* foi inoculada em ágar Sabouraud e incubada a 30°C por 48h para se atingir a fase de crescimento exponencial, ideal para o teste. A seguir, foi preparada uma suspensão do inóculo em meio de cultura RPMI com turbidez ajustada em espectrofotômetro a 550 nm equivalente a escala de McFarland 0,5 (contendo 2×10^6 UFC/ml). As suspensões de levedura (100 µl) foram adicionadas a 100 µl de CF-Ctn[15-34] e NP-CF-Ctn[15-34] em microtubos, alcançando concentrações finais abaixo da CIM, equivalente a 5 µM (13,5 µg/ml). Após 48 h de incubação a 30 °C, 50 µl de cada um desses tratamentos foram transferidos, em triplicatas, para poços de placas de microtitulação de 96 poços e, em seguida, 50 µl do reagente BacTiter-Glo (Promega) foram adicionados a cada poço, para avaliar a viabilidade fúngica, e as placas foram reincubadas durante 15 min à temperatura ambiente com agitação suave. A luminescência foi então medida em um leitor de microplacas de multidetecção Synergy HT (BioTek). O efeito de nanopartículas não

carregadas sobre o fungo também foi avaliado. Suspensões do inóculo sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média da viabilidade relativa (%), com o fungo não tratado representando 100% de viabilidade.

4.6 Processamento e análise dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média ou média \pm desvio padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e para comparações de médias utilizou-se o teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Pré-formulação de nanopartículas de PLGA não carregadas

A metodologia utilizada permitiu a obtenção de nanopartículas de PLGA não carregadas utilizando a combinações de dois tipos de PVAs (87-89% hidrolisado e 98-99% hidrolisado) e dois equipamentos diferentes (Ultra-Turrax[®] e Sonifier[®]) para formar a emulsão dupla, resultando em quatro formulações. Os dados referentes ao tamanho médio de partícula (Tabela 3), IPD (Tabela 4) e potencial zeta (Tabela 5) dessas estruturas estão detalhados a seguir.

Tabela 3 – Tamanho (nm) de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier[®] e Ultra-Turrax[®]) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).

	Sonifier [®]	Ultra-Turrax [®]	Média
PVA 87-89% hidrolisado	223,4 ± 2,52 aA	231,1 ± 6,75 aA	227,25
PVA 98-99% hidrolisado	416,1 ± 1,42 bA	496,4 ± 13,67 bB	456,25
Média	319,75	363,75	

Fonte: Dados da pesquisa. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Como pode ser observado na Tabela 3, para a variável tamanho de partícula, o PVA menos hidrolisado (87-89%) produziu partículas significativamente menores (223,4 ± 2,52 e 231,1 ± 6,75 nm) em relação ao outro tipo de PVA (416,1 ± 1,42 e 496,4 ± 13,67 nm) independente do equipamento utilizado. O maior tamanho (496,4 ± 13,67 nm) foi obtido quando o PVA mais hidrolisado (98-99%) foi associado ao Ultra-Turrax[®], diferente estatisticamente de todos os outros tamanhos.

Tabela 4 – IPD de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier[®] e Ultra-Turrax[®]) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).

	Sonifier [®]	Ultra-Turrax [®]	Média
PVA 87-89% hidrolisado	0,130 ± 0,02 aA	0,180 ± 0,01 aB	0,1435
PVA 98-99% hidrolisado	0,157 ± 0,01 aA	0,377 ± 0,02 bB	0,2785
Média	0,155	0,267	

Fonte: Dados da pesquisa. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Na análise do IPD (Tabela 4), as nanopartículas formuladas em equipamento Sonifier[®] apresentaram os menores resultados ($0,130 \pm 0,02$ e $0,157 \pm 0,01$), independentes do tipo de PVA utilizado, em comparação ao uso do equipamento Ultra-Turrax[®], o qual resultou em valores de IPD mais elevados ($0,180 \pm 0,01$ e $0,377 \pm 0,02$), especialmente quando associado ao PVA mais hidrolisado.

Tabela 5 – Potencial zeta (mV) de nanopartículas não carregadas. Resultado da interação entre os fatores: Equipamentos (Sonifier[®] e Ultra-Turrax[®]) e PVAs com diferentes percentuais de hidrólise (87-89% e 98-99%).

	Sonifier [®]	Ultra-Turrax [®]	Média
PVA 87-89% hidrolisado	$-24,57 \pm 0,74$ aA	$-9,84 \pm 0,31$ aB	-17,205
PVA 98-99% hidrolisado	$-1,64 \pm 0,40$ bA	$-1,95 \pm 0,16$ bA	-1,795
Média	-13,105	-5,895	

Fonte: Dados da pesquisa. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Nanopartículas formuladas com o PVA menos hidrolisado apresentaram maiores valores, em módulo, de potencial zeta ($-24,57 \pm 0,74$ e $-9,84 \pm 0,31$ mV) que aquelas formuladas com o outro tipo de PVA ($-1,64 \pm 0,40$ e $-1,95 \pm 0,16$ mV), especialmente quando formuladas em equipamento Sonifier[®], cujo resultado ($-24,57$ mV $\pm 0,74$) foi maior em relação a todos os outros valores obtidos (Tabela 5).

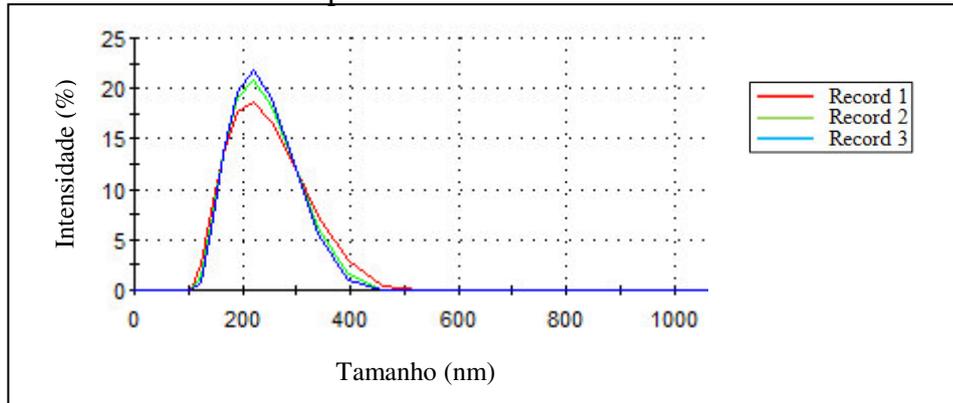
Além desses achados, apenas no processo de formulação em equipamento Ultra-Turrax[®] utilizando o PVA menos hidrolisado, houve formação e transbordamento de grande quantidade de espuma levando a perda de parte da formulação. Tendo em vista esses resultados, escolheu-se utilizar como estabilizante o PVA menos hidrolisado, com percentual de hidrólise de 87-89%, e o equipamento Sonifier[®] para a formulação de NP-CF-Ctn [15-34].

5.2 Nanopartículas carregadas com peptídeo – NP-CF-Ctn[15-34]

5.2.1 Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta

A metodologia utilizada para formular nanopartículas não carregadas também permitiu a obtenção de NP-CF-Ctn[15-34] utilizando as melhores condições encontradas no estudo de pré-formulação. As nanopartículas recém obtidas apresentaram tamanho dentro da faixa nanométrica, como mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1– Distribuição percentual dos tamanhos de NP-CF-Ctn[15-34] recém formuladas em triplicata



Fonte: Dados da pesquisa.

Para essa distribuição, o tamanho médio de partícula encontrado foi $213,2 \pm 2,00$ nm. E os valores de IPD e potencial zeta foram $0,044 \pm 0,04$ e $-16,03 \pm 1,20$ mV, respectivamente, como mostra a Tabela 6. Esta tabela também traz as mesmas características físico-químicas das nanopartículas após 30 e 60 dias de armazenamento em suspensão aquosa a 4°C.

Tabela 6 – Características físico-químicas (tamanho de partícula, IPD e potencial zeta) de NP-CF-Ctn[15-34] avaliadas em diferentes tempos de armazenamento

Características	Tempo de análise (dias)		
	zero	30	60
Tamanho de partícula (nm)*	$213,2 \pm 2,00$	$211,9 \pm 3,06$	$221,8 \pm 0,89$
Potencial zeta (mV)*	$-16,03 \pm 1,20$	$-14,66 \pm 0,55$	$-12,6 \pm 0,36$
IPD	$0,044 \pm 0,04$	$0,068 \pm 0,03$	$0,038 \pm 0,01$

Fonte: Dados da pesquisa. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3), *P < 0,05.

Como pode ser observado, o nanossistema se manteve estável, do ponto de vista físico-químico, pelo período de 30 dias, apresentando variações mínimas quando o armazenamento foi estendido para 60 dias. Essas variações incluíram um leve aumento do tamanho médio das partículas após 60 dias de armazenamento e uma ligeira redução, em módulo, do potencial zeta, em relação ao tempo zero. Para os valores de IPD não houve diferença estatística nos diferentes tempos de análise.

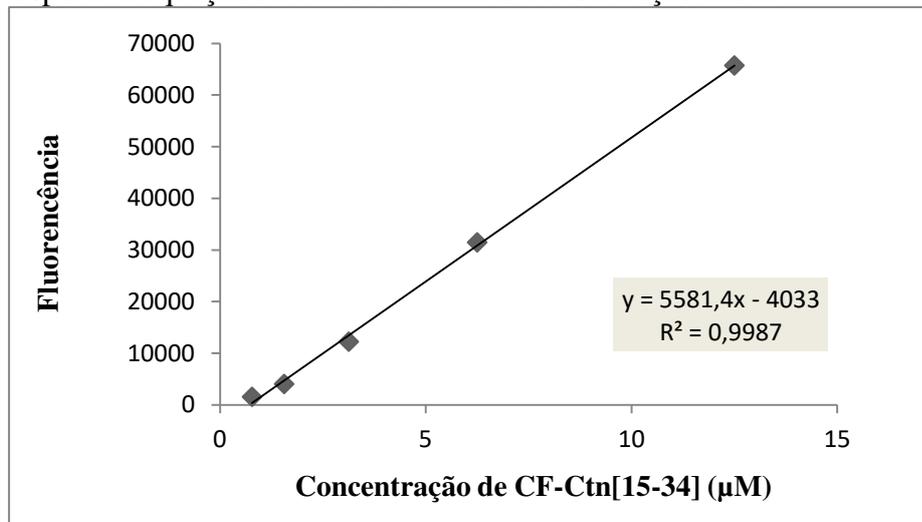
5.2.2 Eficiência de encapsulação

Para quantificar a EE% do peptídeo nas nanopartículas, inicialmente foi

construída uma curva de calibração da fluorescência emitida por CF-Ctn[15-34] em solução aquosa, em cinco diferentes concentrações (0,78, 1,56, 3,13, 6,25 e 12,5 μM), como mostra o gráfico 2. A equação da reta foi calculada e definida como $y = 5581,4x - 4033$, onde y é a fluorescência medida e x a concentração de CF-Ctn[15-34] em μM . O coeficiente de correlação linear (R^2) foi igual a 0,9987 indicando uma relação linear entre as variáveis na faixa de concentração analisada, ou seja, a variação observada na fluorescência foi decorrente da variação na concentração do analítico.

A curva de calibração foi utilizada para quantificar o teor de CF-Ctn[15-34] presente no filtrado das suspensões de nanopartículas, correspondente ao peptídeo não incorporado às nanopartículas. A concentração obtida foi de 0,8154 μM (2,20 $\mu\text{g/ml}$). Considerando a concentração inicial de 33 $\mu\text{g/ml}$ do CF-Ctn[15-34] em todo o nanossistema, a EE% foi dada pela equação 1 e o valor obtido foi $93,3 \pm 0,10\%$.

Gráfico 2 – Curva de calibração de CF-Ctn[15-34], por fluorescência, e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação linear.

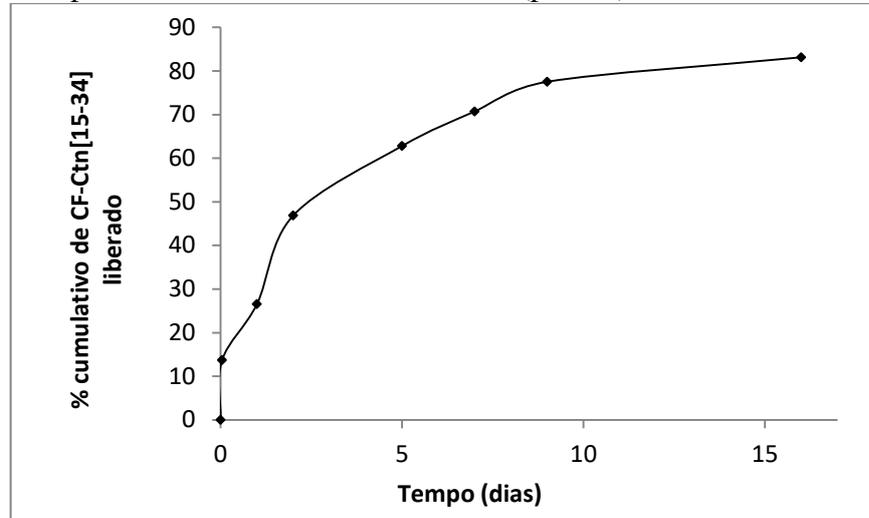


Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.3 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* de CF-Ctn[15-34] das nanopartículas foi medido durante 16 dias (gráfico 3). Aproximadamente 27% do peptídeo foi detectado no sobrenadante após o primeiro dia de ensaio, destes, 14% foram liberados logo na primeira hora do teste, indicando que houve uma liberação inicial rápida e uma liberação subsequente sustentada de CF-Ctn[15-34]. Cerca de 80% do peptídeo foi liberado até o último dia de ensaio.

Gráfico 3 – Liberação cumulativa *in vitro* do CF-Ctn[15-34] das nanopartículas de PLGA em meio PBS (pH 7,4)

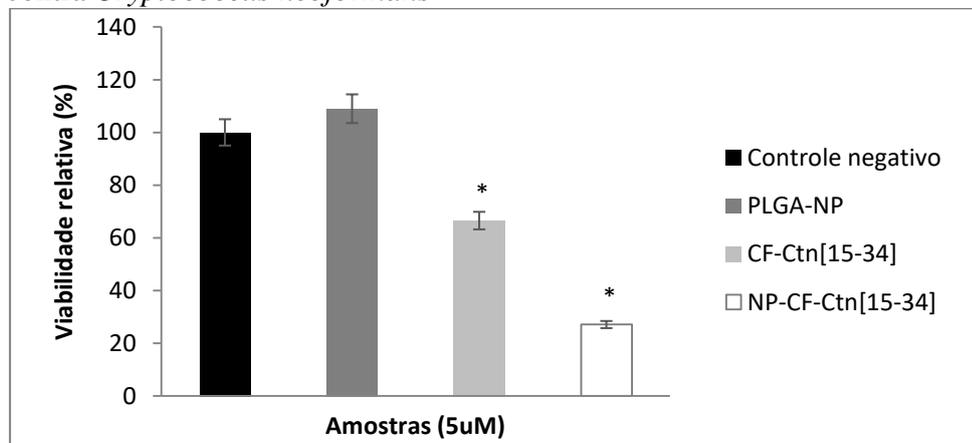


Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.4 Atividade antifúngica

Neste ensaio, foi avaliada a atividade antifúngica de CF-Ctn[15-34] e NP-CF-Ctn[15-34], a uma concentração abaixo da CIM, equivalente a 5 μ M (13,5 μ g/ml), pela redução da viabilidade de *Cryptococcus neoformans*. Os resultados são apresentados no Gráfico 4 como viabilidade relativa (em percentual), em que leveduras não tratadas foram utilizadas como controle negativo, correspondendo a 100% de viabilidade.

Gráfico 4 – Atividade antifúngica de CF-Ctn[15-34] e NP-CF-Ctn[15-34] contra *Cryptococcus neoformans*



Fonte: Dados da pesquisa. Controle negativo: leveduras não tratadas; PLGA-NP: Nanopartículas não carregadas; CF-Ctn[15-34]: Peptídeo livre; NP-CF-Ctn[15-34]: Nanopartículas carregadas com o peptídeo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). *Diferem significativamente entre si e em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey (P < 0,05).

As NP-CF-Ctn[15-34] foram capazes de reduzir em $73 \pm 4,68 \%$ a viabilidade do fungo, em comparação ao controle sem tratamento, contendo apenas o inóculo em meio de cultura. Enquanto que o CF-Ctn[15-34] apresentou apenas $33.5 \pm 7,81\%$ de redução da viabilidade fúngica em concentração equivalente. Observa-se que o peptídeo incorporado às nanopartículas foi mais eficaz em inibir o crescimento de *C.neoformans* comparado a sua forma livre neste ensaio. Nanopartículas não carregadas não apresentaram redução da viabilidade fúngica, pelo contrário, favoreceram o crescimento.

6 DISCUSSÃO

Os peptídeos naturais com atividade antifúngica encontram-se amplamente distribuídos na natureza e são excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (CIOCIOLA et al., 2016), especialmente através da veiculação desses compostos em formulações inovadoras que incorporam tecnologia em nanoescala, capazes de conferir propriedades diferenciadas e benéficas à utilização de peptídeos como agentes terapêuticos (BRANDELLI, 2012).

O método de emulsão dupla/evaporação de solvente é o método mais apropriado para encapsular peptídeos (IQBAL et al., 2015) em nanopartículas poliméricas e foi executado com sucesso no presente estudo, permitindo a obtenção de nanopartículas não carregadas (controle) e carregadas com CF-Ctn[15-34], peptídeo antimicrobiano fluorescente, que permitiu sua quantificação e determinação da eficiência de encapsulação, bem como a atividade antifúngica da nanoestrutura.

Do estudo de pré-formulação, quatro pré-formulações foram obtidas. Como critérios de escolha, foram avaliadas as características físico-químicas (tamanho de partícula, IPD e potencial zeta) das nanoestruturas obtidas. O efeito sobre o tamanho foi causado especialmente pelo tipo do PVA. Tendo o PVA menos hidrolisado (87-89%) resultado em menores tamanhos, com tamanho médio de partícula próximo a 200 nm, e, portanto, mais favoráveis. Enquanto que para o outro tipo de PVA, o mais hidrolisado (98-99%), as nanopartículas obtidas apresentaram tamanho médio acima de 400 nm. Já é sabido que o tamanho reduzido das partículas pode desempenhar um melhor papel *in vitro* e *in vivo*, em nível de absorção celular, por exemplo, e valores na faixa de 200 nm foram considerados adequados para essa finalidade (DERMAN et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

Acredita-se que no PVA mais hidrolisado, o maior número de hidroxilas presente leva à formação de ligações de hidrogênio mais fortes entre grupos hidroxilas intra e intermoleculares (ARANHA; LUCAS, 2001). O aumento do grau de hidrólise implica também em redução da solubilidade e aumento da resistência à água, da adesão às superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração (MANSUR; MANSUR, 2005). Esse aumento da resistência viscosa da mistura de emulsão pode ter sido responsável por absorver a energia de homogeneização que, por sua vez, levou à redução da tensão de cisalhamento, resultando em gotículas de maior tamanho (CRUCHO; BARROS, 2017). Tais fatores podem ter resultado nos maiores tamanhos das nanopartículas produzidas com o

PVA 98-99% hidrolisado. Tal ocorrência reforça a alegação de Yang et al. (2014), de que o PVA menos hidrolisado é um estabilizante mais eficiente para sintetizar partículas poliméricas.

Ainda relativo ao tamanho, para o PVA menos hidrolisado, especificamente, não houve diferença significativa entre os tamanhos das partículas produzidas pelos dois equipamentos utilizados, porém houve grande perda de material quando utilizado o Ultra-Turrax[®] com esse PVA, inviabilizando a associação. Enquanto isso, para o PVA mais hidrolisado, houve diferença entre os dois equipamentos, tendo a sonicação sido mais eficiente que a homogeneização a alta velocidade em reduzir o tamanho das partículas. Isso mostra que o efeito do aumento do percentual de hidrólise só foi limitante para este último equipamento, possivelmente em virtude da força aplicada neste caso, ao contrário da sonicação, não ter sido suficiente para superar a maior resistência do sistema provocada pelo PVA mais hidrolisado.

As técnicas de sonicação e homogeneização a alta velocidade são duas variações do método de emulsão dupla/evaporação de solvente. A irradiação ultrassônica é baseada na cavitação em dispersões aquosas causadas por ultrassom (SVILENOV; TZACHEV, 2014), enquanto que a homogeneização a alta velocidade leva ao aumento da intensidade da força de cisalhamento superando forças internas que atuam nas partículas (ARASOGLU et al., 2017). Devido às diferentes naturezas dessas técnicas, nanoestruturas com diferentes características também podem ser obtidas, conforme observado neste estudo.

O efeito sobre o IPD foi especialmente promovido pelo tipo de equipamento. O Sonifier[®] foi responsável pelos menores valores obtidos, em relação ao equipamento Ultra-Turrax[®], independente do tipo de PVA utilizado. Os valores obtidos estavam abaixo do limite de até 0,2, sendo considerados favoráveis e representativos de uma distribuição de tamanho homogênea segundo Danaei et al. (2018). Apesar de maior, o valor de IPD obtido da associação do Ultra-Turrax[®] com o PVA menos hidrolisado também estava dentro do limite aceitável, ao contrário da associação do mesmo equipamento com o PVA mais hidrolisado, cujo valor obtido caracteriza uma dispersão mais heterogênea, e, portanto, menos favorável.

Em relação ao potencial zeta, as formulações obtidas com PVA mais hidrolisado novamente tiveram os resultados menos favoráveis, com valores de potencial zeta bem próximos à zero. Enquanto que o PVA menos hidrolisado resultou em maiores valores, em módulo, especialmente quando associado ao equipamento Sonifier[®]. A carga negativa do potencial zeta é resultado da dissociação de grupos ácidos, oriundos do PLGA, na superfície

das partículas (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2017). Quanto mais distantes de zero forem os valores de potencial zeta, idealmente superiores a 30 mV (em módulo), melhor será a estabilização eletrostática do sistema, com menor possibilidade de haver agregação, devido à repulsão das cargas entre as partículas (LIN et al., 2014). Valores absolutos de 20 mV podem fornecer apenas estabilidade de curto prazo, e valores no faixa de -5 mV a +5 mV podem acarretar uma agregação rápida, porém, quando utilizados estabilizadores de maior massa molecular, que atuam principalmente por estabilização estérica, que foi o caso neste estudo, valores de apenas 20 mV ou inferiores podem fornecer estabilização suficiente (HONARY; ZAHIR, 2013b).

Diante do exposto, ficou evidenciado que formular nanopartículas de PLGA não carregadas com o estabilizante PVA menos hidrolisado (87-89%) e o equipamento Sonifier® possibilita a obtenção de menores tamanhos de partícula e IPD, maiores valores, em módulo, de potencial zeta e melhor aproveitamento da formulação, sendo esta escolhida como a melhor das combinações testadas e utilizada para incorporar o peptídeo CF-Ctn[15-34].

Utilizando os parâmetros escolhidos foram produzidas as nanopartículas de PLGA carregadas com o peptídeo (NP-CF-Ctn[15-34]). O tamanho das partículas obtidas se situou na faixa nanométrica, como esperado, com tamanho médio de partícula da ordem de 210 nm (exatamente, $213,2 \pm 2,00$ nm), semelhante a outros tamanhos relatados na literatura, na faixa de $200 \pm 3,69$ a $304,5 \pm 10,0$ nm, para o carregamento de peptídeos através do método de emulsão dupla/evaporação de solvente (CHEREDDY et al., 2014; HAN et al., 2016). As NP-CF-Ctn[15-34] também apresentaram baixos valores de IPD, demonstrando a homogeneidade dos tamanhos das partículas obtidas.

Quando carregadas com peptídeo as nanopartículas apresentaram redução do potencial zeta de $-24,57 \pm 0,74$ mV para $-16,03 \pm 1,20$ mV, em relação às nanopartículas não carregadas. Este resultado foi próximo ao de Ma et al. (2012), que encontrou potencial zeta de $-15,53 \pm 0,71$ mV para nanopartículas de PLGA carregadas com peptídeo. Por outro lado, valores superiores ($-21,93 \pm 2,93$ e $-27,2 \pm 1,9$ mV) também foram encontrados para nanopartículas desse mesmo tipo (HIREMATH et al., 2016; SONG; NOH; LIM, 2016). A redução do potencial zeta pode estar relacionada às características físico-químicas do CF-Ctn[15-34], que não é somente veiculado pelas partículas, mas que contribui com a estruturação da nanoestrutura.

Estudos de estabilidade são essenciais para a avaliação das características físico-químicas da formulação pelo período e condições de estocagem do produto. Apesar de

o potencial zeta das NP-CF-Ctn[15-34] ter sido inferior, em módulo, a 30 mV, o sistema manteve suas características físico-químicas estáveis em suspensão por 30 dias, possivelmente em virtude de uma estabilização eletrostática e estérica combinada, apresentando variações mínimas quando o armazenamento foi estendido para 60 dias. O leve aumento de tamanho médio das partículas observado pode estar relacionado a uma tendência à agregação ou sedimentação após esse período de armazenamento nas condições descritas.

No procedimento otimizado de preparo das nanopartículas, foi alcançada uma alta eficiência de encapsulação. Diversos autores também relataram esse feito para outros peptídeos incorporados em nanopartículas de PLGA utilizando o método de emulsão dupla/evaporação de solvente, reforçando a adequabilidade do método ao que se propõe (MA et al., 2012; CHEREDDY et al., 2014; DERMAN et al., 2015; HAN et al., 2016). Petrizo et al. (2015) também carregaram peptídeos em nanopartículas de PLGA com alta eficiência de encapsulação ($92.9 \pm 17.4\%$) utilizando um método de emulsão e difusão de solvente. Além de ter sido usado um método adequado para o carregamento, a carga positiva do NP-CF-Ctn[15-34] pode ter favorecido a incorporação, devido uma maior interação com o PLGA carregado negativamente. A eficiência de encapsulação é um importante parâmetro de produção tanto no aspecto econômico como do ponto de vista terapêutico, podendo impactar na eficiência das nanopartículas na prevenção e no tratamento de doenças (AMINI et al., 2017).

A incorporação em nanopartículas de PLGA proporcionou uma liberação inicial rápida do peptídeo no primeiro dia de ensaio, seguida de uma liberação mais lenta ao longo dos dias seguintes (gráfico 3), assim como observado por Derman et al. (2015). Acredita-se que essa liberação inicial rápida ou explosão ocorra devido ao fármaco fracamente ligado ou adsorvido à superfície da nanopartícula (ALLAHYARI; MOHIT, 2016).

Em análise *in vitro*, NP-CF-Ctn[15-34] apresentaram efeito antifúngico melhorado contra *Cryptococcus neoformans* em relação ao CF-Ctn[15-34] livre. Quando incorporado às nanopartículas de PLGA, a uma concentração abaixo da CIM de 5 μM , o peptídeo provocou uma redução mais expressiva da viabilidade fúngica do que quando testado em sua forma livre em concentração equivalente. Achados semelhantes foram reportados por outras experiências com nanopartículas de PLGA contendo antifúngicos convencionais, como a anfotericina B (ASGHARI; NANEKARANI, 2016, TANG et al., 2014), e compostos naturais, como o juglone (ARASOGLU et al., 2016), em que também foi verificado uma melhora na atividade antifúngica *in vitro* quando os princípios ativos foram

carreados em nanopartículas, em relação a sua forma livre. Alguns desses trabalhos inclusive demonstraram também esses achados *in vivo*. Não só partículas de PLGA, mas outros tipos, como nanopartículas de PEG/PLA carregadas com itraconazol (ESSA et al., 2012) e NLS carregadas com óleo de copaíba (SVETLICHNY et al., 2015) potencializaram a atividade antifúngica dos respectivos princípios ativos após a incorporação às nanoestruturas. É notória a utilidade da nanotecnologia nessa área, despontando como uma importante fonte de formulações alternativas para compostos antifúngicos tradicionais e novos (SCORZONI et al, 2016).

Como visto, nanopartículas de PLGA têm se mostrado vetores efetivos para a veiculação de compostos antifúngicos, entretanto, o mecanismo de ação dessa combinação precisa ser mais bem esclarecido. O aumento da atividade antifúngica desses compostos pode estar relacionado ao aumento da solubilidade provocado pela incorporação às nanopartículas, especialmente para compostos hidrofóbicos como o itraconazol. Também tem sido discutido que as cargas negativas das nanopartículas de PLGA poderiam interagir com a quitina, carregada positivamente, da parede celular fúngica. Essa interação eletrostática facilitaria o acesso das nanopartículas às superfícies celulares, sua acumulação e, possivelmente, a entrada das substâncias ativas liberadas ou das nanopartículas nas células. Partículas com tamanho próximo a 200 nm já foram identificadas como capazes de ser captadas pelas células fúngicas (ARASOGLU et al., 2016). A afirmação da captação de nanopartículas por fungos pode ser reforçada, neste estudo, pelo fato de que um potente efeito antifúngico do peptídeo incorporado às essas estruturas foi observado mesmo em meio a um processo de liberação lenta ainda estar ocorrendo. Essa poderia ser uma justificativa plausível para o melhor efeito antifúngico de NP-CF-Ctn[15-34] aqui observado, ademais, a densidade aumentada de peptídeo nas nanopartículas disponibilizados por volume e por número de células-alvo pode ser outro contribuinte para essa ação melhorada. De todo modo, para fornecer uma explicação mais detalhada a respeito, outros estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários para avaliar os mecanismos de interação entre as nanopartículas e os fungos.

Além da melhora do efeito, tem sido relatada a capacidade das nanopartículas de reduzir a toxicidade de compostos antifúngicos (SCORZONI et al, 2016). Isso pode representar em análises futuras uma segurança adicional ao CF-Ctn[15-34] veiculado em nanopartículas de PLGA.

7 CONCLUSÃO

Encontrar opções de tratamento mais potentes, menos prejudiciais e acessíveis é um esforço contínuo na ciência hoje e as nanopartículas de PLGA mostraram ser uma ferramenta valiosa e altamente eficaz no fornecimento de uma ampla variedade de agentes bioativos. Neste estudo, foi desenvolvida uma formulação aprimorada de nanopartículas de PLGA para veicular o Ctn[15-34], um promissor agente antifúngico peptídico derivado de uma catelicidina da glândula de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. As nanopartículas obtidas apresentaram boas características físico-químicas e excelente eficiência de encapsulação, bem como potencializaram a atividade antifúngica do peptídeo, representando uma próspera abordagem terapêutica para a veiculação de Ctn[15-34].

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, N.; VERMA, A.; PATHAK, K. Topical delivery of drugs for the effective treatment of fungal infections of skin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2892-2913, maio 2015.
- ALCÂNTARA, M. T. S.; VARCA, G. H. C.; GIANNINI, D. R.; RIELLA, H. G.; LUGÃO, A. B. Obtenção e caracterização de hidrogéis à base de polivinil álcool de diferentes propriedades. In: congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais, 19. 2010, Campos do Jordão.
- ALLAHYARI, M.; MOHIT, E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 806-828, mar. 2016.
- ALMAAYTAH, A.; MOHAMMED, G.; ABUALHAIJAA, A.; AL-BALAS, Q. Development of novel ultrashort antimicrobial peptide nanoparticles with potent antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant bacteria. **Drug Design, Development And Therapy**, v. 11, p. 3159-3170, nov. 2017.
- AMINI, Y.; JAMEHDAR, S. A.; SADRI, K.; ZARE, S.; MUSAVI, D.; TAFAGHODI, M. Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. **Bio-medical Materials and Engineering**, v. 28, n. 6, p. 613-620, 22 nov. 2017.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli(Álcool Vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros**, v. 11, n. 4, p.174-181, 2001.
- ARASOGLU, T.; DERMAN, S.; MANSUROGLU, B.; UZUNOGLU, D.; KOÇYIGIT, B.; GUMUS, B.; ACAR, T.; TUNCER, B. Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 127-140, 2017.
- ARASOGLU, T.; MANSUROGLU, B.; DERMAN, S.; GUMUS, B.; KOCYIGIT, B.; ACAR, T.; KOCACALISKAN, I. Enhancement of antifungal activity of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) using a poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticle system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 38, p. 7087-7094, set. 2016.
- ASGHARI, H. M; NANEKARANI, S. Antifungal activity of amphotericin b-loaded nanoparticles. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v. 3, n. 1, p. 26-29, 2016.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, ago. 2015.

- BENEDICT, K.; JACKSON, B. R.; CHILLER, T. BEER, K. D. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, p. 1-7, set. 2018.
- BHOWMIK, T.; SAHA, P. P.; DASGUPTA, A.; GOMES, A. Antileukemic potential of pegylated gold nanoparticle conjugated with protein toxin (NKCT1) isolated from indian cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Cancer Nanotechnology**, v. 4, n. 1-3, p. 39-55, abr. 2013.
- BHOWMIK, T.; SAHA, P. P.; SARKAR, A.; GOMES, A. Evaluation of cytotoxicity of a purified venom protein from *Naja kaouthia* (NKCT1) using gold nanoparticles for targeted delivery to cancer cell. **Chemico-Biological Interactions**, v. 261, p. 35-49, jan. 2017.
- BOBO, D.; ROBINSON, K. J.; ISLAM, J.; THURECHT, K. J.; CORRIE S. R. Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 10, p. 2373-2387, jun. 2016.
- BOVERHOF, D. R.; BRAMANTE, C. M.; BUTALA, J. H.; CLANCY, S. F.; LAFRANCONI, M.; WEST, J.; GORDON, S. C. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137-150, out. 2015.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 731-741, maio 2012.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S.J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 367-375, maio 2007.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, jun. 2017.
- CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of treatment approaches for fungal infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 393-402, set. 2017.
- CAVALCANTE, C. S. P.; FALCÃO, C. B.; FONTENELLE, R. O. S.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 11, p. 1-7, 2016.
- CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M.; CHEN, Y. L. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, nov. 2017.
- CHEN, C.; ZHU, X.; DOU, Y.; XU, J.; ZHANG, J.; FAN, T.; DU, J.; LIU, K.; DENG, Y.; ZHAO, L.; HUANG, Y. Exendin-4 loaded nanoparticles with a lipid shell and aqueous core containing micelles for enhanced intestinal absorption. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 5, p. 865-876, maio 2015.
- CHEN, J.; GUO, Z.; TIAN, H.; CHEN, X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 3, p. 1-8, 2016.

CHEN, R.; RIVIERE, J. E. Biological and environmental surface interactions of nanomaterials: characterization, modeling, and prediction. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 3, e1440, nov. 2016.

CHEREDDY, K. K.; HER, C. H.; COMUNE, M.; MOIA, C.; LOPES, A.; PORPORATO, P. E.; VANACKER, J.; LAM, M. C.; STEINSTRÄESSER, L.; SONVEAUX, P.; ZHU, H.; FERREIRA, L. S.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. **Journal of Controlled Release**, v. 194, p. 138-147, nov. 2014.

CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S; MAGLIANI, W.; SANTINOLI, C.; POLONELLI, L. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p.1413-1433, ago. 2016.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, nov. 2017.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1-17, maio 2018.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, jul. 2012.

DE BARROS, N. B.; MACEDO, S. R. A.; FERREIRA, A. S.; TAGLIARI, M. P.; ZANCHI, F. B.; KAYANO, A. M.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. Liposomes Containing an ASP49-phospholipase A2 from *Bothrops Jararacussu* snake venom as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 225-231, jul. 2016.

DERMAN, S.; MUSTAFAEVA, Z. A.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 1-12, out. 2015.

DING, C.; LI, Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1440-1453, jul. 2017.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 675-691, ago. 2017.

ESSA, S.; LOUHICHI, F.; RAYMOND, M.; HILDGEN, P. Improved antifungal activity of itraconazole-loaded PEG/PLA nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 3, p. 205-217, ago. 2012.

FALCAO, C. B.; DE LA TORRE, B. G.; PEREZ-PEINADO, C.; BARRON, A. E.; ANDREU, D.; RADIS-BAPTISTA, G. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related

peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2561–2571, 2014.

FALCAO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; DE LA TORRE, B. G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M. A.; RADIS-BAPTISTA, G.; ANDREU, D. Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 58, p. 8553–8563, 2015.

FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; DÓSA, G.; GYENIS, J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 757-765, ago. 2011a.

FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; DÓSA, G.; GYENIS, J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 846-853, ago. 2011b.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, jan. 2015.

GENG, H.; SONG, H.; QI, J.; CUI, D. Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n. 1, p. 312, 2011.

GUPTA, M.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S. Promising novel nanopharmaceuticals for improving topical antifungal drug delivery. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and fabrication**. Elsevier, 2017. p. 197-228.

HAN, H. D.; BYEON, Y.; KANG, T. H.; Jung, I. D.; Lee, J. W.; Shin, B. C.; Lee, Y. J.; Sood, A. K.; Park, Y. M. Toll-like receptor 3-induced immune response by poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for dendritic cell-based cancer immunotherapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5729-5742, nov. 2016.

HIREMATH, J.; KANG, K. I.; XIA, M.; ELAISH, M.; BINJAWADAGI, B.; OUYANG, K.; DHAKAL, S.; ARCOS, J.; TORRELLES, J. B.; JIANG, X.; LEE, C. W.; RENUKARADHYA, G. J. Entrapment of H1N1 influenza virus derived conserved peptides in PLGA nanoparticles enhances T cell Response and Vaccine Efficacy in Pigs. **Plos One**, v. 11, n. 4, e01519221, abr. 2016.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, abr. 2013a.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, abr. 2013b.

HOOD, J. L.; JALLOUK, A. P.; CAMPBELL, N.; RATNER, L.; WICKLINE, S. A. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 1, p. 95-103, 2012.

HORTA, C. C. R.; CHATZAKI, M.; REZENDE, B. A.; MAGALHÃES, B. F.; DUARTE, C. G.; FELICORI, L. F.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; CARMO, A. O.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Cardiovascular-active venom toxins: an overview. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 603-622, mar. 2016.

IQBAL, M.; ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173-190, dez. 2015.

JAIN, K.K.. Nanobiotechnology. **Reference Module in Life Sciences**, 2017. Elsevier.

JALLOUK, A. P.; MOLEY, K. H.; OMURTAG, K.; HU, G.; LANZA, G. M.; WICKLINE, S. A.; HOOD, J. L. Nanoparticle incorporation of melittin reduces sperm and vaginal epithelium cytotoxicity. **Plos One**, v. 9, n. 4, e95411-1, abr. 2014.

JALLOUK, A. P.; PALEKAR, R. U.; PAN, H.; SCHLESINGER, P. H.; WICKLINE, S. A. Modifications of natural peptides for nanoparticle and drug design. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, p. 57-91, 2015.

JURJ, A.; BRAICU, C.; POP, L. A.; TOMULEASA, C.; GHERMAN, C. D.; BERINDAN-NEAGOE, I. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2871-2890, set. 2017.

KAUSHIK, N.; PUJALTE, G. G. A.; REESE, S. T. Superficial fungal infections. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 4, p. 501-516, dez. 2015.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, maio 2017.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469-1484, set. 2011.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497-506, mar. 2012.

KUMAR, B.; JAJODIA, K.; KUMAR, P.; GAUTAM, H. K. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 260-268, out. 2017.

LEE, B. K.; YUN, Y. H.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 158-164, mar. 2015.

LIN, P. C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, jul. 2014.

MA, W.; CHEN, M.; KAUSHAL, S.; MCELROY, M.; ZHANG, Y.; OZKAN, C.; BOUVET, M.; KRUSE, C.; GROTHJAHN, D.; ICHIM, T.; MINEV, B. PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. **International**

Journal of Nanomedicine, V. 7, p. 1475-1487, mar. 2012.

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **Zeta potential - An introduction in 30 minutes**. 2017. Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/br/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.html>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. Estimativa do grau de hidrólise do PVA através de espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier. *In: Anais do 8º Congresso Brasileiro de Polímeros*. Águas de Lindóia, 2005, 349-350.

MAO, J.; LIU, S.; AI, M.; WANG, Z.; WANG, D.; LI, X.; HU, K.; GAO, X.; YANG, Y. A novel melittin nano-liposome exerted excellent anti-hepatocellular carcinoma efficacy with better biological safety. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 71, mar. 2017.

MIRAKABADI, A. Z.; MORADHASELI, S. Comparative cytotoxic evaluation of free and sodium alginate nanoparticle-encapsulated ICD-85 on primary lamb kidney cells. **Iranian Journal of Cancer Prevention**. v. 6, n. 3, p.151–159, 2013.

MIR, M.; AHMED, N.; REHMAN, A. U. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 217-231, nov. 2017.

MISRA, S. K.; SCHWARTZ-DUVAL, A. S.; PAN, D. Genomic DNA interactions mechanize peptidotoxin-mediated anticancer nanotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 2254-2261, jun. 2017.

MOHAMMADI-SAMANI, S.; TAGHIPOUR, B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 4, p. 385-393, fev. 2014.

MORADHASELI, S.; MIRAKABADI, A. Z.; SARZAEEM, A.; KAMALZADEH, M.; HOSSEINIA, R. H. Cytotoxicity of ICD-85 NPs on human cervical carcinoma HeLa cells through caspase-8 mediated pathway. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n.1. p. 155–163, 2013.

NOVIENDRI, D. Microencapsulation of fucoxanthin by water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsion solvent evaporation Method: A review. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 137-150, dez. 2014.

NUCHUCHUA, O.; NEJADNIK, M. R.; GOULOOZE, S. C.; Lješćković, N. J.; Every, H. A.; Jiskoot, W.; Characterization of drug delivery particles produced by supercritical carbon dioxide technologies. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 244-262, out. 2017.

PAGELS, R. F.; PRUD'HOMME, R. K. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 519-535, dez. 2015.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, fev. 2012.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, nov. 2013.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738-2758, jun. 2018.

PETRIZZO, A.; CONTE, C.; TAGLIAMONTE, M.; NAPOLITANO, M.; BIFULCO, K.; CARRIERO, V.; DE STRADIS, A.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M.; QUAGLIA, F.; BUONAGURO, L. Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 6 out. 2015.

PIACENTINI, E. Encapsulation efficiency. **Encyclopedia of Membranes**, p. 706-707, 2016.
PRIMON-BARROS, M.; JOSÉ MACEDO, A. Animal venom peptides: Potential for new antimicrobial agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 10, p. 1119-1156, fev. 2017.

QIU, L.; HU, B.; CHEN, H.; LI, S.; HU, Y.; ZHENG, Y.; WU, X. Antifungal efficacy of itraconazole-loaded TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1415-1423, fev. 2015.

RAMSDEN, J J. Chapter 1 - What is nanotechnology? In: RAMSDEN, J. J. (Ed.). **Applied Nanotechnology: The conversion of research results to products micro and nano technologies**. 3. ed. William Andrew Publishing, 2018. p. 3-13.

RASHID, M.; AHMAD, Q. Z.; TAJUDDIN. Chapter 11 - Trends in Nanotechnology for Practical Applications. In: MOHAPATRA, S. S.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; MISHRA, R. K.; THOMAS, S. (Ed.). **Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems: Nanoscience and nanotechnology in drug delivery**. Elsevier, 2019. p. 297-325.

RIZVI, S. A.A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64-70, jan. 2018.

ROBINSON, S. D.; SAFAVI-HEMAMI, H. Venom peptides as pharmacological tools and therapeutics for diabetes. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 79-86, dez. 2017.

ROBINSON, S. D.; UNDHEIM, E. A. B.; UEBERHEIDE, B.; KING, G. F. Venom peptides as therapeutics: Advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 10, p.931-939, set. 2017.

SADEGHI, M.; MCARTHUR, J. R.; FINOL-URDANETA, R. K.; ADAMS, D. J. Analgesic conopeptides targeting G protein-coupled receptors reduce excitability of sensory neurons. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 116-123, dez. 2017.

SAHA, P. P.; BHOWMIK, T.; DASGUPTA, A. K.; GOMES, A. In vivo and in vitro toxicity of nanogold conjugated snake venom protein toxin GNP-NKCT1. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 74-84, 2014.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, abr. 2011.

SANDRESCHI, S.; PIRAS, A. M.; BATONI, G.; CHIELLINI, F. Perspectives on polymeric nanostructures for the therapeutic application of antimicrobial peptides. **Nanomedicine**, v. 11, n. 13, p. 1729-1744, jul. 2016.

SANTALICES, I.; GONELLA, A.; TORRES, D.; JOSÉ ALONSO, M. Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 155-180, dez. 2017.

SARAIVA, C.; PRAÇA, C.; FERREIRA, R.; SANTOS, T.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 34-47, ago. 2016.

SARAVANAN, S.; MALATHI, S.; SESH. P. S. L., SELVASUBRAMANIAN, S.; BALASUBRAMANIAN, S.; PANDIYAN, V. Hydrophilic poly (ethylene glycol) capped poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for subcutaneous delivery of insulin in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1190-1198, fev. 2017.

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1478-1490, dez. 2017.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; DE MELO, W. C. M. A.; DE OLIVEIRA, H. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal Therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 08, n. 36, p. 1-23, jan. 2017.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; DE LACORTE SINGULANI, J.; de Paula E Silva. A. C.; Costa-Orlandi, C.B.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes-Giannini, M. J. . Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68-78, abr. 2016.

SHARMA, S.; PARMAR, A.; KORI, S.; SANDHIR, R. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 30-40, jun. 2016.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: achievements and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 15-32, maio 2017.

SOMAN, N. R.; BALDWIN, S. L.; HU, G.; MARSH, J. N.; LANZA, G. M.; HEUSER, J. E.; ARBEIT, J. M.; WICKLINE, S. A.; SCHLESINGER, P. H. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2830-2842, set. 2009.

SONG, C.; NOH, Y. W.; LIM, Y. T. Polymer nanoparticles for cross-presentation of exogenous antigens and enhanced cytotoxic T-lymphocyte immune response. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3753-3764, ago. 2016.

SOUSA, D.; FERREIRA, D.; RODRIGUES, J. L.; RODRIGUES, L. R. Chapter 14 - Nanotechnology in targeted drug delivery and therapeutics. In: MOHAPATRA, S. S.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; MISHRA, R. K.; THOMAS, S. (Ed.). **Applications of Targeted Nano Drugs And Delivery Systems: Nanoscience and nanotechnology in drug delivery**. Elsevier, 2019. p. 375-409.

SOUZA, A. C. O.; AMARAL, A. C. Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: Improving efficacy, biodistribution and toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 336, mar. 2017.

SVETLICHNY, G.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CUNHA, S. L.; SILVA, F. E. K.; BUENO, K.; POHLMANN, A. R.; FUENTEFRIA, A. M.; GUTERRES, S. S. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Die Pharmazie**, v.70, n. 3, p. 155-164, mar. 2015.

SVILENOV, H.; TZACHEV, C. Solid Lipid Nanoparticles – A promising drug delivery system. **Nanomedicine**, p. 187-237, 2014.

SWIDER, E.; KOSHKINA, O.; TEL, J.; CRUZ, L. J.; DE VRIES, I. J. M.; SRINIVAS, M. Customizing poly(lactic- co -glycolic acid) particles for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 38-51, jun. 2018.

TANG, X.; ZHU, H.; SUN, L.; HOU, W.; CAI, S.; ZHANG, R.; LIU, F. Enhanced antifungal effects of amphotericin B-TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5403-5413, nov. 2014.

TEODORESCU, M.; BERCEA, M.; MORARIU, S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 109-131, jan. 2019.

VYSLOUŽIL, Jakub; DOLEŽEL, Petr; KEJDUĽOVÁ, Martina; Mašková, E.; Mašek, J.; Lukáč, R.; Košťál, V.; Vetchý, D.; Dvořáčková, K. Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 4, p. 403-417, dez. 2014.

WANG, G.; MISHRA, B.; LAU, K.; LUSHNIKOVA, T.; GOLLA, R.; WANG, X. Antimicrobial Peptides in 2014. **Pharmaceuticals**, v.8, n.1, p.123-150, 2015.

WANG, M.; ZHANG, Y.; FENG, J.; GU, T.; DONG, Q.; YANG, X.; SUN, Y.; WU, Y.; CHEN, Y.; KONG, W. Preparation, characterization, and in vitro and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.1141-1154, mar. 2013.

WEERDEN, N. L. van D.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 19, p. 3545-3570, fev. 2013.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020-1037, set. 2012.

XU, Y.; KIM, C. S.; SAYLOR, D. M.; KOO, D. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 6, p. 1692-1716, abr. 2016.

YANG, M.; LAI, S. K.; YU, T.; WANG, Y. Y.; HAPPE, C.; ZHONG, W.; ZHANG, M.; ANONUEVO, A.; FRIDLEY, C.; HUNG, A.; FU, J.; HANES, J. Nanoparticle penetration of human cervicovaginal mucus: The effect of polyvinyl alcohol. **Journal of Controlled Release**, v. 192, p. 202-208, out. 2014.

YE, C.; CHI, H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: approaches, applications and challenges. **Materials Science and Engineering: C**, v. 83, p. 233-246, fev. 2018.

YU, M.; WU, J.; SHI, J.; FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for protein delivery: overview and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 24-37, out. 2016.

ZAZO, H.; COLINO, C. I.; LANAO, J. M. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 224, p. 86-102, fev. 2016.

ZHANG, X.; LIU, L.; CHAI, G.; ZHANG, X.; LI, F. Brain pharmacokinetics of neurotoxin-loaded PLA nanoparticles modified with chitosan after intranasal administration in awake rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1618-1624, 2 out. 2013.

ZHAO, H.; LIN, Z. Y.; YILDIRIMER, L.; DHINAKAR, A.; ZHAO, X.; WU, J. Polymer-based nanoparticles for protein delivery: design, strategies and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 23, p. 4060-4071, 2016

ZHU, X.; RADOVIC-MORENO, A. F.; WU, J.; LANGER, R.; SHI, J. Nanomedicine in the management of microbial infection – Overview and perspectives. **Nano Today**, v. 9, n. 4, p. 478-498, ago. 2014.