



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THUANNY BORBA RIOS

DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE
ENTREGA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO BOTRAMP14

TESE DE DOUTORADO

CAMPO GRANDE, MS

2024

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE
ENTREGA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO BOTRAMP14

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia.

Autora: Thuanny Borba Rios

Orientador: Octávio Luiz Franco

Co-orientadora: Mariana Rocha Maximiano

Campo Grande - Mato Grosso do Sul

Outubro - 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 3360

R586d Rios, Thuanny Borba

Desenvolvimento de nanoestruturas poliméricas como sistemas de entrega do peptídeo antimicrobiano BotrAMP14/ Thuanny Borba Rios sob orientação do Prof. Dr. Octávio Luiz Franco e Profa. Dra. Mariana Rocha Maximiano.-- Campo Grande, MS : 2024.
120 p.: il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2024
Bibliografia: p. 103-120

1. Peptídeo antimicrobiano. 2. Nanobiotecnologia. 3. Sistemas coloidais. 4. Polímeros. 5. Infecções de pele I. Franco, Octávio Luiz. II. Maximiano, Mariana Rocha. III. Título.

CDD: 660.6



**“DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS POLIMÉRICAS COMO
SISTEMAS DE ENTREGA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO BOTRAMP14”**

Autor: THUANNY BORBA RIOS

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Profa Dra Mariana Rocha Maximiano

TITULAÇÃO: Doutora em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 14 de outubro de 2024.

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco (coorientador)
Profa Dra Mariana Rocha Maximiano (coorientadora)
Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade (UFPE)
Prof. Dr. Lucas Alcântara Sica de Toledo (UCDB)
Prof. Dr. Ludovico Migliolo (UCDB)

“Quer saber? Você não pode se concentrar somente no que dá errado. Sempre há uma maneira de encontrar alguma diversão nas coisas”

(Alegria, Divertidamente, 2024)

AGRADECIMENTOS

Neste momento, gostaria de expressar minha gratidão a todos que me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho. Meu sincero “obrigada” a todos que fizeram parte desta trajetória comigo.

Agradeço à Deus, por me fortalecer nos momentos de dificuldade e me dar resiliência para seguir em frente.

A minha família, por todo amor, paciência e apoio incondicional, fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço especialmente aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e acreditaram no meu potencial, e ao meu irmão, cuja alegria e leveza tornaram essa jornada mais fácil em tantos momentos difíceis. Eu amo vocês.

Aos meus orientadores Dr. Octávio Luiz Franco e Dra. Mariana Rocha Maximiano pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe deles. Obrigada por acreditarem em mim, sem dúvidas cresci pessoal e profissionalmente e vocês são grandes responsáveis por isso.

Aos amigos que estiveram ao meu lado ao longo desses anos, minha eterna gratidão. Vocês foram essenciais nos momentos mais desafiadores, compartilhando seu conhecimento e me oferecendo apoio inestimável. Agradeço especialmente aos colegas e amigos que fiz no laboratório e no curso, por todo o companheirismo e risadas que tornaram o ambiente de trabalho mais acolhedor e produtivo.

Ao meu orientador do doutorado sanduíche, minha gratidão pela orientação e pela confiança, que foram cruciais para meu desenvolvimento científico no exterior. Aos colegas que conheci durante esse período, obrigada por todo o aprendizado compartilhado e pela amizade que tanto me acrescentaram.

A todas as outras pessoas que me apoiaram ou estiveram presentes durante essa caminhada até aqui, principalmente funcionários, técnicos e outros profissionais que tiveram participação nos experimentos. Aos membros da minha banca, por aceitarem o convite e por suas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todo o conhecimento e apoio que recebi ao longo desses quatro anos. Sou igualmente grata ao Programa e à Universidade Católica Dom Bosco e Universidade Católica de Brasília, pela disponibilização de laboratórios bem-equipados, essenciais para a realização dos experimentos desta pesquisa. Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO.....	16
JUSTIFICATIVA	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
PELE	20
INFECÇÕES DE PELE E TECIDOS MOLES.....	22
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	24
NANOBIOTECNOLOGIA APLICADA À LIBERAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	28
OBJETIVO	32
OBJETIVO GERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
METODOLOGIA.....	33
SELEÇÃO DO PEPTÍDEO	33
SÍNTESE PEPTÍDICA E VALIDAÇÃO DA MASSA	33
QUANTIFICAÇÃO DO BOTRAMP14 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (RP-HPLC)	34
SÍNTESE DE NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA	34
TAMANHO MÉDIO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA	35
AValiação MORFOLÓGICA DAS NANOESTRUTURAS	36
ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS, <i>SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING</i>)	36

MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO COM DISSIPAÇÃO (QCM-D, <i>QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE WITH DISSIPATION</i>)	37
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	38
ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DO BOTRAMP14 A PARTIR DAS NANOESTRUTURAS	39
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM)	39
RESULTADOS	41
ANÁLISE DO PEPTÍDEO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	41
MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO BOTRAMP14	41
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA	44
ESTABILIDADE DAS NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA	45
AValiação MORFOLÓGICA DAS NANOESTRUTURAS	46
AValiação ESTRUTURAL DAS NANOESTRUTURAS.....	47
ANÁLISE QCM-D DA INTERAÇÃO ENTRE CS-TPP-ALG COM BOTRAMP14 E BICAMADA LIPÍDICA	48
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	51
ESTUDO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PEPTÍDEO A PARTIR DAS NANOESTRUTURAS	52
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	53
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÕES.....	62
ARTIGO SUBMETIDO	64
ARTIGOS PUBLICADOS.....	94
REFERÊNCIAS	103

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Caracterização das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG) sintetizadas a partir das concentrações indicadas no Quadro 1.44

Tabela 2. Caracterização das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio vazias (CS-TPP-ALG) e contendo 100 μM do peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14).45

Tabela 3. Caracterização das nanoestruturas de quitosana (1 mg.ml^{-1}) e alginato (0,3 mg.ml^{-1}) vazias (CS-TPP-ALG) e contendo 100 μM do peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14), referente às replicatas armazenadas a temperatura de 5 ± 3 °C por 30 dias.46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele diferenciando as 3 camadas que a compõem: epiderme, derme e hipoderme Figura criada com o apoio da Biorender (BioRender.com).	21
Figura 2. Prevalência mundial de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina (MRSA).	23
Figura 3. Estrutura tridimensional do BotrAMP14 visualizada após 800 ns de simulações de dinâmica molecular. Os bastões brancos representam moléculas de sódio docecil sulfato (SDS) selecionadas que estão envolvidas na estabilização da estrutura secundária do peptídeo. Figura adaptada de OLIVEIRA et al., 2020.....	27
Figura 4. Espectro de massa do peptídeo sintetizado gerado no equipamento MALDI-ToF obtido no modo de ionização positiva, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.....	41
Figura 5. Curva analítica obtida para quantificação do peptídeo BotrAMP14 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ($y = 55974x$; $r = 0,9923$).	42
Figura 6. Cromatograma referente a uma solução do peptídeo BotrAMP14 na concentração de 100 μ M (A) e referente ao filtrado da dispersão coloidal de nanoestruturas vazias (B). Volume de injeção: 50 μ L. Fases moveis: água ultrapura acidificada com ácido trifluoracético (TFA) 0,01% (A) e Acetonitrila acidificada com TFA 0,01% (B).	43
Figura 7. Caracterização morfológica de nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio, CS-TPP-ALG (A e B), e nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio contendo o peptídeo BotrAMP14, CS-TPP-ALG-BotrAMP14 (C e D), por CrioTEM. As características estruturais das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio são destacadas pelas setas brancas e mostram que a presença do peptídeo não altera a estrutura. Barras de escala a 200 nm.....	47
Figura 8. Padrão do SAXS sobre a intensidade (I) versus o vetor de espalhamento q para a formulação de nanoestruturas vazias (CS-TPP-ALG, círculos vermelhos) e	

nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14, círculos azuis).48

Figura 9. Medidas representativas de QCM-D. ΔF (linhas verdes) e ΔD (linhas pretas) no 7º harmônico das nanoestruturas vazias (CS-TPP-ALG) quando o peptídeo BotrAMP14 é adicionado. (I) Equilíbrio do chip com H₂O. (II) Injeção de nanoestruturas + 30 min de incubação (III) Lavagem com Tris-HCl pH 7,4. (IV) Injeção de 100 μ M de BotrAMP14 + 1 hora de incubação; (V) 1ª lavagem com 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 por 1 h; (VI) 2ª lavagem com 10 mM de Tris-HCl + 150 mM de NaCl pH 7,4 por 1 h.49

Figura 10. Cinética de adsorção do peptídeo antimicrobiano BotrAMP14 às nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG) avaliada por microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D).50

Figura 11. Medidas representativas de QCM-D. ΔF (linhas verdes) e ΔD (linhas pretas) no 7º harmônico das nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) interagindo com a bicamada lipídica. I) Equilíbrio do chip com H₂O. (II) Injeção de lipídios e observação da formação da bicamada ($\Delta F \sim 24$; $\Delta D \sim 1$) seguido por lavagem MQ do excesso de lipídios. (III) Equilíbrio de cristais com tampão Tris. (IV) Injeção de nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 e monitoramento longo (3h). (V) Lavagem com 10mM Tris-HCl pH 7,4.51

Figura 12. Perfil de liberação do BotrAMP14 a partir da formulação de nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) em comparação a uma solução aquosa do peptídeo livre contendo a mesma concentração. Os experimentos foram realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão.52

Figura 13. Heatmap da concentração inibitória mínima (CIM) de nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG), nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio contendo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) e do peptídeo BotrAMP14 contra seis cepas de *Staphylococcus aureus*.53

LISTA DE ABREVIATURAS

ALG – Alginato de sódio

CIM – Concentração inibitória mínima

CS – Quitosana

DNA - Ácido desoxirribonucléico

MALDI-ToF – “*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight*”, ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MS – “*Mass spectrometry*”, espectrometria de massa

NP – Nanopartículas

PAM – Peptídeo antimicrobiano

PBS – “*Phosphate buffer solution*”, solução de tampão fosfato

PDI – Índice de polidispersividade

PIB – Produto interno bruto

RNA – Ácido ribonucléico

RP-HPLC – “*Reverse phase - High-performance liquid chromatography*”, cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase reversa

SAXS – “*Small-angle X-ray scattering*”, espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SEM – “*Scanning eletronic microscopy*”, microscopia eletrônica de varredura

SUV – “*Small unilamellar vesicle*”, pequena vesícula unilamelar

TFA – Ácido trifluoracético

TPP – Tripolifostato de sódio

UFC – Unidades formadoras de colônia

RESUMO

As infecções de pele e tecidos moles causadas por *Staphylococcus aureus*, especialmente associadas à resistência antimicrobiana, representam um desafio clínico significativo. Este estudo teve como objetivo desenvolver nanoestruturas de quitosana e alginato para encapsular o peptídeo antimicrobiano BotrAMP14, visando otimizar sua estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. As nanoestruturas apresentaram um tamanho médio de aproximadamente 200 nm, um índice de polidispersividade inferior a 0,3 e potencial zeta próximo a +30 mV, indicando uma distribuição homogênea e excelente estabilidade coloidal. A eficiência de encapsulação foi superior a 90% referente a uma concentração de 100µM do peptídeo BotrAMP14, assegurando a liberação de uma quantidade terapêutica do peptídeo. O perfil de liberação *in vitro* revelou um comportamento bifásico, com uma fase inicial de liberação lenta, ideal para o tratamento de infecções. A caracterização por microscopia eletrônica de transmissão criogênica (crio-TEM) confirmou a morfologia esférica e ramificada das nanoestruturas, enquanto o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) complementou a avaliação estrutural, confirmando que não há diferença estrutural entre os sistemas na presença ou ausência do peptídeo BotrAMP14, reforçando a robustez do sistema. Os ensaios antimicrobianos mostraram que o BotrAMP14 encapsulado manteve sua atividade contra cepas de *S. aureus*, destacando a eficácia do sistema nanoparticulado. Os resultados sugerem que as nanoestruturas desenvolvidas representam uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais para infecções de pele causadas por *Staphylococcus aureus*, especialmente em um contexto de resistência bacteriana crescente.

Palavras-chave: peptídeo antimicrobiano; nanobiotecnologia; sistemas coloidais; polímeros; infecções de pele.

ABSTRACT

Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus aureus*, especially those associated with antimicrobial resistance, represent a significant clinical challenge. This study aimed to develop chitosan and alginate nanostructures to encapsulate the antimicrobial peptide BotrAMP14 to optimize its stability, bioavailability, and therapeutic efficacy. The nanostructures exhibited an average size of approximately 200 nm, a polydispersity index of less than 0.3, and a zeta potential close to +30 mV, indicating a homogeneous distribution and excellent colloidal stability. The encapsulation efficiency was higher than 90% at a concentration of 100 μ M of the BotrAMP14 peptide, ensuring the release of a therapeutic amount of the peptide. The *in vitro* release profile revealed a biphasic behavior with an initial slow-release phase, which is ideal for treating infections. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) characterization confirmed the spherical and branched morphology of the nanostructures. At the same time, small-angle X-ray scattering (SAXS) complemented the structural evaluation, confirming that there is no structural difference between the systems in the presence or absence of the BotrAMP14 peptide, reinforcing the robustness of the system. Antimicrobial assays showed that the encapsulated BotrAMP14 retained its activity against *S. aureus* strains, highlighting the effectiveness of the nanoparticulate system. T The results suggest that the developed nanostructures represent a promising alternative to conventional treatments for skin infections caused by *Staphylococcus aureus*, especially in a context of increasing bacterial resistance.

Keywords: antimicrobial peptide; nanobiotechnology; colloidal systems; polymers; skin infections.

INTRODUÇÃO

As infecções de pele e tecidos moles (IPTM) são condições comuns, que variam desde infecções superficiais como impetigo, até formas graves como abscessos, celulite e fasciíte necrotizante (KARNAM *et al.*, 2023). Elas podem ser causadas por uma variedade de patógenos, sendo as bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, os agentes etiológicos mais prevalentes. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) tem recebido atenção especial por sua crescente prevalência e resistência a múltiplas classes de antibióticos, o que complica os tratamentos disponíveis (LINZ *et al.*, 2023). Em infecções mais invasivas, a taxa de mortalidade pode chegar a 20%, especialmente em casos de fasciíte necrotizante ou quando a infecção se espalha para o sistema circulatório, resultando em septicemia (LINZ *et al.*, 2023).

Além das dificuldades associadas ao controle da resistência bacteriana, as IPTM apresentam um grande impacto socioeconômico. Estima-se que mais de 10% das hospitalizações de emergência estejam relacionadas a essas infecções, gerando custos significativos em termos de tratamento prolongado, internações e até cirurgias em casos graves (ESPOSITO; NOVIELLO; LEONE, 2016). Um fator agravante é o aumento das infecções adquiridas na comunidade, especialmente relacionadas a MRSA, que até pouco tempo eram consideradas infecções restritas ao ambiente hospitalar (ESPOSITO; NOVIELLO; LEONE, 2016; MILLAR *et al.*, 2019).

O tratamento convencional das IPTM envolve antibióticos, como beta-lactâmicos e glicopeptídeos (KEBRIAEI *et al.*, 2020). No entanto, devido à resistência aos antibióticos e à emergência de novas linhagens bacterianas, o uso prolongado e indiscriminado desses medicamentos pode contribuir para falhas terapêuticas, desenvolvimento de resistência adicional e efeitos colaterais nos pacientes (KEBRIAEI *et al.*, 2020). Além disso, muitos antibióticos não conseguem penetrar adequadamente no tecido infectado, reduzindo sua eficácia.

Diante desse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm surgido como uma nova linha de defesa contra infecções resistentes, devido à sua capacidade de destruir rapidamente as membranas bacterianas, evitando o desenvolvimento de

resistência (BUCATARU; CIOBANASU, 2024; XUAN *et al.*, 2023). Esses peptídeos são moléculas de defesa natural encontradas em organismos como plantas, insetos, mamíferos e microrganismos, e apresentam uma ampla gama de ação contra bactérias, fungos e vírus (DIJKSTEEL *et al.*, 2021). O BotrAMP14 (KRWKKFFRKVIKFF-NH₂) foi projetado para ter alta anfipaticidade e estrutura α -helicoidal em ambientes semelhantes a membranas, permitindo interação eficaz com fosfolipídios. Esse peptídeo combina forte atividade antibacteriana com baixa citotoxicidade, sendo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Além de suas propriedades antimicrobianas, os PAMs também podem modular o sistema imune, promovendo a cicatrização de feridas e reduzindo a inflamação (DIJKSTEEL *et al.*, 2021).

No entanto, apesar de suas vantagens terapêuticas, a aplicação clínica dos PAMs enfrenta obstáculos significativos. Devido à sua natureza proteica, eles são rapidamente degradados por enzimas proteolíticas, têm curta meia-vida no organismo e, em altas concentrações, podem causar toxicidade em células humanas (COSTA *et al.*, 2019; DIJKSTEEL *et al.*, 2021; FRY, 2018). Além disso, a produção de PAMs em larga escala é dispendiosa, o que limita sua disponibilidade no mercado (COSTA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2023).

Para superar esses desafios, a nanotecnologia oferece soluções promissoras, como a encapsulação dos PAMs em nanoestruturas, permitindo maior estabilidade, liberação modificada e proteção contra a degradação proteolítica (NAQVI; PANGHAL; FLORA, 2020; PATRA *et al.*, 2018). A nanoencapsulação é um processo no qual os peptídeos são inseridos dentro de uma matriz nanométrica, geralmente composta de polímeros biocompatíveis, como quitosana ou alginato, que protegem a molécula ativa e permitem sua liberação prolongada no local da infecção (ZHANG *et al.*, 2013). Isso não só aumenta a biodisponibilidade dos PAMs, mas também reduz a toxicidade, já que doses menores podem ser utilizadas para alcançar o efeito terapêutico desejado (MAXIMIANO *et al.*, 2022).

Vários estudos experimentais têm demonstrado o potencial da nanoencapsulação de PAMs para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles (FATHI *et al.*, 2020; HOANG; GHORI; CONWAY, 2021; RAMÔA *et al.*, 2023; TAN *et al.*, 2023). Em

experimentos com modelos animais e ensaios *in vitro*, nanopartículas contendo PAMs demonstraram eficácia aumentada contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CRUZ *et al.*, 2017; PIRAS *et al.*, 2015; WATER *et al.*, 2015). Outro benefício da nanotecnologia no contexto das infecções de pele é a possibilidade de aplicação tópica, o que reduz os efeitos colaterais sistêmicos e concentra o tratamento diretamente no local afetado. Isso é particularmente relevante em pacientes com infecções extensas ou crônicas, em que o uso de antibióticos sistêmicos pode ser contraproducente ou arriscado devido ao comprometimento da função hepática ou renal (KOPECKI, 2021; SOUTO *et al.*, 2020). Além disso, as formulações tópicas podem ser mais facilmente combinadas com outras terapias, como curativos especiais ou terapias fotodinâmicas, potencializando a eficácia do tratamento (GÜLTEKIN *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a combinação de peptídeos antimicrobianos e nanotecnologia representa um avanço significativo no tratamento de infecções de pele e tecidos moles. A encapsulação em nanoestruturas tem o potencial de resolver os principais desafios associados ao uso de PAMs, como estabilidade e toxicidade, enquanto oferece uma alternativa eficaz e inovadora aos antibióticos convencionais, especialmente no combate a cepas multirresistentes. Esses avanços são promissores não apenas no contexto clínico, mas também para aplicações futuras em medicina regenerativa e na prevenção de infecções hospitalares.

Portanto, neste estudo serão desenvolvidas e caracterizadas nanoestruturas de quitosana como veículos para a entrega de peptídeos antimicrobianos, visando o tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por *Staphylococcus aureus*. A nanoencapsulação do peptídeo BotrAMP14 buscará melhorar sua estabilidade, controlar a liberação e protegê-lo da degradação proteolítica, aumentando sua eficácia terapêutica contra patógenos resistentes, como *S. aureus*.

JUSTIFICATIVA

As infecções de pele e tecidos moles (IPTM) emergem como uma preocupação significativa na saúde pública, impactando tanto a qualidade de vida dos pacientes quanto os custos associados ao tratamento (POULAKOU; LAGOU; TSIODRAS, 2019; VON SPECHT *et al.*, 2014). A alta incidência de IPTM, frequentemente causadas por bactérias resistentes, representa um desafio crescente para o sistema de saúde, refletindo-se em hospitalizações prolongadas e em tratamentos complexos (ESPOSITO; NOVIELLO; LEONE, 2016). As bactérias, como *S. aureus*, são responsáveis por uma ampla gama de infecções de pele, que podem variar de quadros leves a complicações severas, como fasciíte necrotizante, que, quando não tratadas adequadamente, podem levar à morte (LINZ *et al.*, 2023). O tratamento convencional, que frequentemente inclui o uso de antibióticos, enfrenta desafios significativos devido ao aumento da resistência bacteriana, resultando em falhas terapêuticas e na necessidade de terapias mais agressivas (PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018). Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) emergem como uma alternativa promissora. Essas pequenas biomoléculas possuem propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, que podem superar algumas limitações dos antibióticos convencionais, especialmente em relação à resistência bacteriana (MORETTA *et al.*, 2022). Para otimizar a biodisponibilidade e a estabilidade durante o transporte dessas moléculas, a pesquisa em formulações de PAMs nanoencapsulados tem se intensificado, devido aos seus potenciais, como a liberação modificada e prolongada, além da proteção contra degradação (YADAV; KUMARI; YADAV, 2011). Assim, é fundamental desenvolver novos produtos bioinspirados com PAMs nanoencapsulados, que apresentem menor citotoxicidade, maior biodisponibilidade e eficácia no combate a infecções resistentes. Esses estudos podem contribuir para inovações no tratamento de infecções de pele e tecidos moles, oferecendo alternativas viáveis que melhorem a saúde pública e a qualidade de vida da população (WANG; HU; SHAO, 2017).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pele

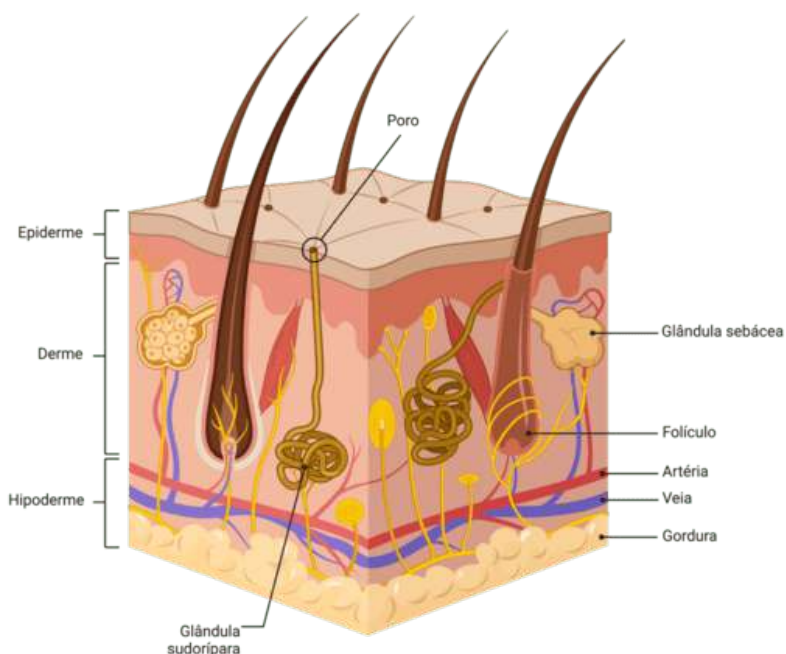
A pele consiste no maior órgão do corpo humano e desempenha funções vitais na proteção, regulação da temperatura e na percepção sensorial. Com uma superfície que pode atingir até 2 metros quadrados, a pele não apenas envolve e protege os órgãos internos, mas também atua como uma barreira dinâmica entre o corpo e o ambiente externo (CASTAÑEDA-REYES *et al.*, 2020). Sua estrutura é composta por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme, cada uma com funções e características distintas (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa, composta principalmente por queratinócitos, que representam cerca de 90% de suas células. Esses queratinócitos se originam na camada basal e passam por um processo de diferenciação que culmina na produção de queratina, uma proteína fibrosa que confere resistência e impermeabilidade à pele. Essa camada é crucial para evitar a perda excessiva de água e proteger contra agentes patogênicos. Além dos queratinócitos, a epiderme contém melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, que não apenas dá cor à pele, mas também atua como proteção contra a radiação ultravioleta (MUSTAFA *et al.*, 2020).

A derme é rica em colágeno e elastina, proporcionando resistência e elasticidade à pele (MUSTAFA *et al.*, 2020). Essa camada contém uma rede complexa de vasos sanguíneos, nervos, glândulas sudoríparas e sebáceas, que são responsáveis pela produção de suor, que ajuda na regulação da temperatura corporal, e sebo, que protege contra a desidratação. A derme também abriga folículos pilosos, que desempenham um papel na termorregulação e na sensibilidade tátil (MUSTAFA *et al.*, 2020).

A hipoderme, a camada mais profundas, é composta por tecido adiposo e tecido conjuntivo. Esta camada atua como um reservatório de energia e como isolante térmico, ajudando a regular a temperatura corporal. A hipoderme também contém grandes vasos sanguíneos e nervos, que fornecem nutrientes e inervam a pele (ZIMOCH *et al.*, 2021). A integridade dessas camadas é crucial não apenas para a proteção física, mas também

para a comunicação entre o sistema imunológico e o ambiente externo (MATUS; EHRENFELD; FIGUEROA, 2022).

Figura 1. Estrutura da pele diferenciando as 3 camadas que a compõem: epiderme, derme e hipoderme Figura criada com o apoio da Biorender (BioRender.com).



A microbiota cutânea é uma comunidade diversificada de microrganismos que habitam a pele, desempenhando um papel fundamental na saúde cutânea. Este ecossistema inclui uma variedade de bactérias, fungos e vírus que coexistem em equilíbrio e ajudam a regular a função da pele (FOURNIÈRE *et al.*, 2020). Entre as principais bactérias encontradas na pele humana, destacam-se os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Esses microrganismos não apenas competem por recursos e espaço, mas também produzem substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de patógenos (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). A microbiota desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase

cutânea, ajudando a prevenir infecções e outras condições dermatológicas (FOURNIÈRE *et al.*, 2020).

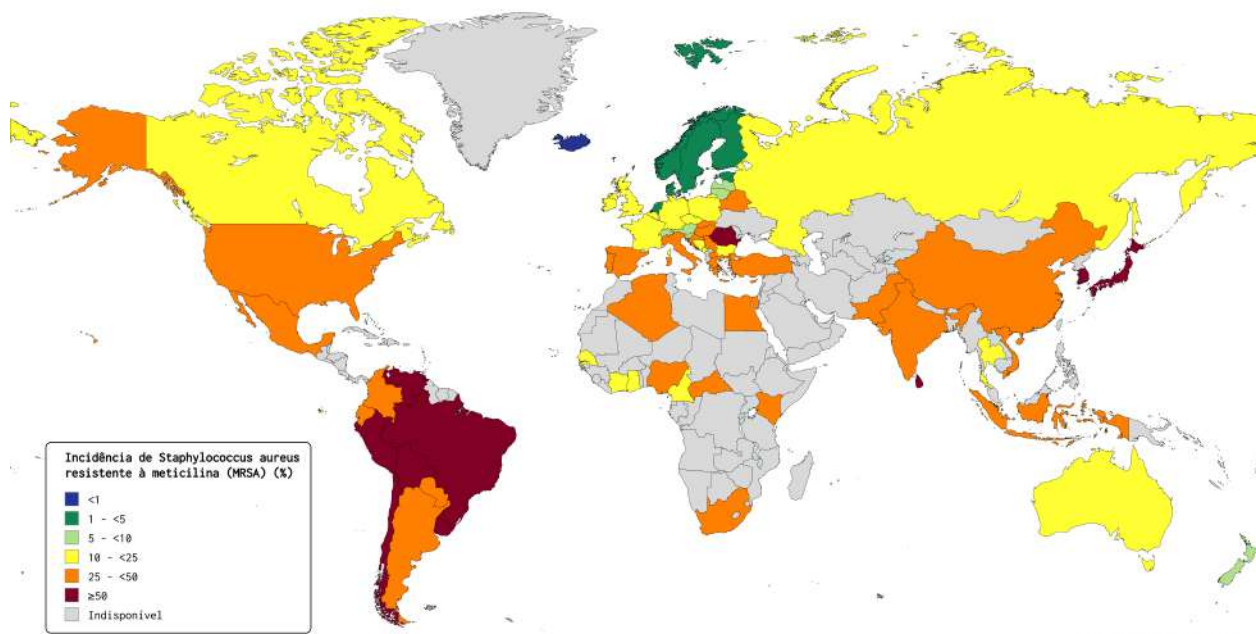
Entretanto, esse equilíbrio pode ser facilmente perturbado por fatores como higiene excessiva, uso indiscriminado de antibióticos, estresse, alterações hormonais e dieta inadequada. Quando a microbiota cutânea é desequilibrada, isso pode levar a um supercrescimento de patógenos oportunistas, resultando em infecções de pele e condições como acne, eczema e dermatite (FOURNIÈRE *et al.*, 2020). A desregulação da microbiota também pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, evidenciando a importância de manter a diversidade microbiana da pele.

Infecções de pele e tecidos moles

As infecções de pele e tecidos moles representam um dos principais desafios na medicina moderna. Podem ser causadas por uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus (FORERO-DORIA *et al.*, 2022). Essas infecções podem ocorrer em indivíduos com pele saudável, mas são mais prevalentes em situações em que a integridade da pele está comprometida, como cortes, queimaduras e doenças crônicas. As infecções bacterianas mais comuns incluem aquelas causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (FORERO-DORIA *et al.*, 2022). A apresentação clínica dessas infecções pode variar de leve a grave, e o tratamento inadequado pode resultar em complicações significativas.

S. aureus consiste em um dos patógenos mais prevalentes associados a infecções cutâneas (LINZ *et al.*, 2023). Este microrganismo é versátil e pode causar uma ampla gama de infecções, desde furúnculos e celulite até condições mais graves, como pneumonia e septicemia. Um dos principais desafios associados a *S. aureus* é a resistência antimicrobiana, particularmente a resistência à meticilina (MRSA) (NAZLI *et al.*, 2024) (Figura 2). O surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos complicou significativamente o tratamento dessas infecções, exigindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (NAZLI *et al.*, 2024).

Figura 2. Prevalência mundial de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).



As infecções de pele não apenas causam dor e desconforto, mas também impactam significativamente a qualidade de vida dos pacientes (MALLICK *et al.*, 2022). O tratamento geralmente envolve a administração de antibióticos, que podem ser eficazes em muitos casos, mas a crescente resistência a esses medicamentos levanta preocupações sobre sua eficácia a longo prazo (KARNAM *et al.*, 2023). Medidas de controle de infecção, como desinfecção de feridas e uso de curativos apropriados, são fundamentais na prevenção da colonização por patógenos.

Diante deste cenário desafiador, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é de extrema importância. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) emergem como uma alternativa promissora no combate às infecções de pele e tecidos moles (RĂILEANU *et al.*, 2023). Os PAMs são fragmentos de proteínas que possuem atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos. Além disso, os avanços na nanotecnologia levaram ao desenvolvimento de nanopartículas (NP) com propriedades físico-químicas únicas que podem superar várias

limitações em relação aos agentes antimicrobianos convencionais (GURUNATHAN, 2015; YAH; SIMATE, 2015).

Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs), reconhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, são uma das principais alternativas à antibioticoterapia e estão abundantemente distribuídos na natureza (LAKSHMAIAH NARAYANA; CHEN, 2015). Eles estão presentes em todos os organismos, e além de possuírem uma variada diversidade estrutural e funcional, exibem notáveis propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, o que os torna candidatos ideais para o desenvolvimento de novas terapias (SHARMA *et al.*, 2018). Os PAMs são alvo de pesquisas em todo o mundo, devido à sua habilidade em inibir o crescimento ou matar uma variedade de microrganismos responsáveis por patologias em animais, plantas e no homem. Essas moléculas proteicas são tipicamente conhecidas por seu pequeno tamanho e têm sido isoladas de uma ampla variedade de organismos, como bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Os PAMs podem ser categorizados com base em sua composição, bem como em sua estrutura secundária. Assim, os peptídeos podem ser lineares (por exemplo, magaininas e dermaseptinas), ricos em cisteínas (por exemplo, esculentina) ou ricos em certos aminoácidos, como glicina, prolina, arginina e histidina. Os PAMs podem ter uma estrutura em α -hélice, uma estrutura em folha β , uma estrutura mista ou até mesmo uma estrutura estendida (HUAN *et al.*, 2020).

Esses pequenos polipeptídios possuem natureza anfipática e apresentam propriedades hidrofóbicas e catiônicas que facilitam a interação com uma grande variedade de membranas lipídicas, que se tornam alvos para o mecanismo de ação destes peptídeos. Assim, essas moléculas possuem um amplo espectro de atividade contra diversos alvos, como bactérias Gram-positivas e -negativas, fungos, parasitas, vírus, entre outros (KAZEMZADEH-NARBAT *et al.*, 2010). O mecanismo de ação destas moléculas tem sido amplamente estudado desde sua descoberta, entretanto, os

mecanismos pelos quais os peptídeos permeabilizam a membrana e como exercem sua função antimicrobiana ainda não estão totalmente definidos e vários mecanismos têm sido propostos para descrever as interações entre esses peptídeos e bicamadas lipídicas (TORRES *et al.*, 2019).

Muitos PAMs podem apresentar um efeito sinérgico nas infecções bacterianas se usado com antibióticos (COTE *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019). As bacteriocinas também tem um papel importante no tratamento de infecções bacterianas. Por exemplo, a nisina apresentou resultados promissores no tratamento de infecções bacterianas por *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) e enterococos resistentes à vancomicina (VRE) (FIELD *et al.*, 2016). Plectasina é outro PAM, pertencente à classe das defensinas, que demonstrou atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (LI *et al.*, 2017).

Além de possuírem atividades antimicrobianas, os PAMs geralmente atacam as células do hospedeiro e previnem a infecção de maneira indireta, fornecendo proteção por mecanismos alternativos, como a manutenção da homeostase e a regulação das respostas inflamatórias, gerando uma vantagem adicional sobre os antibióticos (WANG *et al.*, 2016). Dentre as inúmeras substâncias antimicrobianas, uma das classes mais conhecidas são as chamadas catelicidinas. As catelicidinas, juntamente com as defensinas, pertencem a um grande grupo de peptídeos catiônicos com propriedades anfipáticas e são um componente chave do sistema imunológico de muitos vertebrados, incluindo humanos (BALS; WILSON, 2003). As catelicidinas consistem em pequenos peptídeos que receberam esse nome devido ao seu domínio catelina conservado. A catelicidina foi descrita pela primeira vez no inseto *Hyalophoracecropia*, após mais de 10 anos de pesquisa sobre seu sistema imunológico (HULTMARK *et al.*, 1980). Outro membro muito conhecido da família das catelicidinas é a magainina, isolada da pele do sapo *Xenopus leavis*, em 1987 (MCMILLAN; COOMBS, 2020; ZASLOFF, 1987). Em mamíferos, as primeiras catelicidinas pareciam muito ser bacteriocinas, isoladas de neutrófilos bovinos, que foram nomeadas Bac5 e 7 (GENNARO; SKERLAVAJ; ROMEO, 1989). Entretanto, alguns autores sugerem que a primeira catelicidina de mamíferos foi isolada de uma espécie de coelho e denominada CAP18 (HIRATA *et al.*, 1994).

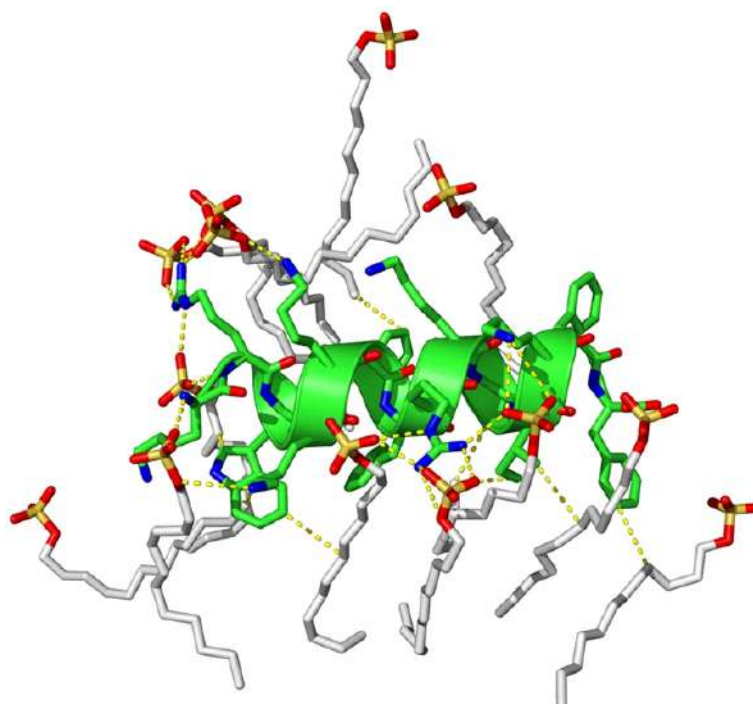
As catelicidinas geralmente apresentam atividade antimicrobiana contra várias espécies de bactérias Gram-positivas e -negativas. Certas catelicidinas podem ser eficazes também para eliminar isolados clínicos de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, ou *P. aeruginosa* que podem ser resistentes ao tratamento com antibióticos convencionais (ZANETTI, 2005). Catelicidinas também demonstram atividade contra certos fungos, parasitas e vírus (GIACOMETTI, 2003; PETER BERGMAN *et al.*, 2007)

A partir de bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonha de serpentes *Bothrops atrox*, o peptídeo batroxidina foi identificado (FALCAO *et al.*, 2014). Assim como outras catelicidinas de peçonhas de serpente, a batroxidina apresenta em sua estrutura primária um peptídeo sinal previsto, seguido pelo domínio catelina, altamente conservado e dobrado por duas pontes dissulfeto, e uma região C-terminal com uma sequência dinâmica (FALCAO *et al.*, 2014). Posteriormente, foi demonstrado que apenas um pequeno fragmento da região C-terminal da crotalidina (fragmento 15–34), denominado Ctn[15–34], era altamente ativo contra diversos microrganismos, enquanto a sequência N-terminal apresentou baixa atividade antimicrobiana (FALCAO *et al.*, 2015). O mesmo foi observado para a batroxidina.

A partir da sequência Btn[15-34] (15KKRVKKFFRKPRVIGVTFPF34) de batroxidina foi proposto o desenho racional de PAMs para ajustar a anfipaticidade, grau de helicidade e carga, afim de melhorar ainda mais sua utilidade como futuros medicamentos antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Inicialmente, a sequência parental foi mapeada em um diagrama de roda helicoidal para identificar as faces catiônicas e hidrofóbicas de Btn[15-34] quando dobradas em uma α -hélice. Com base nesses diagramas, uma série de modificações foram realizadas para reduzir seu tamanho e aumentar a anfipaticidade helicoidal, com o objetivo de excluir resíduos de aminoácidos não favoráveis para a superfície eletrostática, mantendo uma alternância entre resíduos carregados positivamente e hidrofóbicos. Os resíduos de aminoácidos K1, V4, P11, R12, G15, V16, T17 e P19 foram removidos, seguido pela adição de resíduos de triptofano e lisina nas posições 3 e 12, respectivamente, gerando o BotrAMP14 (KRWKKFFRKVIKFF-NH2).

O BotrAMP14 (Figura 3) consiste em um peptídeo que, em um ambiente semelhante a uma membrana, adota uma estrutura α -helicoidal que pode interagir com fosfolípidios da bicamada através de pontes de hidrogênio e interação eletrostática. Além disso, possui propriedades antibacterianas semelhantes ao seu peptídeo parental, mas menor citotoxicidade, apresentando vantagens para estratégias de desenvolvimento de novos medicamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Figura 3. Estrutura tridimensional do BrotAMP14 visualizada após 800 ns de simulações de dinâmica molecular. Os bastões brancos representam moléculas de sódio docecil sulfato (SDS) selecionadas que estão envolvidas na estabilização da estrutura secundária do peptídeo. Figura adaptada de OLIVEIRA *et al.*, 2020.



Os peptídeos, apesar de possuírem efeitos bactericidas potentes e alto potencial do desenvolvimento como novos fármacos, apresentam algumas limitações que dificultam o processo de convertê-los em agentes terapêuticos. Estabilidade baixa, toxicidade, meia vida curta, alto custo de produção e biodisponibilidade oral reduzida são

algumas dessas barreiras (DIJKSTEEL *et al.*, 2021; FRY, 2018; YE; CHI, 2018). Uma estratégia promissora que vem sendo desenvolvida para contornar esses inconvenientes consiste na incorporação dessas moléculas em nanocarreadores. A nanotecnologia, através destas plataformas de liberação, pode ser capaz de superar as limitações e aumentar a eficácia e utilidade dos peptídeos (JALLOUK *et al.*, 2015). Além disso, as nanoformulações surgem como uma estratégia promissora para aprimorar a administração transdérmica de medicamentos. Seu tamanho reduzido facilita a penetração através da barreira cutânea, o que aumenta a eficácia do transporte na administração transdérmica e aumenta a biodisponibilidade de fármacos (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020).

Nanobiotecnologia aplicada à liberação de peptídeos antimicrobianos

O desenvolvimento de estruturas nanométricas complexadas a moléculas terapêuticas tem mostrado um impacto significativo na elaboração de novos medicamentos (BEZERRA *et al.*, 2022). Os produtos empregados se diferenciam em tamanho, forma, composição e propriedades físico-químicas podendo variar em área de superfície e a reatividade da molécula. Essas características irão promover uma melhora na solubilidade, no tempo de meia-vida da molécula, uma diminuição da toxicidade a partir da capacidade de direcionamento do fármaco para o sítio de ação específico e ainda permitir a aplicação por várias vias de administração (PINTO REIS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2013).

Sistemas nanoparticulados têm sido propostos para a internalização de medicamentos antimicrobianos no ambiente intracelular, levando a um aumento no índice terapêutico antimicrobiano em locais de infecção (LECAROZ, 2006; SALOUTI; AHANGARI, 2014) Como sua pequena escala é próxima à das moléculas biológicas, as nanoestruturas fornecem novas abordagens para o tratamento de doenças (MUBEEN *et al.*, 2021; WIESENTHAL *et al.*, 2011). Eles têm vários benefícios, quando comparados aos sistemas convencionais, e se apresentam como carreadores de moléculas de alta estabilidade, alta capacidade de transporte e de combinar moléculas hidrofílicas e

hidrofóbicas, além de atravessar várias barreiras biológicas e ser identificado na região alvo (DIN *et al.*, 2017; JHAVERI; TORCHILIN, 2014). As nanoestruturas podem operar como carreadores ou como o próprio medicamento ativo, com padrões de liberação regulados (LEE; YEO, 2015).

Nesse contexto, a nanoencapsulação demonstra-se uma alternativa promissora para armazenamento e administração de peptídeos bioativos, uma vez que possui a capacidade de proteger o peptídeo de proteólise, interações indesejadas com fluidos biológicos, permite uma liberação modificada, duradoura e direcionada da molécula (SANDRESCHI *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstram que peptídeos antimicrobianos nanoencapsulados apresentam resultados satisfatórios frente a cepas de importância médica, como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, confirmando o quanto essas formulações podem ser uma boa alternativa para o tratamento de doenças infecciosas (CRUZ *et al.*, 2017; PIRAS *et al.*, 2015; WATER *et al.*, 2015).

Materiais de diversas naturezas têm sido utilizados no preparo das nanoestruturas, como proteínas hidrossolúveis (XIAO; NIAN; HUANG, 2015), lipídeos fisiológicos (LUO *et al.*, 2015) e polímeros, como alginato e quitosana (KLEINE-BRUEGGENEY *et al.*, 2015). A quitosana tem se destacado por apresentar baixa toxicidade, biocompatibilidade e boa capacidade de formar géis, além de controlável auto-agregação e promoção de bioadesão (XIAO; NIAN; HUANG, 2015). Este polímero, quando presente em nanomateriais, tem seu efeito antimicrobiano potencializado por aumento da superfície de contato, o que acarreta maior interação com os microrganismos, causando ruptura de membrana celular, interferindo na transcrição e transdução do DNA e na respiração celular (LANDRISCINA; ROSEN; FRIEDMAN, 2015). Sendo assim, a nanoencapsulação com quitosana se apresenta como uma alternativa promissora para administração de peptídeos.

O mecanismo por trás da atividade antimicrobiana da quitosana se deve à sua natureza catiônica que faz com que ela se ligue com o ácido siálico em fosfolipídios, limitando a movimentação de agentes microbiológicos (RANA *et al.*, 2022). Além disso, a quitosana penetra nas células de microrganismos e inibe o crescimento de células

impedindo a conversão de DNA em RNA (SASHIWA; AIBA, 2004; YAN *et al.*, 2021). Outras propriedades biológicas da quitosana incluem atividade antioxidante, anti-colesterolêmica, imunoadjuvante, hemostática, antiácida e analgésica (CASADIDIO *et al.*, 2019; HOFFMAN, 2012; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015; ZHU *et al.*, 2004).

Neste contexto, a quitosana tem sido um produto amplamente utilizado para liberação modificada de fármacos. Sua capacidade de permanecer carregada positivamente permite um maior tempo residual do fármaco no local de absorção e um aumento na permeabilidade das membranas, ou seja, seus grupos amina protonados interagem com os sítios carregados negativamente nas superfícies celulares, resultando em um tempo maior de permanência no sítio de absorção, o que pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade, favorecendo sua utilização na forma de nanoestruturas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; SOUZA *et al.*, 2020). Além disso, a quitosana é um polímero compatível com tecidos vivos e se degrada a metabólitos completamente absorvidos pelo organismo (LI; ELANGO; WU, 2020).

Outro polímero, o alginato de sódio, consiste em um polissacarídeo hidrofílico extraído de algas marinhas castanhas da família *Phaeophyta* e se apresenta na forma de um biopolímero linear composto por dois ácidos urônicos, cuja carga negativa é fornecida pelos grupos carboxílicos dos ácidos inorgânicos. Este polímero apresenta propriedades não tóxicas, biocompatíveis e biodegradáveis, além de ser mucoadesivo, sendo aprovado para aplicações farmacêuticas e alimentícias. A solubilidade do alginato em água depende dos cátions associados a ele, ou seja, o alginato de sódio pode ser solúvel em água, mas quando uma solução com cátions multivalentes é utilizada, o biopolímero pode formar um gel reversível (ABASALIZADEH *et al.*, 2020; AZEVEDO *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstraram que nanopartículas de compostos de óxido de ferro revestidas com quitosana impediram o desenvolvimento do biofilme, além de diminuir a quantidade de bactérias viáveis (SHI *et al.*, 2016). Os nanocarreadores podem ser conjugados ou integrados com vários antimicrobianos para aumentar a atividade farmacológica contra *S. aureus* sensível e resistente, tornando a liberação de medicamentos a partir de nanoestruturas um método apropriado para combater a infecção por *S. aureus*.

As nanoestruturas podem aumentar a permeabilidade de medicamentos dentro das células, além de aumentar a eficácia antibacteriana dos antimicrobianos, aumentar a difusão de medicamentos liberados para o alvo principal, aumentar a absorção celular e melhorar a liberação de antibióticos adsorvidos ou aprisionados em nanoestruturas (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020). Nanopartículas de quitosana contendo vancomicina tiveram um efeito bactericida maior que a vancomicina livre contra *S. aureus* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). A infecção intracelular por *S. aureus* também foi inibida por nanopartículas de quitosana contendo tetraciclina (MAYA *et al.*, 2012).

A utilização de nanoestruturas como veículos de transporte e entrega de agentes bactericidas representam um novo paradigma na concepção da terapêutica antibacteriana. A liberação modificada de fármacos visa o controle temporal e espacial da concentração de fármacos promovendo o benefício da administração destes e a redução dos efeitos adversos (LEE; YEO, 2015). Formas farmacêuticas convencionais muitas vezes resultam em grandes variações nas concentrações séricas do fármaco. A maioria do conteúdo da molécula é liberada logo após a administração, fazendo com que os níveis de concentração subam rapidamente, gerando um pico, culminando num subsequente declínio acentuado (RAVI KUMAR, 2000). A liberação modificada implica a associação dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas capazes de controlar a taxa de liberação do fármaco e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar (RAVI KUMAR, 2000).

Uma nova dimensão consiste na inclusão de biodegradabilidade no sistema. Muitos polímeros degradáveis são potencialmente úteis para esta finalidade, incluindo materiais sintéticos e naturais. A liberação de fármacos, adsorvidos ou encapsulados por polímeros, envolve a sua difusão lenta e controlável através de materiais poliméricos. Fármacos ligados a polímeros biodegradáveis ou dispersos numa matriz polimérica dessas macromoléculas podem ser liberados por erosão ou degradação do polímero. Moléculas terapêuticas, complexadas por polímeros, também podem ser liberadas a partir de gel por difusão (GASCON *et al.*, 2020; PRAMANIK; GARG, 2019; RAVI KUMAR, 2000).

OBJETIVO

Objetivo geral

Desenvolver nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio a fim de encapsular o peptídeo antimicrobiano BotrAMP14 visando o controle de *Staphylococcus aureus* causadora de infecções de pele.

Objetivos específicos

- Sintetizar nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio;
- Nanoencapsular o peptídeo BotrAMP14;
- Caracterizar as nanoestruturas quanto ao potencial zeta, tamanho e índice de polidispersividade utilizando espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Avaliar a estabilidade das nanoestruturas ao longo do tempo;
- Caracterizar as nanoestruturas quanto a morfologia e estrutura utilizando microscopia eletrônica de transmissão criogênica (crio-TEM) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS);
- Caracterizar as nanoestruturas quanto a adsorção utilizando microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D);
- Caracterizar as nanoestruturas quanto a eficiência de encapsulação
- Caracterizar as nanoestruturas quanto a liberação modificada do peptídeo BotrAMP14 utilizando células de Franz modificada para simular a difusão da pele;
- Avaliar a atividade antibacteriana do BotrAMP14 nanoencapsulado *in vitro* utilizando o método de microdiluição em caldo.

METODOLOGIA

Seleção do peptídeo

O peptídeo BotrAMP14, KRWKKFFRKVIKFF-NH₂, foi desenvolvido através do *design* racional por Oliveira e colaboradores (2020) a partir da sequência Btn[15-34] (15KKRVKKFFRKPRVIGVTFF34) do peptídeo batroxidina a fim de melhorar anfipaticidade, grau de helicidade e carga. A sequência parental foi mapeada em um diagrama de roda helicoidal para identificação das faces catiônicas e hidrofóbicas de Btn[15-34]. Diversas modificações foram realizadas, com base nesses diagramas, incluindo a remoção de 8 resíduos de aminoácidos das posições 1, 4, 11, 12, 15, 16, 17 e 19 e adição de resíduos de triptofano na posição 3 e lisina na posição 12. Esta nova molécula demonstrou previamente uma atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (OLIVEIRA *et al.*, 2020) e por isso foi selecionado para este estudo.

Síntese peptídica e validação da massa

O peptídeo foi sintetizado utilizando a tecnologia N-9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), com 95% de pureza, pela *Peptide 2.0* (USA). A massa do peptídeo foi confirmada por espectrometria de massa (MALDI-ToF - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*). O peptídeo foi solubilizado em água ultrapura e adicionando a solução de matriz constituída por ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (contendo a concentração final de matriz de 10 mg.ml⁻¹, 10% de ácido trifluoracético 3%, 50% de acetonitrila e 40% de água ultrapura). O espectro de massa foi adquirido na faixa 700 a 3500 m/z, com o método refletido positivo, no aparelho *Auto Flex Speed* (Bruker Daltonics, Alemanha), calibrado utilizando *Peptide Calibration Standard II*.

Quantificação do BotrAMP14 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase reversa (RP-HPLC)

Inicialmente o perfil cromatográfico do peptídeo foi avaliado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando uma coluna de fase reversa C18 Shimadzu Shimpack VP-ODS (4,6 μ m, 150 x 4,6 mm). A fase móvel foi constituída de água ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (A) e acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (B). Foram injetados 20 μ L de uma solução do peptídeo a 400 μ M. O fluxo de eluição foi de 0,6 ml.min⁻¹, utilizando como método um gradiente otimizado: 5 min (20%B), 5-20 min (20-60%B), 20-22 min (95%B). A eluição foi monitorada nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. A fração referente ao peptídeo foi coletada e a relação massa/carga confirmada por MALDI-ToF-MS. Para verificar a linearidade do método e realizar a quantificação do BotrAMP14 foram feitas soluções padrão do peptídeo nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 μ M. As soluções foram submetidas à cromatografia líquida, nas condições acima. Os cromatogramas obtidos foram processados no *software Labsolution*, Shimadzu, onde as áreas dos picos foram calculadas. A curva analítica foi construída relacionando-se a concentração do BotrAMP14 com área do pico fornecido pelo aparelho após injeção das amostras padrão.

Síntese de nanoestruturas de quitosana

As nanoestruturas de quitosana foram desenvolvidas pela técnica de gelificação ionotrópica (CALVO *et al.*, 1997). Para a síntese das nanoestruturas, soluções de quitosana contendo o ácido acético (1%, v/v) foram preparadas e mantidas sob agitação, *overnight*. Sob estas soluções foram gotejadas soluções contendo alginato de sódio e o agente reticulante tripolifosfato de sódio (TPP). A reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo proporcionou a formação de nanoestruturas. Assim, a técnica foi otimizada variando parâmetros críticos do processo. Foram testadas diferentes concentrações da solução inicial de quitosana (1; 1,25 e 1,75 mg.ml⁻¹), da solução inicial de alginato de

sódio (0,3 e 0,5 mg.ml⁻¹) e TPP (0,75 e 1 mg.ml⁻¹), mantendo-se a concentração de ácido acético, agitação magnética a 600 rpm, temperatura ambiente e pH 4,7

Quadro 1. Concentrações e proporções de quitosana (CS), alginato de sódio (ALG) e tripolifosfato de sódio (TPP) utilizadas na padronização e obtenção de nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG).

Amostra	Quitosana (mg.ml⁻¹)	Alginato de sódio (mg.ml⁻¹)	TPP (mg.ml⁻¹)
CS-TPP-ALG_1	1,75	0,50	1,00
CS-TPP-ALG_2	1,25	0,50	1,00
CS-TPP-ALG_3	1,00	0,30	0,75

*CS-TPP-ALG: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio.

Para a nanoencapsulação do BotrAMP14, a quitosana foi solubilizada em uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) cerca de meia hora antes da adição do peptídeo ao sistema. Após a adição do peptídeo, a mistura foi agitada para garantir a dissolução de todos os componentes. A solução de alginato de sódio - TPP foi então gotejada lentamente para a obtenção das nanoestruturas, e o sistema foi deixado sob agitação magnética por mais 10 min.

Tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade das partículas foi analisado por espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta por mobilidade eletroforética. Para a análise, 1 mL da suspensão coloidal das nanoestruturas foi analisada logo após sua obtenção em um aparelho *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, EUA) (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 2021). Para análise do potencial zeta foram acrescentados o

equivalente à 3 mM de NaCl à suspensão coloidal de partículas, para garantir a condutividade adequada para a correta leitura das amostras (MATOS *et al.*, 2015).

Os estudos de estabilidade das nanoestruturas foram conduzidos utilizando alíquotas de nanoestruturas de quitosana contendo o peptídeo BotrAMP14 armazenadas na geladeira à temperatura de 5 ± 3 °C. O estudo teve como finalidade observar possíveis alterações no tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanoestruturas 30 dias após a síntese.

Avaliação morfológica das nanoestruturas

Experimentos de crio-TEM foram realizados usando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-2200FS (JEOL) no *National Center for High-Resolution Electron Microscopy (nCHREM)*, na *Lund University*. Uma câmera TemCam-F416 montada na parte inferior (TVIPS) foi empregada para registrar imagens de perda zero a uma voltagem de aceleração de 200 kV. Gotículas de 4 µL das amostras foram depositadas em uma grade revestida de carbono *formvar* rendado (Ted Pella) e enxugadas com papel de filtro para remover o excesso de fluido. A grade foi então mergulhada em etano líquido (-180 °C) para garantir a vitrificação rápida. As amostras foram então armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C) e transferidos para o microscópio logo antes da aquisição da imagem, empregando um suporte de tomografia de transferência criogênica (*Fischione* Modelo 2550). A análise de imagem foi realizada com o software ImageJ (COLLINS, 2007; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, *Small-angle X-ray scattering*)

Padrões de espalhamento de raios-X a baixo ângulo das nanoestruturas foram adquiridos com um instrumento SAXSLab Ganesha (JJ-Xray, Dinamarca), equipado com uma microfonte de raios-X de Cu de 30 W (Xenocs, França) e um detector Pilatus 2D de 300 K (Dectris, Suíça). As medições foram realizadas com um feixe colimado de orifício de agulha com o detector posicionado assimetricamente a uma distância de 480 mm da

amostra, para produzir intensidades médias azimutais como uma função do vetor de espalhamento (q) no intervalo de 0,012 a 0,5 Å⁻¹. A magnitude do vetor de espalhamento é definida por $q = (4\pi\sin\theta)/\lambda$, onde λ é igual a 1,54 Å, equivalente ao comprimento de onda Cu K α e θ é metade do ângulo de espalhamento. A escala q foi calibrada usando behenato de prata (CH₃–(CH₂)₂₀–COOAg) como padrão.

As amostras foram inseridas em células capilares de quartzo de 1,5 mm e colocadas em um estágio de termostato a 25 °C, controlado usando um *Julabo T Controller* CF41 (*Julabo Labortechnik GmbH*, Alemanha), e equilibrado por 1800s antes das medições.

Microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D, *Quartz crystal microbalance with dissipation*)

Os experimentos de adsorção foram realizados em uma microbalança de cristal de quartzo com dissipação Q-Sense E4 (Q-Sense, Gotemburgo, Suécia). Tubulações, células e anéis de vedação foram limpos primeiro em solução *Hellmanex* a 2% (Sigma Aldrich) e enxaguados em água ultrapura e etanol (99,9%, Sigma Aldrich) antes de secar sob nitrogênio. Os sensores SiO₂ foram limpos da mesma forma antes do tratamento com UV-ozônio por 10 min (*BioForce Procleaner*, *Bioforce Nanosciences*, Salt Lake City, EUA), resultando em superfícies altamente hidrofílicas. Durante os experimentos, uma vazão de 0,1 mL.min⁻¹ (bomba peristáltica Ismatec IPC de 4 canais, Cole-Parmer GmbH, Alemanha) e uma temperatura constante de 25 °C foram definidas. Água ultrapura foi bombeada até atingir a estabilização por 5 min como linha de base. Após atingir uma linha de base estável de mudanças de frequência (ΔF) e dissipação (ΔD) sob fluxo de água ultrapura de 0,1 mL min⁻¹ (controlado por uma bomba peristáltica), as superfícies de SiO₂ foram seguidas pela injeção de nanoestruturas CS-TPP-ALG por 30 min e enxaguadas. Então, o BotrAMP14 em 100 μ M foi injetado. Mudanças na frequência (ΔF) e dissipação (ΔD) confirmaram a adsorção de peptídeos às nanoestruturas. Isso foi seguido pela lavagem com 10 mM Tris HCl pH 7,4 e 10 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4. Para a segunda análise, bicamadas de lipídios 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-

Fosfatidilcolina (POPC) e 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) (75/25 mol/mol) foram preparadas pela deposição de SUVs (pequenas vesículas unilamelares) em superfícies de SiO₂ (QSense QSX 303 SiO₂, 4,95±0,05 MHz, 14 mm de diâmetro, 0,3 mm de espessura, 17,7 ng.cm⁻² de sensibilidade de massa). Suspensões de SUV (0,1 mg.mL⁻¹ em MQ) foram injetadas nas células por 5 min, seguidas de enxágue de MQ para remover o excesso de lipossomas. A deposição de SUV, ruptura e formação completa de bicamadas foram confirmadas por mudanças de frequência (ΔF) de -23±1 Hz e mudanças de dissipação (ΔD) de 0,25±0,25×10⁻⁶. Isso foi seguido pelo bombeamento de nanoestruturas CS-TPP-ALG-BotrAMP14.

Eficiência de encapsulação

A eficácia de encapsulação foi determinada por RP-HPLC, em que foi aplicado o filtrado da dispersão coloidal de nanoestruturas, após centrifugação a 4000 g por 1h em temperatura ambiente em um dispositivo com tamanho de poro definido em 10kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha), obtendo-se a concentração de BotrAMP14 não encapsulado ($[]_{obtida}$) (MATOS *et al.*, 2020). A concentração de BotrAMP14 encapsulado foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de peptídeo adicionado ($[]_{teórica}$) e a concentração de BotrAMP14 não encapsulado obtida. A eficiência de encapsulação, então, foi calculada da seguinte forma:

$$EE(\%) = \frac{([]_{teórica}) - ([]_{obtida})}{[]_{teórica}} \times 100$$

onde: EE% é a eficiência de encapsulação do BotrAMP14 na nanoestrutura; $[]_{obtida}$ é a concentração de BotrAMP14 que não foi encapsulado nas nanoestruturas de quitosana; e $[]_{teórica}$ é a concentração de BotrAMP14 que foi inicialmente colocada para preparo das nanoestruturas.

Estudo *in vitro* de liberação do BotrAMP14 a partir das nanoestruturas

A influência das nanoestruturas de quitosana desenvolvidas na velocidade de liberação do BotrAMP14 foi verificada *in vitro* por meio de um ensaio de liberação. Este ensaio foi realizado utilizando-se células de difusão de Franz modificada e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (MATOS *et al.*, 2015, 2020). No compartimento receptor da célula uma solução PBS, pH 7,4, mantida a 32 °C durante todo o tempo de experimento. Essa solução foi sendo reposta ao compartimento receptor à medida que, de 1 h em 1h, foram coletadas para análise de 1 ml de solução receptora ao longo de 24 h de experimento. No compartimento doador foi adicionado 1 ml da NP CS-TPP-ALG-BotrAMP14. Como controle, ou seja, para eliminar o efeito da membrana no controle da liberação do peptídeo, um experimento semelhante foi realizado colocando-se no compartimento doador 1 ml de uma solução aquosa do peptídeo. O experimento foi realizado em triplicata para cada formulação. A quantidade de peptídeo liberada foi determinada por meio do método de quantificação do BotrAMP14.

Para se determinar a quantidade de peptídeo liberado que se difunde através da membrana hidrofílica foi necessário realizar um cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{realt} = C_{mensurado} \times V_r + V_a \times \sum n - 1 C_a,$$

onde: Q_{realt} representa a quantidade acumulada real de peptídeo no tempo t ; $C_{mensurado}$ refere-se à concentração mensurada de peptídeo na amostra coletada no tempo t ; V_r corresponde ao volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a corresponde ao volume de amostra removida durante a coleta; e C_a , à concentração de peptídeo na amostra removida.

Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

Para determinar se o peptídeo mantinha a atividade quando nanoencapsulado foi empregado o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração

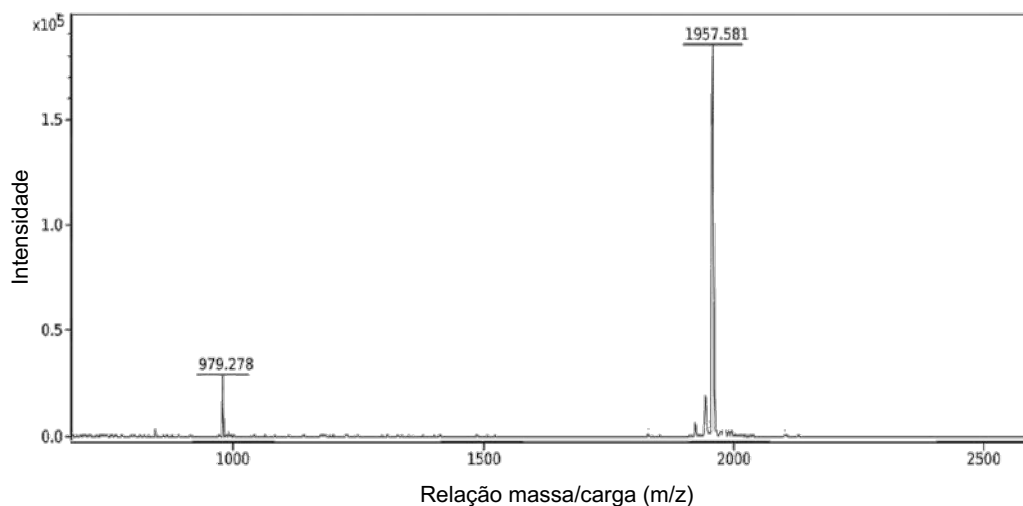
inibitória mínima (CIM) (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). Uma colônia isolada foi inoculada em caldo *Mueller Hinton*, incubada a 37 °C sob agitação durante 18h e ajustada para obtenção de uma concentração de 1×10^6 UFC.ml⁻¹. Foram realizadas diluições seriadas com as nanoestruturas contendo o peptídeo em um volume de 50 µL e em seguida foram adicionados 50 µL de suspensão bacteriana contendo 10^6 células na fase logarítmica de crescimento em cada poço. Em seguida a placa foi levada para estufa à 37 ° C por 24 h. A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada por densidade óptica utilizando um leitor de microplacas e um comprimento de onda de 595 nm. A menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi definida como a CIM.

RESULTADOS

Análise do peptídeo por espectrometria de massa

O peptídeo sintetizado foi confirmado por espectrometria de massa a fim de assegurar a eficácia dos ensaios biológicos. A massa esperada do peptídeo BotrAMP14 sintetizado é de 1957,46 Da. O espectro de massa foi o registro da intensidade, abundância e razão da massa sobre a carga do peptídeo. O espectro obtido (Figura 4) apresentou uma massa de 1957,58 Da, com $[M+H]^+$, sendo muito próxima do valor esperado. Além do íon que representa o peptídeo, um íon com carga menor, de aproximadamente 979,27 Da, também foi identificado e pode ser representado pelo peptídeo duplamente carregado, confirmando a identidade do peptídeo BotrAMP14 na amostra em questão.

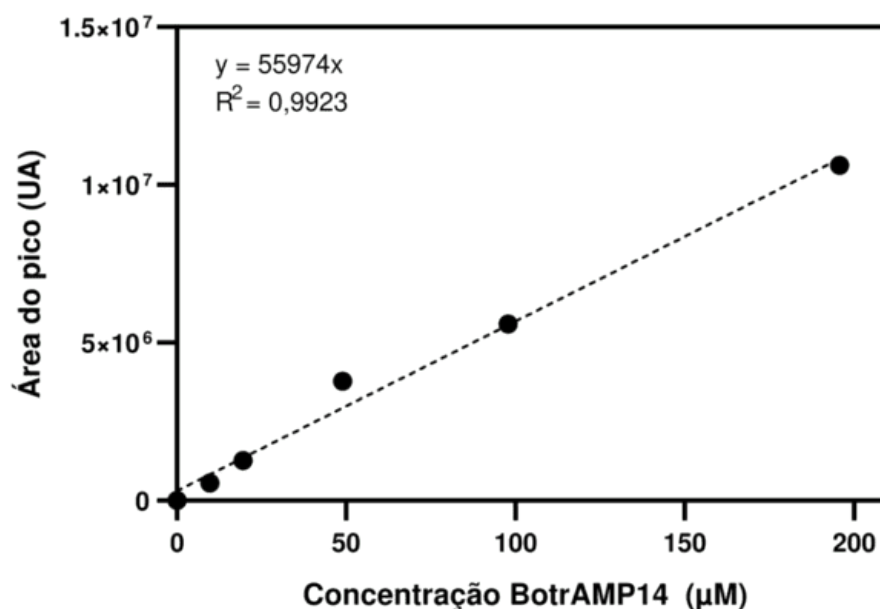
Figura 4. Espectro de massa do peptídeo sintetizado gerado no equipamento MALDI-ToF obtido no modo de ionização positiva, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.



Método analítico para quantificação do BotrAMP14

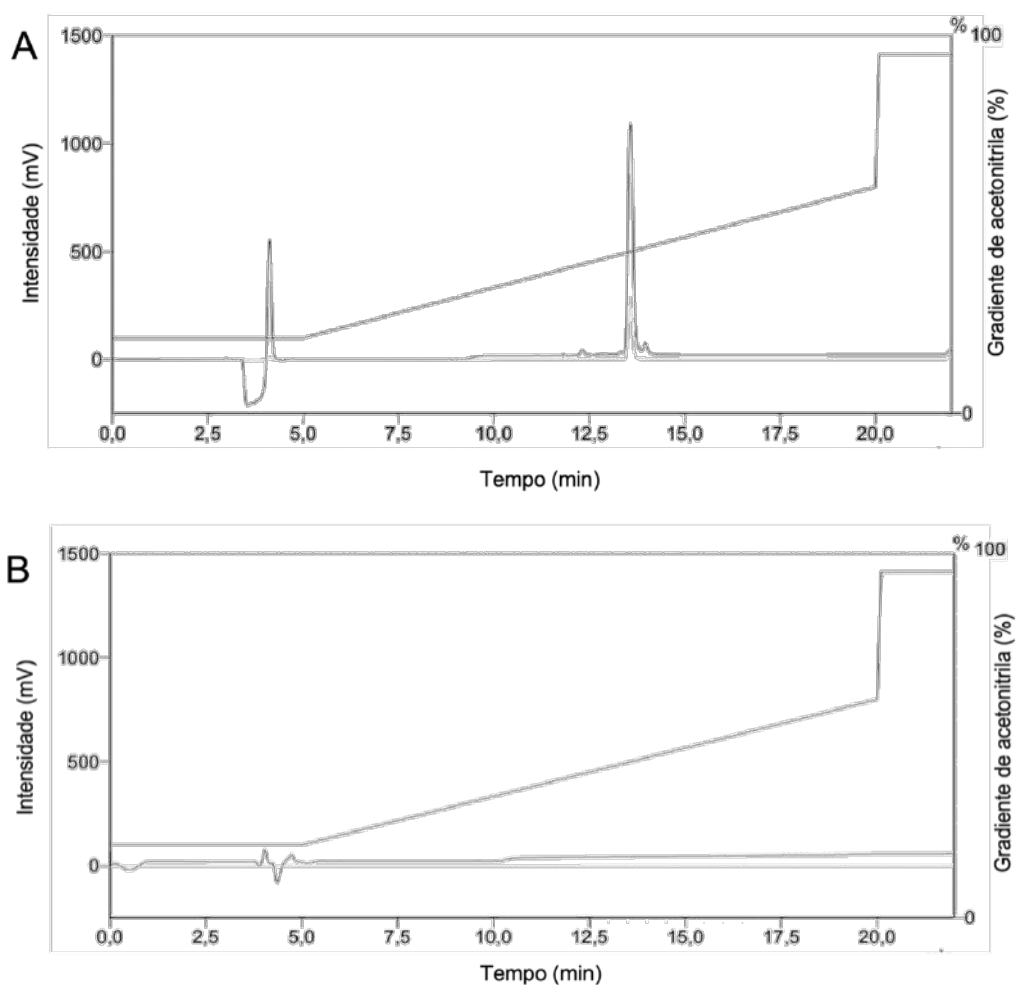
Para quantificação do peptídeo por cromatografia, o método precisou ser otimizado, padronizado e uma curva com soluções padrão do peptídeo (0 a 200 μM) foi obtida (Figura 5). A Figura 5 mostra a curva analítica obtida para o BotrAMP14 na faixa de concentração de 0 a 200 μM . A partir da análise de regressão linear foi possível afirmar que o método apresentou linearidade, uma vez que o coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9923. A linearidade é o parâmetro definido como a capacidade de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração da substância a ser determinada (RIBANI *et al.*, 2004). A correlação entre o sinal medido e a concentração obtida experimentalmente pode ser expressa a partir da equação de reta da curva analítica (Figura 5).

Figura 5. Curva analítica obtida para quantificação do peptídeo BotrAMP14 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ($y = 55974x$; $r = 0,9923$).



Além da linearidade do método, a especificidade ou seletividade também foi avaliada, visualizando a ausência de interferências pelos excipientes que fazem parte das nanoestruturas. O peptídeo BotrAMP14 apresentou um tempo de retenção de 13,6 min (Figura 6A).

Figura 6. Cromatograma referente a uma solução do peptídeo BotrAMP14 na concentração de 100 μM (A) e referente ao filtrado da dispersão coloidal de nanoestruturas vazias (B). Volume de injeção: 50 μL . Fases moveis: água ultrapura acidificada com ácido trifluoracético (TFA) 0,01% (A) e Acetonitrila acidificada com TFA 0,01% (B).



Para garantir que nenhum componente da matriz interfere na especificidade do método também foi avaliado o cromatograma da dispersão coloidal das nanoestruturas de quitosana (Figura 6B). A análise dessas figuras permite concluir que o método se mostrou seletivo para a dosagem do BotrAMP14.

Síntese e caracterização de nanoestruturas de quitosana

Inicialmente foram utilizadas diferentes concentrações e proporções de quitosana (CS) e alginato de sódio (ALG)/TPP (Quadro 1) para padronização e obtenção da nanoestrutura (CS-TPP-ALG) com as melhores características (tamanho, PDI e potencial zeta) para seguir para a nanoencapsulação do peptídeo.

Após a síntese, as nanoestruturas, preparadas usando-se concentrações e proporções diferentes da solução de quitosana (1,75, 1,25 e 1 mg.ml⁻¹) em relação à solução de alginato de sódio (0,5 e 0,3 mg.ml⁻¹) e TPP (1 e 0,75 mg.ml⁻¹), foram caracterizadas (Tabela 1) quanto o tamanho médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta.

Tabela 1. Caracterização das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG) sintetizadas a partir das concentrações indicadas no Quadro 1.

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (+mV)
CS-TPP-ALG_1	658,03 ± 122,49	0,692 ± 0,18	34,55 ± 0,77
CS-TPP-ALG_2	1207,66 ± 182,48	0,783 ± 0,28	20,16 ± 0,28
CS-TPP-ALG_3	204,03 ± 9,71	0,27 ± 0,01	26,03 ± 1,95

*CS-TPP-ALG: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio.

O PDI apresentado por todas as nanoestruturas foi variado, sendo que as nanoestruturas com as menores concentrações de quitosana, alginato de sódio e TPP apresentaram um PDI em torno de 0,3. Este resultado sugere que as nanoestruturas obtidas se encontram monodispersas. Todas as partículas apresentaram valores de potencial zeta acima de 20 mV garantindo a estabilidade da suspensão (CALVO *et al.*, 1997).

Após essas caracterizações, foi escolhida a CS-TPP-ALG_3 para ser utilizada como base para a síntese de nanoestruturas contendo o peptídeo, visto que foi a amostra que obteve os resultados mais satisfatórios. Após a padronização, as nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) foram sintetizadas e analisadas com relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio vazias (CS-TPP-ALG) e contendo 100 μ M do peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14).

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (+mV)
CS-TPP-ALG*	204,03 $\pm$ 9,71	0,27 $\pm$ 0,01	26,03 $\pm$ 1,95
CS-TPP-ALG-BotrAMP14**	187,73 $\pm$ 11,90	0,27 $\pm$ 0,01	30,37 $\pm$ 1,56

*CS-TPP-ALG: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio vazias

**CS-TPP-ALG-BotrAMP14: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio contendo o peptídeo BotrAMP14

Estabilidade das nanoestruturas de quitosana

A estabilidade das nanoestruturas CS-TPP_ALG e CS-TPP-ALG-BotrAMP14 foi avaliada ao final de 30 dias a partir de amostras armazenadas à temperatura de 5 ± 3 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Não foram avaliadas nanoestruturas armazenadas em temperaturas maiores, uma vez que a própria natureza desses sistemas requer o seu armazenamento em temperaturas abaixo da temperatura ambiente. As análises para se determinar estabilidade das amostras foram realizadas por meio da observação de possíveis alterações do tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização das nanoestruturas de quitosana (1 mg.ml⁻¹) e alginato (0,3 mg.ml⁻¹) vazias (CS-TPP-ALG) e contendo 100 µM do peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14), referente às replicatas armazenadas a temperatura de 5 ± 3 °C por 30 dias.

Amostra	CS-TPP-ALG		CS-TPP-ALG-BotrAMP14	
	Dia 0	Dia 30	Dia 0	Dia 30
Tamanho médio (nm)	204,03 ± 9,71	251,00 ± 5,46	187,73 ± 11,90	214,67 ± 16,47
PDI	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,13	0,27 ± 0,01	0,33 ± 0,11
Potencial zeta (+mV)	26,03 ± 1,95	24,00 ± 1,03	30,37 ± 1,56	27,54 ± 0,34

*CS-TPP-ALG: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio vazias

**CS-TPP-ALG-BotrAMP14: nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio contendo o peptídeo BotrAMP14

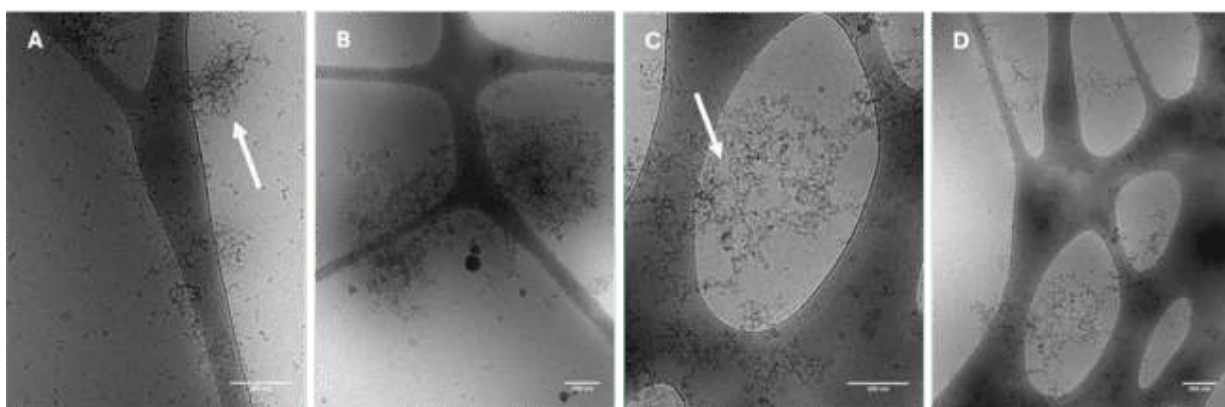
O acompanhamento do tamanho médio indicou uma variação do diâmetro hidrodinâmico inicial em um período de 30 dias, com valores variando em aproximadamente 50 nm, indicando estabilidade. Com relação à variação no índice de polidispersividade (PDI), as medidas para ambas as amostras foram coerentes com os resultados de variação de tamanho. As nanoestruturas obtiveram um aumento relativo do PDI após 30 dias.

Em relação ao potencial zeta, foram observadas alterações mínimas nos valores iniciais, que apresentaram uma tendência de diminuição. Apesar dessa tendência à diminuição não é possível inferir que as amostras apresentam uma menor estabilidade, visto que os valores se mantiveram próximos ao + 30 mV.

Avaliação morfológica das nanoestruturas

Em um sistema nanoparticulado, a área de superfície da nanoestrutura é um parâmetro crucial para o transporte de fármacos e interação com membranas biológicas. A Figura 7 mostra que nanoestruturas de quitosana e nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 apresentam morfologia esférica e ramificadas.

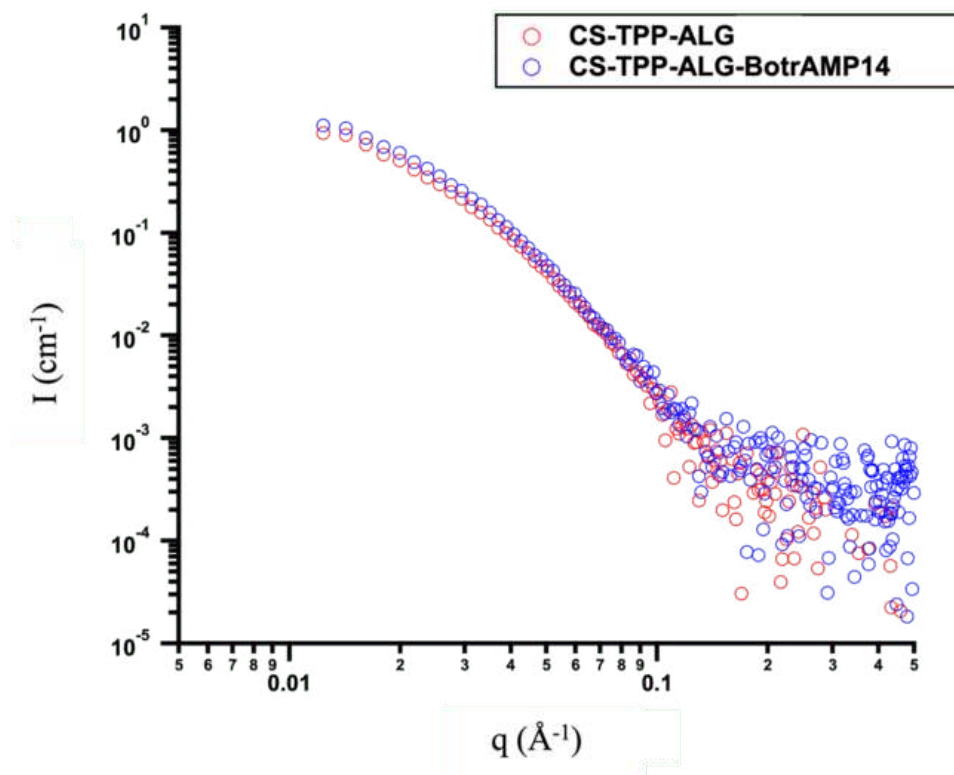
Figura 7. Caracterização morfológica de nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio, CS-TPP-ALG (A e B), e nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio contendo o peptídeo BotrAMP14, CS-TPP-ALG-BotrAMP14 (C e D), por CrioTEM. As características estruturais das nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio são destacadas pelas setas brancas e mostram que a presença do peptídeo não altera a estrutura. Barras de escala a 200 nm.



Avaliação estrutural das nanoestruturas

A influência do peptídeo BotrAMP14 na estrutura das nanoestruturas foi analisada utilizando espalhamento de raios-X a ângulo baixo. Os resultados obtidos do SAXS são relatados na Figura 8, para ambos os tipos de formulação. Ambas as amostras, na presença ou ausência do peptídeo BotrAMP14, CS-TPP-ALG-BotrAMP14 e CS-TPP-ALG respectivamente, seguem a mesma lei de potência em valores q baixos, destacando que o peptídeo não afeta a montagem das nanoestruturas após o encapsulamento.

Figura 8. Padrão do SAXS sobre a intensidade (I) versus o vetor de espalhamento q para a formulação de nanoestruturas vazias (CS-TPP-ALG, círculos vermelhos) e nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14, círculos azuis).

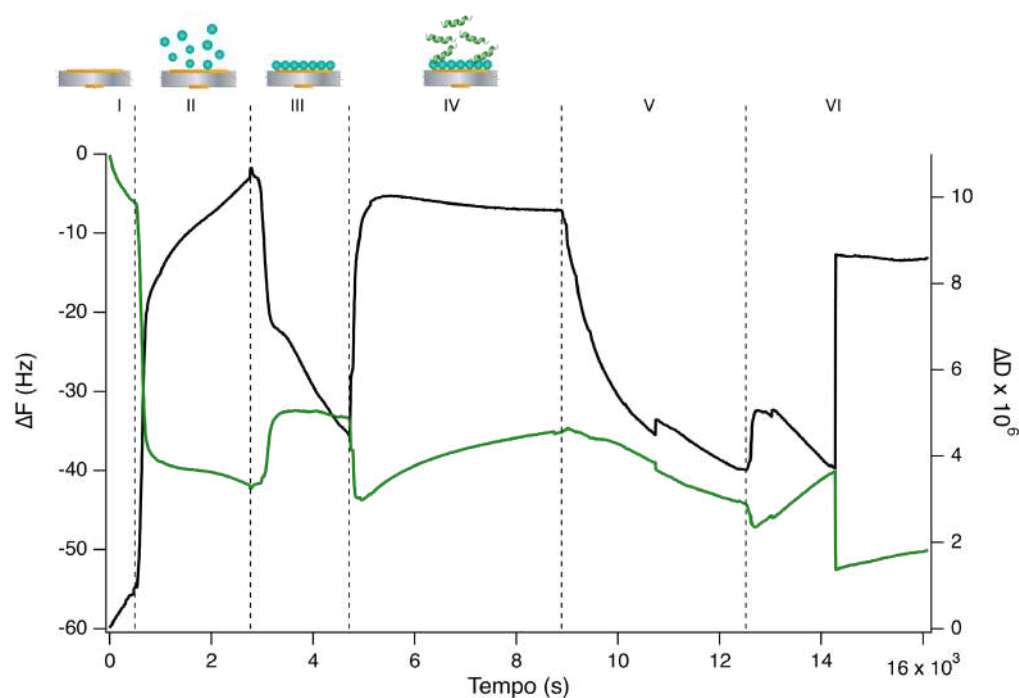


Análise QCM-D da interação entre CS-TPP-ALG com BotrAMP14 e bicamada lipídica

A adsorção de peptídeos em nanoestruturas foi observada por meio de mudanças na frequência (Δf) do sensor de quartzo (Figura 9). Seis estágios diferentes podem ser distinguidos: primeiro, a frequência do cristal base imerso em água é obtida; então, uma diminuição acentuada em Δf é observada quando a dispersão coloidal de nanoestruturas é introduzida na câmara de medição. Essa diminuição em Δf é devido à adsorção de material na superfície do sensor; quando o processo de adsorção termina ($\Delta f =$

constante), a câmara de medição é lavada com tampão Tris-HCl para remover as cadeias que são fracamente adsorvidas ao substrato (terceiro estágio).

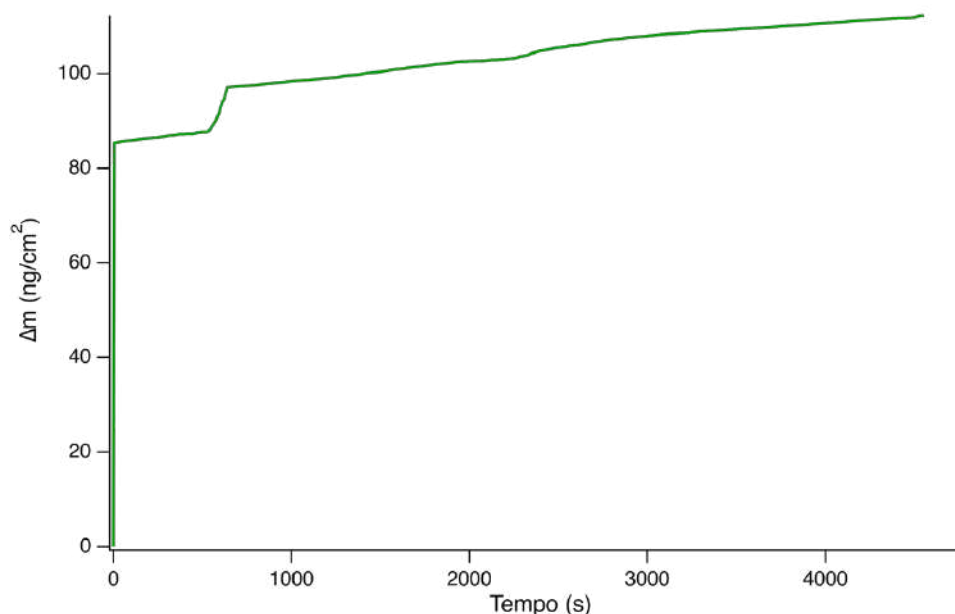
Figura 9. Medidas representativas de QCM-D. ΔF (linhas verdes) e ΔD (linhas pretas) no 7º harmônico das nanoestruturas vazias (CS-TPP-ALG) quando o peptídeo BotrAMP14 é adicionado. (I) Equilíbrio do chip com H₂O. (II) Injeção de nanoestruturas + 30 min de incubação (III) Lavagem com Tris-HCl pH 7,4. (IV) Injeção de 100 μ M de BotrAMP14 + 1 hora de incubação; (V) 1ª lavagem com 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 por 1 h; (VI) 2ª lavagem com 10 mM de Tris-HCl + 150 mM de NaCl pH 7,4 por 1 h.



Durante o processo de injeção de BotrAMP14 (quarto estágio), uma diminuição em Δf é observada, seguida por dois estágios de enxágue, nos quais mudanças rápidas em Δf foram observadas, indicando que o processo de adsorção pode estar inchando/desinchando durante o enxágue. A cinética de adsorção em substratos contendo moléculas é um processo complexo (GUZMÁN *et al.*, 2011). Nossos resultados experimentais no trabalho atual mostram que a análise da cinética de adsorção pode ser

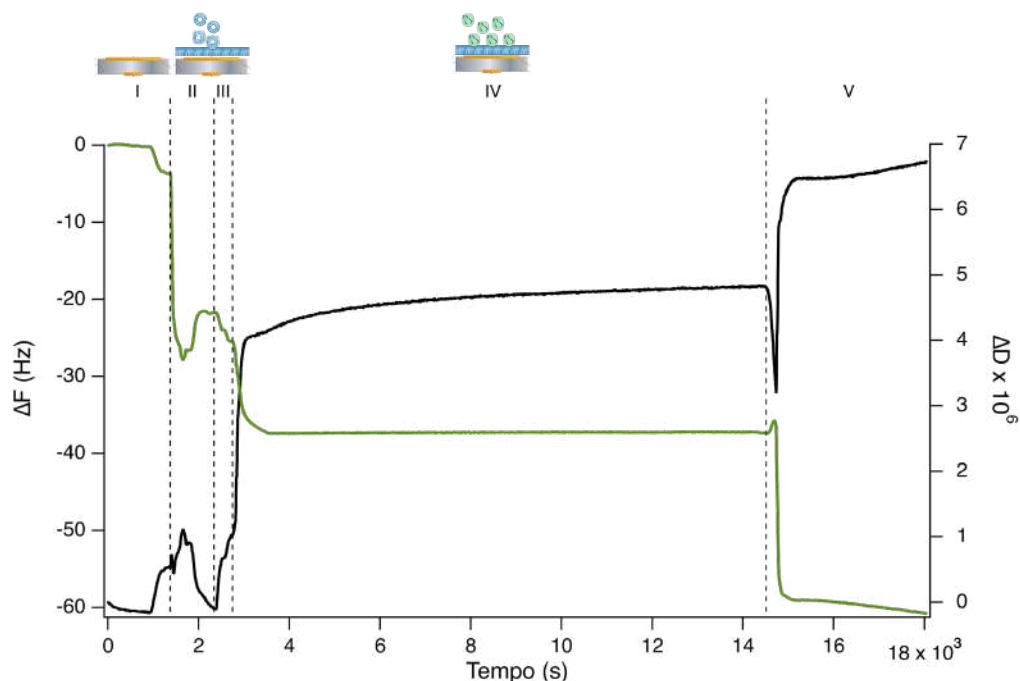
representada como um processo bimodal (Figura 10). O primeiro passo rápido pode ser associado ao transporte da cadeia para a superfície e à adsorção inicial, e o segundo passo lento pode ser devido ao rearranjo das cadeias pré-adsorvidas.

Figura 10. Cinética de adsorção do peptídeo antimicrobiano BotrAMP14 às nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG) avaliada por microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D).



Bicamadas lipídicas de POPC:POPG (3:1) SUVs foram formadas em cristais de quartzo revestidos com SiO₂ para analisar a interação de nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 com bicamada lipídica (Figura 11). A formação bem-sucedida de bicamadas lipídicas homogêneas foi confirmada por mudanças na frequência ($\Delta F \sim -25$ -28 Hz) e dissipação ($\Delta D \sim 0$) (CHO *et al.*, 2010). As nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 foram adsorvidas às membranas investigadas. As respostas QCM-D obtidas sugerem que as nanoestruturas se ligam à membrana POPC:POPG (3:1), causando alguma desestabilização da membrana.

Figura 11. Medidas representativas de QCM-D. ΔF (linhas verdes) e ΔD (linhas pretas) no 7º harmônico das nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) interagindo com a bicamada lipídica. I) Equilíbrio do chip com H₂O. (II) Injeção de lipídios e observação da formação da bicamada ($\Delta F \sim 24$; $\Delta D \sim 1$) seguido por lavagem MQ do excesso de lipídios. (III) Equilíbrio de cristais com tampão Tris. (IV) Injeção de nanoestruturas de quitosana contendo BotrAMP14 e monitoramento longo (3h). (V) Lavagem com 10mM Tris-HCl ph 7,4.



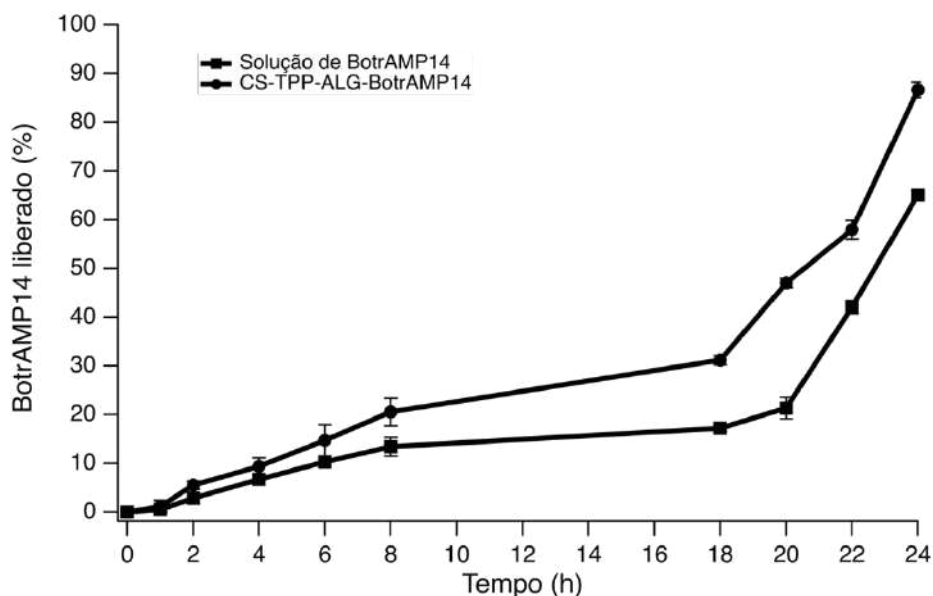
Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada avaliando-se a quantidade de peptídeo interagindo com as nanoestruturas, seja em seu interior ou conectado à sua superfície. O valor encontrado de eficiência de encapsulação do peptídeo BotrAMP14 foi de 92,51%. O valor de eficiência de encapsulação é referente a uma encapsulação de uma concentração de 100 μM do peptídeo, em que 92,51 μM do peptídeo foi encapsulado.

Estudo da liberação *in vitro* do peptídeo a partir das nanoestruturas

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* com o objetivo de avaliar a velocidade com que o peptídeo era liberado da nanoestrutura lipídica. O perfil de liberação do BotrAMP14 foi comparado ao controle contendo a mesma quantidade do peptídeo livre em solução (Figura 12). Quase a totalidade do peptídeo em solução atravessou a membrana hidrofílica de celulose no período de 24 h. Por outro lado, BotrAMP14 foi liberado das nanoestruturas em uma velocidade menor, como era esperado. Pela análise do perfil de liberação obtido, foi verificado que a liberação do BotrAMP14 ocorreu em duas fases, com uma taxa de liberação menor nas primeiras 18 h, onde 18% do peptídeo foi liberado a uma taxa quase que constante, e após uma liberação um pouco mais rápida, chegando a 70% ao final de 24 h.

Figura 12. Perfil de liberação do BotrAMP14 a partir da formulação de nanoestruturas contendo o peptídeo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) em comparação a uma solução aquosa do peptídeo livre contendo a mesma concentração. Os experimentos foram realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão.



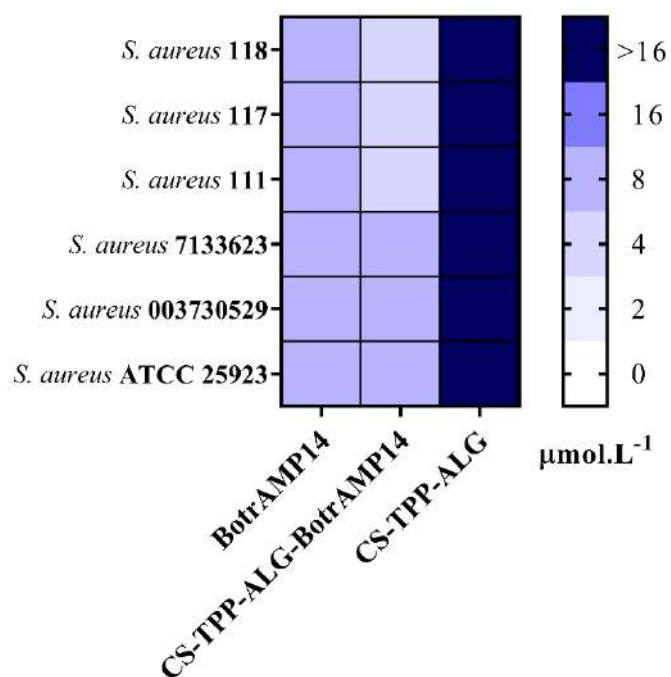
Determinação da concentração inibitória mínima

O desenvolvimento de formulações contendo peptídeos antimicrobianos como opção terapêutica para infecções bacterianas que afetam a pele e tecidos mole é uma demanda no panorama nacional e mundial. Este trabalho propôs a encapsulação do peptídeo BotrAMP14 em nanoestruturas de quitosana na tentativa de aumentar a biodisponibilidade do peptídeo, através da liberação modificada, e a qualidade e vida dos animais.

O efeito antibacteriano foi avaliado através do método de microdiluição em caldo usando placas de 96 poços para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O valor de CIM é definido como a menor concentração de uma determinada substância que inibe o crescimento de um organismo específico (CLSI, 2008). Neste ensaio foi avaliado o potencial das nanoestruturas vazias, nanoestruturas contendo o peptídeo e peptídeo livre frente a isolados de *S. aureus*. Os resultados das nanoestruturas demonstram uma inibição de crescimento de 100% apresentando uma CIM menor que a CIM do peptídeo livre para três das cepas testadas (Figura 13).

Figura 13. *Heatmap* da concentração inibitória mínima (CIM) de nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio (CS-TPP-ALG), nanoestruturas de quitosana e alginato de

sódio contendo BotrAMP14 (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) e do peptídeo BotrAMP14 contra seis cepas de *Staphylococcus aureus*.



DISCUSSÃO

As infecções de pele e tecidos moles causadas por *S. aureus*, especialmente aquelas associadas à resistência antimicrobiana, representam um grande desafio clínico. A eficácia limitada dos tratamentos convencionais tem incentivado a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes, como o uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs) encapsulados em sistemas de liberação modificada. Neste estudo, nanoestruturas de quitosana e alginato de sódio foram desenvolvidas para encapsular o peptídeo BotrAMP14, visando otimizar sua estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. A combinação de propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras dos PAMs com as características físico-químicas das nanoestruturas pode oferecer uma solução inovadora para o tratamento de infecções cutâneas complexas. Polímeros naturais, como o quitosana e o alginato, têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades antibacterianas. A quitosana, por possuir características catiônicas, pode interagir com as paredes celulares bacterianas, que possuem carga negativa. Essa interação resulta na ruptura da membrana bacteriana, levando à morte das bactérias (NAIK *et al.*, 2024).

O processo de identificação de moléculas por espectrometria e massas foi realizado através do MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight*), que é um processo de ionização a laser assistida por matriz. Ionizações a laser foram introduzidas a partir da metade dos anos 80 e ganharam destaque nas análises de proteínas e peptídeos (KARAS *et al.*, 1987; KARAS; HILLENKAMP, 1988; TANAKA *et al.*, 1988). O peptídeo BotrAMP14 sintetizado apresentou uma massa de 1957,58, além de possível observar um íon com carga menor, de aproximadamente 979. Durante o processo de ionização pode ser possível a formação de íons com múltiplas cargas (HOFFMANN e STROOBANT, 2007) Neste caso, como o espectrômetro reconhece a relação massa/carga (m/z), o resultado aparece com a massa do analito dividida pelo número de cargas presentes na molécula. Sendo assim, o íon de carga menor que foi identificado pode ser representado pelo BotrAMP14 duplamente carregado ($m = 1957,46 / z = 2$).

A técnica de geleificação iônica para obtenção de nanoestruturas de quitosana é baseada na interação eletrostática entre o grupamento amino das moléculas das cadeias poliméricas e as cargas negativas do políon TPP. Essa interação eletrostática foi observada para o nanogel, formado por meio da geleificação iônica de nanoestruturas de fosfato de cálcio (atuando como agente reticulante) e quitosana, em que se utilizou o ácido clorogênico devido às suas conhecidas propriedades antibacterianas e capacidade de perturbar as membranas celulares das bactérias. Essa estrutura, composta por íons fosfato com carga negativa e quitosana com carga positiva, inibiu o crescimento bacteriano (ALI; AL BOSTAMI; AL-OTHMAN, 2024). Tanto o tamanho quanto a superfície das nanoestruturas formadas dependem principalmente das concentrações do polímero e do agente reticulante utilizado e, inclusive a formação das nanoestruturas pode ser restrita a determinadas concentrações de quitosana e TPP em solução. Foi demonstrado que para evitar a obtenção de partículas em escala micrométrica, as concentrações de quitosana e TTP deviam estar abaixo de $2,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente (CALVO *et al.*, 1997).

O tamanho médio das nanoestruturas obtidas (Tabela 1) com as menores concentrações (CS-TPP-ALG_3) de quitosana, alginato de sódio e TPP está em concordância com resultados previamente reportados, que obtiveram partículas de quitosana com tamanho médio de $304,7 \text{ nm} \pm 24,9$ utilizando o mesmo método de preparo (CALVO *et al.*, 1997). Neste cenário, é importante ressaltar que diversos estudos mostram que partículas menores e mais compactas são resultado de um maior entrelaçamento das cadeias dos polieletrólitos, causado por uma maior interação eletrostática (AELENEI *et al.*, 2009; AVADI *et al.*, 2010; MEDIDHI; PADMANABHAN, 2021). Conforme observado na Tabela 1, o aumento das concentrações de cada componente, ocasionou um aumento do tamanho de partícula. Isto se justifica uma vez que a maior concentração em solução significa maior número de cadeias poliméricas por volume, sendo que a adição de outro polímero resulta na formação de partículas maiores (BAO; LI; ZHANG, 2008; LEE; ALEXANDER-KATZ; MACFARLANE, 2021).

A proporção utilizada entre as soluções de quitosana e alginato de sódio/TPP resulta em soluções que se apresentam macroscopicamente de três formas: como

dispersões claras, dispersões levemente opacas e agregados opacos. As amostras levemente opacas são consideradas as que possuem menor tamanho de partículas, ou seja, caracterizam a formação de nanoestruturas (CALVO *et al.*, 1997). Neste trabalho, quando foram utilizadas concentrações mais altas da solução de quitosana ($1,75 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e solução de TPP ($1,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), obteve-se soluções com agregados opacos. Já trabalhando-se com concentrações mais baixas, soluções levemente opacas foram observadas e se apresentaram em conformidade quando lidas em aparelho Zetasizer, como observado na Tabela 1.

As nanoestruturas de quitosana e alginato apresentaram um tamanho médio de aproximadamente 200 nm, com variações mínimas de acordo com as condições de síntese. O tamanho adequado das nanoestruturas é essencial, uma vez que partículas na faixa de 100 a 500 nm têm maior capacidade de atravessar a barreira cutânea, especialmente em áreas lesionadas, onde a permeabilidade é aumentada devido à inflamação e ao rompimento da estrutura epitelial (MCSWEENEY *et al.*, 2018). Tamanhos abaixo de 200 nm, como os observados, também favorecem uma distribuição mais eficiente nas camadas mais profundas da pele, potencializando a ação terapêutica diretamente no foco da infecção (BOMBIN; DUNNE; MCCARTHY, 2023; HARIPRIYAA; SUTHINDHIRAN, 2023).

O índice de polidispersividade (PDI) observado, inferior a 0,3, indica uma distribuição homogênea de tamanhos, o que é fundamental para a previsibilidade e consistência do sistema de liberação. Sistemas com PDI elevado podem apresentar comportamento imprevisível, com partículas maiores ou menores que o ideal, comprometendo a eficácia da liberação modificada. De maneira semelhante aos resultados observados, (ING *et al.*, 2012) obtiveram nanopartículas de quitosana com valores de PDI de $0,366 \pm 0,047$. A uniformidade das nanoestruturas é, portanto, crucial para garantir que a liberação do peptídeo ocorra de maneira modificada e prolongada, maximizando a eficácia clínica (WANG *et al.*, 2022).

O potencial zeta das nanoestruturas, próximos a +30 mV, tanto imediatamente após a síntese quanto após 30 dias de armazenamento, sugere uma excelente estabilidade coloidal. Valores de potencial zeta elevados indicam que as nanoestruturas

são capazes de se repelir mutuamente, evitando a agregação ao longo do tempo. Valores de potencial zeta próximos ou superiores a ± 30 mV são considerados sistemas estáveis (BHATTACHARJEE, 2016; KASZUBA et al., 2010). A estabilidade coloidal é um dos fatores mais críticos em sistemas de liberação modificada, pois garante que as partículas permaneçam dispersas e funcionais durante o armazenamento e aplicação.

Sistemas nanoparticulados de alginato e quitosana submetidos a mudanças de temperatura se apresentaram estáveis quanto ao tamanho e ao potencial zeta durante um mês de armazenamento a 4° C (SÆTHER et al., 2008). Também demonstrando uma estabilidade das nanopartículas através da gelificação iônica, o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e TPP foi sustentado por 1 hora após a preparação, aumentando gradualmente o tamanho das nanopartículas nas 24 h seguintes, sem aparente agregação (GAN et al., 2005). O peptídeo Ib-M1 foi considerado resistente às condições de temperatura e pH quando imobilizado em nanopartículas. Essa encapsulação não afetou sua atividade contra *E. coli*, mantendo suas características e alcançando a estabilidade (OSORIO-ALVARADO et al., 2022). Entretanto, em outros estudos, foi demonstrado um aumento de tamanho após 7 dias de armazenamento a 20 °C devido ao inchaço produzido pela presença do TPP (LÓPEZ-LEÓN et al., 2005).

Como alguns estudos presentes na literatura relatam a instabilidade das nanopartículas de quitosana e TPP, existe a hipótese de que a adição de alginato aumenta a estabilidade física das nanoestruturas, devido ao equilíbrio das forças de contato ser fundamental para a estabilização do sistema (TSAI et al., 2011). Como as nanoestruturas mantiveram sua estabilidade físico no presente trabalho, pode se inferir que o alginato conferiu um maior contato eletrostático com a quitosana, tornando a estrutura menos vulnerável.

A microscopia eletrônica de transmissão criogênica (crio-TEM) tornou-se essencial para caracterizar nanomateriais. Esta técnica é frequentemente usada em temperaturas ultrabaixas para analisar nanomateriais que não foram quimicamente modificados e estão totalmente hidratados. Ela tem alta resolução, rapidez, análise no estado totalmente hidratado, menos realocação de materiais difundidos e é adequada para materiais líquidos ou semisólidos. A microscopia eletrônica de transmissão criogênica (crio-TEM)

permitiu observar a morfologia das nanoestruturas, confirmando sua forma e estrutura. A análise morfológica é um passo essencial para validar a uniformidade das partículas e confirmar que o processo de síntese foi bem-sucedido (STEWART, 2017). Além disso, as nanoestruturas apresentaram características compatíveis com sistemas de entrega de fármacos, como alta área de superfície e um diâmetro que favorece sua interação com estruturas biológicas (VARGAS-MOLINERO *et al.*, 2023).

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) complementou a avaliação morfológica, sugerindo que não há mudança na estrutura com a presença ou ausência do peptídeo. Em geral, a nanoestrutura vazia (CS-TPP-ALG) não exibe nenhuma característica peculiar no regime q , como esperado pelas estruturas core-shell já relatadas na literatura (KLOSTER *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2021). O aprisionamento de BotrAMP14 nas nanoestruturas não afetou significativamente a estrutura interna da formulação, levando apenas a um ligeiro aumento da intensidade. Tal aspecto pode ser explicado pela presença do peptídeo antimicrobiano que aumenta o contraste com os raios X, por exemplo, a densidade eletrônica do material em comparação com a formulação vazia, que, portanto, se espalha um pouco mais. A combinação de crio-TEM e SAXS fornece uma visão abrangente das características físicas e estruturais das nanoestruturas, reforçando a robustez do sistema desenvolvido (RISTORI *et al.*, 2018).

Microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) é uma técnica que fornece monitoramento em tempo real de nanoestruturas e interações de interface do modelo, oferecendo insights sobre cinética de adsorção, quantidades adsorvidas e a integridade de nanoestruturas e membrana lipídica (NYSTRÖM *et al.*, 2016). A frequência do oscilador diminui quando uma substância é adsorvida na superfície do sensor. Consequentemente, a quantidade de material adsorvido em uma superfície pode ser determinada pela mudança na frequência do oscilador. O fator D, uma razão de energia adimensional, é expresso em unidades de dissipação de 10^6 (TERAMURA; KUROYAMA; TAKAI, 2016). Os experimentos de microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) demonstraram que as nanoestruturas contendo o BotrAMP14 interagiram de maneira eficaz com uma bicamada lipídica modelo, sugerindo que esse sistema de

nanoestruturas pode penetrar e se integrar com membranas bacterianas. Essa interação é fundamental para o sucesso de terapias antimicrobianas, pois a capacidade de as nanoestruturas aderirem às membranas bacterianas aumenta a concentração local do peptídeo no local da infecção (GAO *et al.*, 2018). Além disso, as interações das nanoestruturas com membranas podem facilitar a liberação do BotrAMP14 diretamente nas células bacterianas, aumentando sua eficácia terapêutica.

A eficiência de encapsulação do BotrAMP14 foi superior a 90%, destacando a eficácia do sistema nanoparticulado desenvolvido. Esse alto grau de encapsulação é essencial para garantir que uma quantidade suficiente de peptídeo seja entregue ao local da infecção, maximizando a concentração terapêutica no ambiente-alvo. Em outros estudos, foi demonstrado que aumentando-se a concentração de um peptídeo, a eficiência de encapsulação diminuía (MOHAMMADPOUR DOUNIGHI *et al.*, 2012), provavelmente devido à capacidade limitada que as nanoestruturas poliméricas têm em acomodar o fármaco. Eficiências de encapsulação elevadas, similares a obtida no presente estudo, foram encontradas na encapsulação da insulina, em que 80% do fármaco foi encapsulado (PAN *et al.*, 2002) e do peptídeo antimicrobiano IbM6, em que 98% do peptídeo foi encapsulado (SALVATI *et al.*, 2024). A elevada eficiência também protege o peptídeo da degradação enzimática e de outras interações desfavoráveis no ambiente biológico, aumentando sua meia-vida e garantindo a liberação gradual.

O perfil de liberação *in vitro* do BotrAMP14 revelou um comportamento bifásico, com uma fase inicial de liberação lenta e prolongada até 18 horas, seguida por uma fase de liberação mais rápida. Esse comportamento é comum em sistemas de liberação modificada e é altamente vantajoso no contexto de infecções de pele e tecidos moles, onde a presença contínua do peptídeo é necessária para combater a infecção de forma eficaz. Perfis de liberação semelhantes já foram observados em estudos anteriores no desenvolvimento nanopartículas contendo outros fármacos e/ou peptídeos. Nanopartículas de PLGA encapsuladas com LL-37 obtiveram uma cinética de liberação inicial rápida, respondendo por cerca de 40% da quantidade total de peptídeo aprisionado no primeiro dia e atingindo 80% do peptídeo liberado no dia 14 (CHEREDDY *et al.*, 2014). Também utilizando o peptídeo LL-37 em micropartículas de quitosana/poli(ácido g-

glutâmico), uma alta porcentagem de aprisionamento de LL-37 (40%) e uma liberação rápida de 71,2% na primeira hora e um platô de cerca de 90% de liberação cumulativa após 24 h foram observados (SUN *et al.*, 2015). Em outro estudo, o perfil de liberação *in vitro* de nanopartículas de quitosana contendo o peptídeo AVP (4–5)-NH₂ apresentou uma difusão lenta do peptídeo AVP da matriz polimérica, de apenas 17,23% nas primeiras 24 h, e aproximadamente 60% em 10 dias (KECEL-GUNDUZ *et al.*, 2020). As nanoestruturas também oferecem o benefício da liberação gradual e regulada, melhorando a solubilidade e a estabilidade do fármaco, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade (WANG *et al.*, 2011). Neste cenário, uma concentração de BotrAMP14 maior que a concentração mínima inibitória (8 µM para *S. aureus*) liberada durante 24 h seria o ideal para o tratamento de infecções bacterianas. Entretanto, mesmo que uma liberação tão longa quanto a ideal não seja alcançada, uma liberação mais lenta que exceda as aplicações diárias do tratamento padrão com antibióticos, que ocorre no geral a cada 8 h, já é um perfil de liberação notável.

Os ensaios antimicrobianos mostraram que o BotrAMP14 encapsulado manteve sua atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*. Este achado é extremamente promissor, pois demonstra que a nanoencapsulação não comprometeu a eficácia do peptídeo, um desafio comum em sistemas de liberação de fármacos. Além disso, a quitosana utilizada na formulação das nanoestruturas possui propriedades antimicrobianas intrínsecas, o que pode ter contribuído para a eficácia sinérgica observada no combate às bactérias. Este resultado evidencia que o uso de nanoestruturas poliméricas é capaz de reduzir a CIM de peptídeos bioativos contra bactérias, possivelmente por um efeito associado do peptídeo com a atividade antibacteriana da quitosana presente na nanoestrutura, demonstrando a importância do uso de nanoestruturas como um promissor carreador de proteínas ou peptídeos de peçonhas como uma alternativa para potencializar o efeito terapêutico dessas moléculas (MESQUITA *et al.*, 2017; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI *et al.*, 2012; ROCHA SOARES *et al.*, 2012; TORCHILIN, 2007). O efeito antibacteriano sinérgico, em que o peptídeo liberado faz com que a nanoestruturas CS-TPP-ALG-BotrAMP14 apresente uma maior atividade bacteriana em comparação à nanoestrutura CS-TPP-ALG e ao peptídeo

BotrAMP14, também foi observada com o peptídeo antimicrobiano HHC36, em que o Ag-H2 liberado fez com que o hidrogel Ag-H2/CMCS/SA apresentasse uma maior atividade bacteriana em comparação ao hidrogel contendo apenas AgNPs e HHC36 (hidrogel Ag/CMCS/SA, hidrogel H/CMCS/SA) (LIU *et al.*, 2023).

Os resultados deste estudo sugerem que as nanoestruturas de quitosana e alginato contendo BotrAMP14 têm um enorme potencial para o tratamento de infecções cutâneas, tanto em formulações tópicas quanto subcutâneas. Diversos estudos têm investigado novas abordagens para o tratamento de lesões cutâneas, com peptídeos bioativos, nanoestruturas e hidrogéis ganhando destaque por seu potencial terapêutico (QIN *et al.*, 2022). A aplicação tópica pode ser particularmente eficaz no tratamento de úlceras infectadas e feridas crônicas, onde a liberação prolongada do peptídeo seria benéfica para reduzir a carga bacteriana ao longo do tempo. A bioadesividade das nanoestruturas pode prolongar a retenção do fármaco na pele, aumentando sua eficácia clínica.

Estudos futuros devem incluir investigações *in vivo* para avaliar a eficácia e segurança deste sistema em modelos animais de infecção cutânea, seguidos por ensaios clínicos para validar sua aplicabilidade em humanos. A capacidade de liberar peptídeos antimicrobianos de forma modificada e prolongada pode representar uma solução inovadora para o tratamento de infecções resistentes, oferecendo uma alternativa eficaz aos antibióticos tradicionais, especialmente em um cenário de crescente resistência bacteriana.

CONCLUSÕES

As infecções de pele e tecidos moles, especialmente aquelas causadas por *S. aureus*, representam um desafio significativo na prática clínica. Este estudo abordou essa problemática ao desenvolver nanoestruturas de quitosana e alginato encapsuladas com o peptídeo BotrAMP14, evidenciando seu potencial terapêutico. As nanoestruturas sintetizadas por gelificação iônica apresentaram um tamanho médio de

aproximadamente 200 nm, com um índice de polidispersividade inferior a 0,3, o que indica uma distribuição homogênea de tamanhos, essencial para o sistema de liberação e para maximizar a interação com estruturas biológicas e otimizar a biodistribuição no local de infecção. O potencial zeta positivo, em torno de +30 mV, sugere uma estabilidade eletrostática robusta, prevenindo a agregação das partículas em meio aquoso e garantindo sua viabilidade como sistema de liberação. A eficiência de encapsulação superior a 90% garante que uma quantidade significativa do peptídeo atinja o local da infecção, maximizando sua concentração terapêutica. Esse alto grau de encapsulação é especialmente relevante, pois uma liberação controlada e sustentada do peptídeo pode reduzir a necessidade de aplicações frequentes, favorecendo o tratamento contínuo e aumentando a adesão do paciente. Os estudos de estabilidade demonstraram que as nanopartículas mantêm suas propriedades físico-químicas por até 30 dias a 5°C, indicando robustez estrutural. Essa estabilidade é um aspecto crítico para sistemas de liberação de fármacos, pois garante que o peptídeo encapsulado permaneça eficaz até o momento da aplicação. Além disso, o perfil de liberação *in vitro* revelou um comportamento bifásico, com uma fase inicial de liberação lenta e prolongada, seguido por uma liberação mais rápida, ideal para o tratamento contínuo de infecções, pois permite uma liberação gradual do peptídeo, potencialmente prolongando a ação antimicrobiana no local da infecção e reduzindo o risco de resistência bacteriana. Os ensaios antimicrobianos demonstraram que o BotrAMP14 encapsulado manteve sua atividade contra cepas de *S. aureus*, ressaltando que a nanoencapsulação não comprometeu sua eficácia. Esses resultados sugerem que esse sistema pode oferecer uma alternativa eficaz aos tratamentos convencionais, especialmente em um contexto de crescente resistência bacteriana. As próximas etapas da pesquisa podem focar na otimização das formulações de nanoestruturas de quitosana para melhorar a eficiência de encapsulação e a estabilidade dos peptídeos antimicrobianos. Estudos *in vivo* serão essenciais para avaliar a eficácia e a segurança dessas nanoestruturas aplicadas de forma tópica no tratamento de infecções cutâneas. Além disso, o uso de modelagem computacional e inteligência artificial também promete acelerar o design de novos sistemas de liberação de moléculas, aprimorando a previsibilidade dos resultados.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Chitosan nanoparticles development as a vehicle for anti-Staphy peptide

Thuanny Borba Rios^{1,2}, Mariana Rocha Maximiano^{1,2}, Breno Noronha Matos³,
Guilherme Martins Gelfuso³, Marco Fornasier⁴, Lucrezia Caselli⁴, Martin Malmsten^{4,5},
Octávio Luiz Franco^{1,2*}

1 – S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom
Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

2 - Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília,
Distrito Federal, Brazil.

3 - Universidade de Brasília, DF, Brazil.

4 – Physical Chemistry 1, University of Lund, S-221 00 Lund, Sweden

5 - Department of Pharmacy, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen,
Denmark

Abstract

Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus aureus*, especially those associated with antimicrobial resistance, represent a significant clinical challenge. This study aimed to develop chitosan and alginate nanoparticles to encapsulate the antimicrobial peptide BotrAMP14 to optimize its stability, bioavailability, and therapeutic efficacy. The nanoparticles, synthesized via ionotropic gelation, displayed an average size of approximately 200 nm, a polydispersity index of 0.27, and a zeta potential of +30 mV, indicating a homogeneous size distribution essential for the delivery system. Cryo-TEM and SAXS analysis confirmed the nanoscale morphology of the particles. Furthermore, the nanoparticles presented characteristics compatible with drug delivery systems, such as high surface area and a diameter that favors their interaction with biological structures. Stability studies conducted over 30 days at 5°C demonstrated minimal variation in size and charge, indicating robust nanoparticle stability. Encapsulation efficiency exceeded 92%, and *in vitro* release studies revealed sustained peptide release over 24 h, ideal for continuous treatment of infections. Quartz crystal microbalance with dissipation studies validated the successful adsorption of BotrAMP14 onto nanoparticles and their interaction with model lipid bilayers, suggesting membrane destabilization. Antimicrobial assays showed a reduction in the antibacterial of BotrAMP14 for *Staphylococcus aureus* strains after 24h. These findings highlight the potential of BotrAMP14-loaded nanoparticles as a nanotechnology-based approach for treating bacterial infections, suggesting that this system may offer an effective alternative to conventional treatments, especially in the context of increasing bacterial resistance.

Introduction

Skin and soft tissue infections (SSTIs) are one of the main challenges in modern medicine. They are common conditions, ranging from superficial infections such as impetigo to severe forms such as abscesses, cellulitis, and necrotizing fasciitis.¹ These infections can occur in individuals with healthy skin but are more prevalent in situations where skin integrity is compromised, such as cuts, burns, and chronic diseases² Various pathogens can cause them, with gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, being the most prevalent etiological agents. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has received particular attention due to its increasing prevalence and resistance to multiple classes of antibiotics, which complicates available treatments.³ In more invasive infections, the mortality rate can reach 20%, especially in cases of necrotizing fasciitis or when the infection spreads to the circulatory system, resulting in septicemia³.

In addition to the difficulties associated with controlling bacterial resistance, SSTIs have a significant socioeconomic impact. It is estimated that more than 10% of emergency hospitalizations are related to these infections, generating substantial costs in terms of prolonged treatment, hospitalizations, and even surgeries in severe cases⁴. An aggravating factor is the increase in community-acquired infections, especially those related to MRSA, which until recently were considered infections restricted to the hospital environment^{4,5}. Conventional treatment for SSTIs involves antibiotics, such as beta-lactams and glycopeptides⁶. However, due to antibiotic resistance and the emergence of new bacterial strains, prolonged and indiscriminate use of these drugs can contribute to therapeutic failures, the development of additional resistance, and side effects in patients⁶. Furthermore, many antibiotics cannot penetrate infected tissue, reducing their effectiveness adequately.

In this scenario, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising alternatives to conventional antibiotics for combating bacterial infections. AMPs are small oligopeptides with a broad spectrum of antimicrobial activity, characterized by their affinity for lipid membranes, which allows them to disrupt bacterial cells via electrostatic and hydrophobic interactions ⁹. In addition to their antimicrobial properties, AMPs can also modulate the immune system, promoting wound healing and reducing inflammation ⁸. BotrAMP14 is an antimicrobial peptide developed through rational design based on batroxidin derived from snake toxins and has been engineered to enhance its antimicrobial efficacy ⁹. BotrAMP14 exhibits potent antibacterial activity, primarily disrupting bacterial membranes, making it effective against susceptible bacteria and clinical isolates. Its synthetic helical structure contributes to its ability to penetrate and destabilize bacterial cell membranes, increasing its therapeutic potential ⁹.

Although AMPs possess potent bactericidal effects and significant potential for development as new drugs, they face limitations, such as low stability, short half-life, and reduced oral bioavailability, that hinder their conversion into therapeutic agents ^{10,11}. A promising strategy to overcome these challenges is the incorporation of these molecules into nanocarriers. ¹²Nanoparticles (NPs) are increasingly being explored and applied to enable targeted and controlled drug delivery, reduce the dosage of active pharmaceutical ingredients, facilitate combination therapies, and minimize adverse effects ¹³. Given the escalating challenge posed by microbial drug resistance, nanotechnology has emerged as a critical area of interest due to its distinctive attributes ¹⁴. Notably, the unique physical and chemical properties of NPs, such as their high surface-to-volume ratio and small size, enable them to overcome biological barriers and interact directly with biological molecules, including microorganisms ¹⁵.

Antimicrobial biomaterials based on polymers or polymer composites have been discovered in the search for potential antimicrobial agents¹⁶. Chitosan, a natural polysaccharide biopolymer derived from chitin, the primary structural component of crustacean exoskeletons, demonstrates significant potential in this regard. The degree of deacetylation of chitosan determines its abundance of C2 amino groups, which have pKa values around 6.5 and can become protonated in mildly acidic conditions¹⁷. This polycationic nature is responsible for chitosan's antimicrobial properties, as it promotes interactions with negatively charged microbial cell walls and cytoplasmic membranes¹⁸. These interactions compromise osmotic stability, disrupt membranes, and lead to the leakage of intracellular contents. Additionally, chitosan can penetrate bacterial and fungal nuclei, inhibiting mRNA and protein synthesis by binding to microbial DNA¹⁹. Moreover, when reduced to the nanoscale, chitosan exhibits a higher surface-to-volume ratio, translating into a greater surface charge density, increased affinity for bacterial cells, and enhanced antimicrobial activity²⁰.

Therefore, in this study, we aimed to develop and characterize chitosan-alginate nanoparticles to function as carriers of the antimicrobial peptide BotrAMP14 in treating skin infections caused by *S. aureus*.

Experimental Section

Peptide synthesis

The BotrAMP peptide was synthesized using N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) technology, with 95% purity, by Peptide 2.0 (USA). Matrix-assisted laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI-ToF) was used to validate the peptide's molecular mass on a mass spectrometer Ultraflex MALDI-TOF III (Bruker Daltonics).

Chitosan nanoparticles synthesis

Chitosan nanoparticles (CS-TPP-ALG NPs) were developed using the ionotropic gelation technique ²¹. For the synthesis of nanoparticles, chitosan (CS) solutions containing acetic acid (1%, v/v) were prepared and kept under stirring overnight. A solution containing sodium alginate (ALG) and the cross-linking agent tripolyphosphate Penta sodium salt (TPP) was added dropwise into these chitosan solutions. The cross-linking of the positively charged polymer with negatively charged TPP facilitated the formation of nanoparticles. For the nanoencapsulation of BotrAMP14, chitosan was solubilized in an aqueous acetic acid solution at 1% (v/v) for about half an hour before adding the peptide to the system. After adding the peptide, the mixture was stirred to ensure the dissolution of all components. The sodium alginate-TPP solution was then added dropwise to obtain the nanoparticles, and the system was left under magnetic stirring for an additional 10 min. Conditions for nanoparticle formation were optimized on unloaded particles, following the experimental design summarized in the Supporting Information. For each experimental series, the nanoparticle preparation protocol remained consistent with the method described above, with the only variation being the CS, ALG, and TPP concentrations.

Physicochemical characterization

The particles' hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) were analyzed by dynamic light scattering (DLS), and the zeta potential was measured by electrophoretic mobility. For the analysis, 1 mL of the colloidal suspension of nanoparticles was examined immediately after their preparation using a Zetasizer Nano

ZS (Malvern, USA) ²². For the zeta potential analysis, an equivalent of 3 mM NaCl was added to the colloidal suspension of particles to ensure adequate conductivity for accurate sample readings ²³. Stability studies of the nanoparticles were conducted using aliquots of CS-TPP-ALG and CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs stored in a refrigerator at 5 ± 3 °C. The study aimed to observe potential changes in the average size, polydispersity index, and zeta potential of the nanoparticles 30 days post-synthesis.

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM)

Cryo-TEM experiments were performed using a JEM-2200FS transmission electron microscope (JEOL) at the National Center for High-Resolution Electron Microscopy (nCHREM), Lund University. A bottom-mounted TemCam- F416 camera (TVIPS) was employed to record zero-loss images at an acceleration voltage of 200 kV. 4 μ L droplets of the samples were deposited on a lacey formvar carbon-coated grid (Ted Pella) and blotted with filter paper to remove excess fluid. The grid was then plunged into liquid ethane (-180 °C) to ensure rapid vitrification. Specimens were then stored in liquid nitrogen (-196 °C) and transferred into the microscope right before image acquisition, employing a cryo transfer tomography holder (Fischione Model 2550). Image analysis was performed with the software ImageJ ^{24,25}.

Small-angle X-ray scattering (SAXS)

Small-angle X-ray scattering patterns of the nanoparticles were acquired with a SAXSLab Ganesha instrument (JJ-Xray, Denmark) equipped with a 30 W Cu X-ray micro source (Xenocs, France) and a 300 K Pilatus 2D detector (Dectris, Switzerland).

Measurements were performed with a collimated needle-hole beam with the detector asymmetrically positioned at a distance of 480 mm from the sample, to produce azimuthal averaged intensities as a function of the scattering vector (q) in the range 0.012–0.5 Å. The magnitude of the scattering vector is defined by $q = (4\pi\sin\theta)/\lambda$, where λ is equal to 1.54 Å, equivalent to the Cu K α wavelength, and θ is half the scattering angle. The q scale was calibrated using silver behenate (CH₃–(CH₂)₂₀–COOAg) as a standard. Samples were loaded into 1.5 mm quartz capillary cells and placed in a thermostat stage at 25 °C. They were controlled using a Julabo T Controller CF41 (Julabo Labortechnik GmbH, Germany) and equilibrated for 1800 s before measurements.

Quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D)

Experiments were performed on a Q-Sense E4 quartz crystal microbalance (Q-Sense, Göteborg, Sweden). Tubing, cells, and o-rings were cleaned first in 2% Hellmanex solution (Sigma Aldrich) and rinsed in ultra-pure water and ethanol (99.9%, Sigma Aldrich) before drying under nitrogen. Silicon oxide sensors were cleaned the same way before UV-Ozone treatment for 10 min (BioForce Procleaner, Bioforce Nanosciences, Salt Lake City, USA), resulting in highly hydrophilic surfaces. During the experiments, a flow rate of 0.1 mL.min⁻¹ (Ismatec IPC 4-channel peristaltic pump, Cole-Parmer GmbH, Germany) and a constant temperature of 25 °C were set. MilliQ water was pumped for the first analysis until it hit stabilization for 5 min as a baseline. After reaching a stable baseline of frequency (ΔF) and dissipation (ΔD) shifts under 0.1 mL min⁻¹ MilliQ water flow (controlled through a peristaltic pump), the SiO₂ surfaces were followed by injection of CS-TPP-ALG NPs for 30 min and rinsed. Then,

BotrAMP14 solution in 100 μ M was injected. Frequent (ΔF) and dissipation (ΔD) changes confirmed peptide adsorption onto nanoparticle sensors. This was followed by rinsing with 10mM Tris HCl pH 7.4 and 10mM Tris 150 NaCl pH 7.4. For the second analysis, supported POPC/POPG bilayers (75/25 mol/mol) were prepared by deposition of SUVs (small unilamellar vesicles) on silicon dioxide surfaces (QSense QSX 303 SiO₂, 4.95 $\pm$ 0.05 MHz, 14 mm diameter, 0.3 mm thickness, 17.7 ng/cm² mass sensitivity) as described previously ²⁶. SUV suspensions (0.1mg.mL⁻¹ in MQ) were injected into the cells for 5 min, followed by MQ rinsing to remove excess liposomes. SUV deposition, rupture, and complete bilayer formation were confirmed by frequency changes (ΔF) of -23 ± 1 Hz and dissipation changes (ΔD) of $0.25\pm 0.25\times 10^{-6}$. This was followed by pumping CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs.

Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) ²⁷. The filtrate of the nanoparticle solution, after centrifugation at 4000 g for 1 hour at room temperature in a device with a defined pore size of 10 kDa (Vivaspin 2, 100000 MWCO HY, Sartorius, Goettingen, Germany), was used to determine the concentration of non-encapsulated BotrAMP14. The concentration of encapsulated BotrAMP14 was determined by the difference between the initial peptide concentration added and the concentration of non-encapsulated BotrAMP14 obtained. Encapsulation efficiency (EE%) was calculated as follows:

$$EE(\%) = \frac{([]_{theoretical}) - ([]_{obtained})}{[]_{theoretical}} \times 100,$$

where: EE% is the encapsulation efficiency of BotrAMP14 in the nanoparticle; [] obtained is the concentration of BotrAMP14 that was not encapsulated in the chitosan

nanoparticles; and [] theoretical is the concentration of BotrAMP14 initially used for the preparation of the nanoparticles.

***In vitro* release study of BotrAMP14 from nanoparticles**

The influence of the developed chitosan nanoparticles on the release rate of BotrAMP14 was evaluated *in vitro* using a release assay. This assay was conducted using modified Franz diffusion cells and hydrophilic cellulose acetate synthetic membranes^{23,27}. The solution in the receptor compartment of the cell was PBS at pH 7.4, maintained at 32°C throughout the experiment. This solution was replenished in the receptor compartment as 1 mL was collected for analysis every 24 h. In the donor compartment, 1 mL of NP-BotrAMP14 was added. As a control, to eliminate the effect of the membrane on peptide release, a similar experiment was performed using 1 mL of an aqueous peptide solution in the donor compartment. The experiment was performed in triplicate for each formulation. The amount of peptide released was determined using the BotrAMP14 quantification method. To determine the amount of released peptide that diffuses through the hydrophilic membrane, the following calculation was required:

$$Q_{realt} = C_{measured} \times V_r + V_a \times \sum n - 1 C_a,$$

Where: Q_{realt} represents the cumulative amount of peptide released at time t ; $C_{measured}$ is the measured concentration of the peptide at collection time t ; V_r is the volume of the receptor compartment of the diffusion cell; V_a is the volume of the sample removed at each collection; and C_a is the concentration of peptide in the sample removed.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

To determine if the peptide retained its activity when nanoencapsulation, the broth microdilution method was employed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) ²⁸. An isolated colony was inoculated into Mueller-Hinton broth, incubated at 37°C under agitation for 18 h, and adjusted to obtain a concentration of 1×10⁶ CFU.mL⁻¹. Serial dilutions with nanoparticles containing the peptide were performed in a volume of 50 μL, followed by adding 50 μL of bacterial suspension containing 10⁶ cells in the logarithmic growth phase to each well. The plate was then incubated at 37°C for 24 h. Bacterial growth inhibition was demonstrated by optical density using a microplate reader at a wavelength of 595 nm. The lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth was defined as the MIC.

Results and Discussion

Nanoparticle preparation and characterization

The nanoparticles were obtained through ionotropic gelation. Colloidal nanoparticles of CS-TPP-ALG were spontaneously formed when the TPP-ALG solution was added to the CS solution. It is well-established that CS-TPP nanoparticles result from the ionic gelation of CS, driven by the cross-linking of CS's -NH₃⁺ groups with the P₃O₅⁻ and HP₃O₄⁻ ionic species of TPP. The intra- and intermolecular bonds formed between the negatively charged groups of TPP and a portion of the positively charged amino groups of CS facilitate this process. In the presence of ALG, the ionic gelation is expected to co-occur with the polyelectrolyte complexation with ALG's -COO⁻ groups.

It has also been observed that TPP acts cooperatively in these systems, enhancing the incorporation of CS and the other components ²⁹.

The average size of the nanoparticles obtained (Table 1) is aligned with the results reported in other studies, which achieved chitosan particles with an average length of $304.7 \text{ nm} \pm 24.9$ using the same preparation method. ²¹. Nanoparticles containing $100 \text{ }\mu\text{M}$ of the peptide BotrAMP14 were synthesized and analyzed for size, polydispersity index, and zeta potential. The stability of the nanoparticles was assessed after 30 days of storage at $5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The experiments were conducted in triplicate. Nanoparticles stored at higher temperatures were not evaluated, as the inherent nature of these systems necessitates storage at temperatures ranging from room temperature to lower temperatures. Stability analyses were performed by observing possible changes in the samples' average size, PDI, and zeta potential (Table 1).

Table 1. Characteristics of BotrAMP14-loaded (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) and blank chitosan and sodium alginate nanoparticles (CS-TPP-ALG). Measurements of average size (nm), ζ -potential (mV), and polydispersity index (PDI).

CS-TPP-ALG	Average size (nm)	ζ -potential (mV)	PDI
Day 1	204.03 ± 9.71	26.03 ± 1.95	0.27 ± 0.01
Day 30	251 ± 5.46	24 ± 1.03	0.31 ± 0.13
CS-TPP-ALG-BotrAMP14	Average size (nm)	ζ -potential (mV)	PDI
Day 1	187.73 ± 11.90	30.37 ± 1.56	0.27 ± 0.01
Day 30	214.67 ± 16.47	27.54 ± 0.34	0.33 ± 0.11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

284 In a colloidal dispersion, nanoparticles can adhere to each other, forming
285 aggregates that sediment under the force of gravity. This reaction can compromise the
286 dispersion's physical stability, reducing its shelf life and the efficacy of a drug contained
287 within these nanoparticles.³⁰ Monitoring the average size revealed a variation in the
288 initial hydrodynamic diameter over 30 days, with values fluctuating by approximately
289 50 nm, indicating stability. Regarding the variation in PDI, measurements for both
290 samples were consistent with the size variation results. The nanoparticles showed a
291 relative increase in PDI after 30 days.

292 Concerning the zeta potential, minimal changes were observed in the initial
293 values, which showed a slight decreasing trend. Despite this trend, it is impossible to
294 infer that the samples exhibit reduced stability, as the values remained close to +30 mV.
295 CS-ALG nanoparticle systems subjected to temperature changes were stable in size and
296 zeta potential during one month of storage at 4 °C³¹. Also demonstrating nanoparticle
297 stability, ionic gelation and the development of CS-TPP nanoparticles can be sustained
298 for 1 hour after preparation, with a gradual increase in nanoparticle size over the next 24
299 hours without apparent aggregation³². However, a size increase was also demonstrated
300 after 7 days of storage at 20 °C due to swelling induced by the presence of TPP³³.

301 Given that some studies in the literature report the instability of CS-TPP
302 nanoparticles, it is hypothesized that adding alginate may enhance their physical
303 stability due to the balance of contact forces being fundamental for system stabilization
304³⁴. Since the nanoparticles maintained their physical strength in this study, it can be
305 inferred that alginate provided increased electrostatic interaction with chitosan, making
306 the structure less vulnerable.

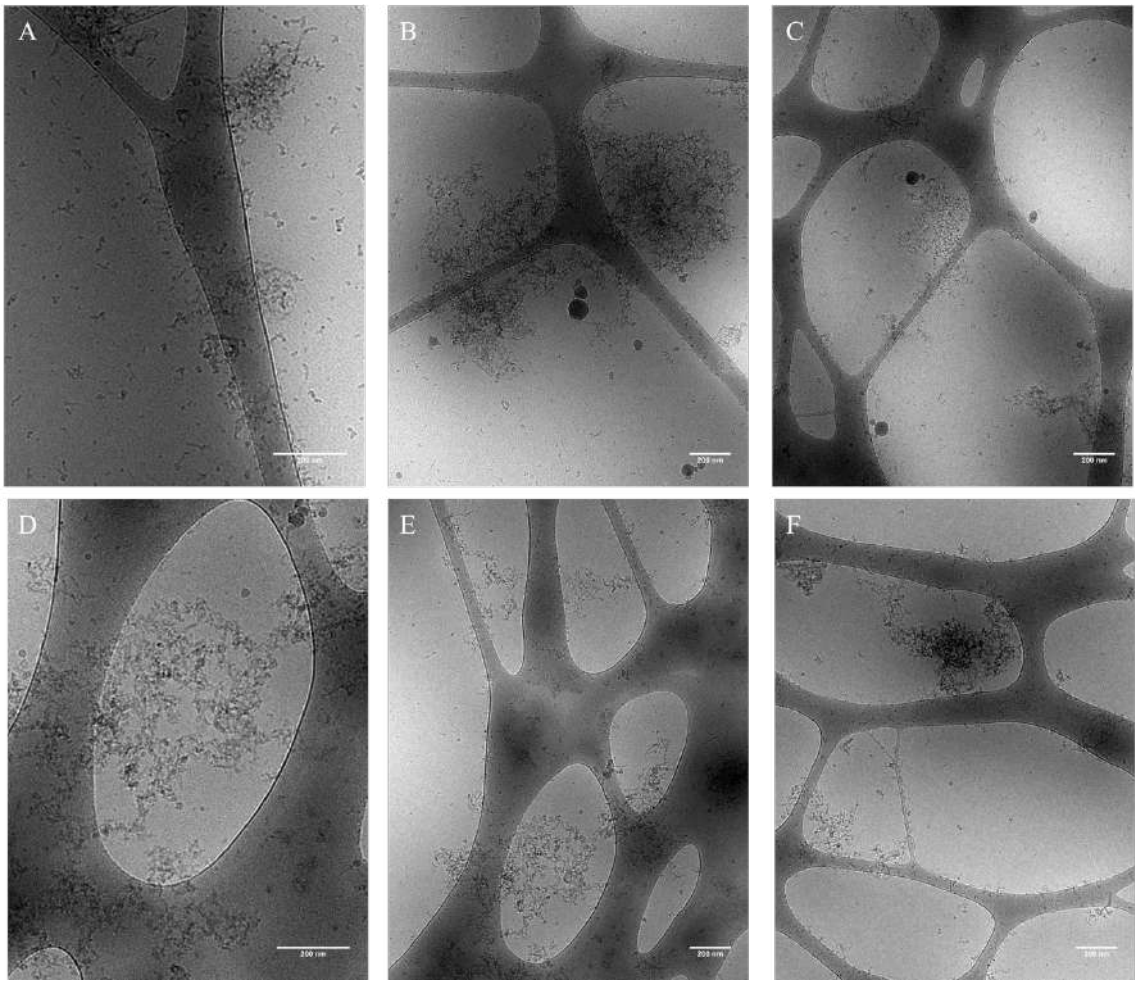
309 **Morphological evaluation of CS-TPP-ALG NPs**

310

311 In a nanoparticulate system, the surface area of the nanoparticle is a crucial
312 parameter for drug transport and interaction with biological membranes. Cryogenic
313 transmission electron microscopy (cryo-TEM) has become essential for characterizing
314 nanomaterials. This technique is frequently used at ultra-low temperatures to analyze
315 nanomaterials that have not been chemically modified and are fully hydrated. It has a
316 high resolution, rapidity, analysis in the fully hydrated state, less relocation of diffused
317 materials, and is suitable for liquid or semi-liquid materials. Figure 1 shows that CS-
318 TPP-ALG NPs and CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs are nanoassemblies. The actual
319 dimensions in 2D, as enabled by cryo-TEM, which involves flash-frozen imaging of
320 NPs and allows visualization of the particles as such, are slightly different from DLS,
321 which provides the hydrodynamic diameter of particles as hypothetical spheres with a
322 diameter of 200 nm (Table 1).

323

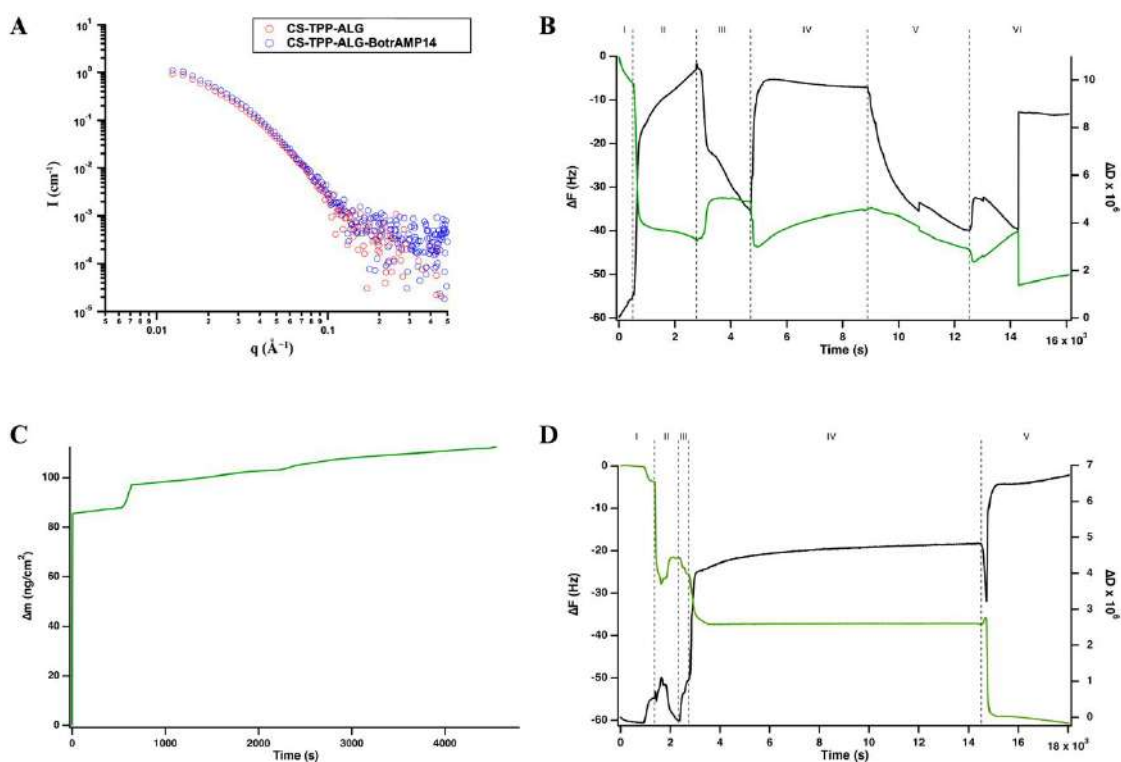
Figure 1. Morphological characterization of CS-TPP-ALG NPs (A, B, and C) and CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs (D, E, and F) by CryoTEM. Scale bars at 200nm.



Small-angle X-ray scattering (SAXS)

The influence of the BotrAMP14 peptide on the nanoparticle structure was analyzed using small-angle X-ray scattering. The SAXS results for both types of formulation are reported in Figure 2A. Both samples, nanoparticles in the presence or absence of the BotrAMP14 peptide, CS-TPP-ALG-BotrAMP14 and CS-TPP-ALG, respectively, follow the same power law at low q values, highlighting that the peptide does not affect the assembly of the nanoparticles after encapsulation.

Figure 2. SAXS pattern of intensity (I) versus scattering vector q for empty nanoparticle formulation (CS-TPP-ALG, red circles) and BotrAMP14-loaded nanoparticles (CS-TPP-ALG-BotrAMP14, blue circles) (A). Representative QCM-D measurements. ΔF (green lines) and ΔD (black lines) at the 7th overtone of the CS-TPP-ALG NPs when loaded with BotrAMP14 (B). (I) Equilibration of the chip with H_2O . (II) Injection of nanoparticles + 30 min incubation (III) Washing with Tris-HCl pH 7.4. (IV) Injection of 100 μM of BotrAMP14 + 1 hour of incubation; (V) 1st washing with 10mM Tris-HCl pH 7.4 for 1h; (VI) 2nd washing with 10mM Tris-HCl + 150mM NaCl pH 7.4 for 1h. Adsorption of BotrAMP14 to NPs (C). ΔF (green lines) and ΔD (black lines) at the 7th overtone of the CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs interacting with the lipid bilayer (D). I) Equilibration of the chip with H_2O . (II) Injection of lipids and observation of bilayer formation ($\Delta F \sim 24$; $\Delta D \sim 1$) followed by MQ wash of excess lipids. (III) Equilibration of crystals with Tris buffer. (IV) Injection of CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs and long monitoring (3h). (V) Washing with 10mM Tris-HCl pH 7.4.



351

352 SAXS measurements complemented the morphological evaluation, suggesting
353 no structure change with the presence or absence of the peptide. In general, the empty
354 nanoparticle (CS-TPP-ALG) does not exhibit any peculiar features in the q regime, as
355 expected from the core-shell structures already reported in the literature ^{35–37}. The
356 loading of BotrAMP14 into the nanoparticles did not significantly affect the internal
357 structure of the formulation, leading only to a slight increase in intensity. This aspect
358 can be explained by the presence of the antimicrobial peptide that increases the contrast
359 with X-rays, i.e., the material's electron density compared to the empty formulation,
360 which scatters slightly more. The combination of cryo-TEM and SAXS provides a
361 comprehensive view of the physical and structural characteristics of nanoparticles,
362 reinforcing the robustness of the developed system ³⁸.

363

364 **QCM-D analysis of the interaction between CS-TPP-ALG with BotrAMP14 and** 365 **lipid bilayer**

366

367 This technique provides real-time monitoring of nanoparticles and model
368 interface interactions, offering insights into adsorption kinetics, adsorbed amounts, and
369 the integrity of both nanoparticles and lipid membrane³⁹. QCM-D is a surface-sensitive,
370 real-time technology. The oscillator's frequency declines when a substance is adsorbed
371 onto the sensor's surface. Consequently, the quantity of material adsorbed on a surface
372 can be determined by the shift in oscillator frequency. The D factor, a dimensionless
373 energy ratio, is expressed in dissipation units of 10^6 ⁴⁰.

374 Adsorption of peptides into nanoparticles was observed through shifts in the
375 frequency of the quartz sensor, Δf (Figure 2B). Six different stages can be distinguished:

first, the frequency of the base crystal immersed in water is obtained; then, a sharp decrease in Δf is observed when the CS-TPP-ALG solution is introduced in the measuring chamber. This decrease in Δf is due to the adsorption of material on the surface of the sensor; when the adsorption process ends ($\Delta f = \text{constant}$), the measurement chamber is flushed with Tris-HCl buffer to remove the chains that are weakly adsorbed to the substrate (third stage).

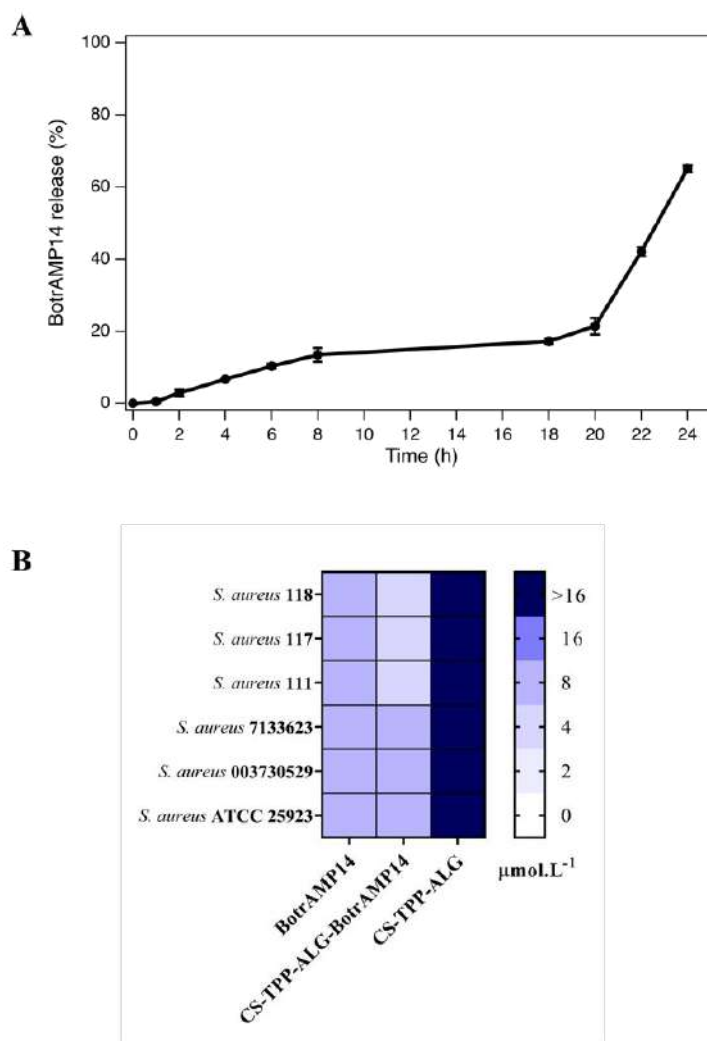
During the process of injection of BotrAMP14 (fourth stage), a decrease in Δf is observed, followed by two stages of rinsing, in which fast shifts in Δf were observed, indicating that the adsorption process may be swelling/deswelling during the rinsing.⁴¹ Adsorption kinetics on charged substrates is a complex process.⁴¹ Our experimental results in the current work show that adsorption kinetics analysis may be represented as a bimodal process.⁴¹ The first fast step could be associated with chain transport to the surface and initial adsorption, and the second slow step could be due to the rearrangement of preabsorbed chains (Figure 2C).

Lipid bilayers from POPC: POPG (3:1) SUVs were formed on SiO₂-coated quartz crystals to analyze the interaction of CS-TPP-ALG-BotrAMP14 NPs with lipid bilayer (Figure 2D). The successful formation of homogeneous lipid bilayers was confirmed by changes in frequency ($\Delta F \sim -25$ – -28 Hz) and dissipation ($\Delta D \sim 0$) (Figure 2D)²⁶. The BotrAMP14-loaded NPs were found to adsorb to the membranes investigated. The QCM-D responses suggest that CS-TPP-ALG NPs bind to the POPC:POPG (3:1) membrane, causing some membrane destabilization.

BotrAMP14 release profile from CS-TPP-ALG NPs

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

400 Encapsulation efficiency was determined by evaluating the amount of peptide
401 interacting with the nanoparticles, whether inside or attached to their surface.
402 Encapsulation efficiency of 92, 51% was obtained by evaluating the amount of free
403 peptide observed in quantification assays by Reversed-Phase High-Performance Liquid
404 ChromatographyThe encapsulation efficiency values correspond to an experiment in
405 which a concentration of 100 μ M of the peptide was used to encapsulate. Other studies
406 have shown that increasing the concentration of a peptide decreases encapsulation
407 efficiency ⁴². This is likely due to the limited capacity of polymeric nanoparticles to
408 accommodate the drug. High encapsulation efficiencies of 80%, similar to those
409 obtained in the present study, were found for insulin encapsulation. The release study
410 was conducted *in vitro* to evaluate the rate at which the peptide was released from the
411 lipid nanoparticle (Figure 3A). BotrAMP14 was released from the nanoparticles at a
412 slow rate. Analysis of the release profile revealed that BotrAMP14 was released in two
413 phases: a slower release rate during the first 18 hours, where 18% of the peptide was
414 released at an almost constant rate, followed by a slightly faster release, reaching 70%
415 after 24 h.
416
417 Figure 3. Release profiles of BotrAMP14 from the chitosan and sodium alginate
418 nanoparticles containing 100 μ M of the peptide (CS-TPP-ALG-BotrAMP14) (A). The
419 experiments were conducted in triplicate. The bars represent the standard deviation.
420 Heatmap of minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan and sodium alginate
421 nanoparticles in the absence or presence of BotrAMP14 peptide (CS-TPP-ALG and CS-
422 TPP-ALG-BotrAMP14, respectively), and BotrAMP14 against three strains of
423 *Staphylococcus aureus* (B).
424



Similar release profiles have been observed in previous studies involving the development of nanoparticles containing other drugs and peptides. Recently, PLGA nanoparticles encapsulated with LL-37 and followed an initial rapid release, accounting for approximately 40% of the total peptide loaded on the first day and reaching 80% peptide release on day 14 ⁴³Similarly, using LL-37 in chitosan/poly(γ -glutamic acid) microparticles, a high loading percentage of LL-37 (40%) and a rapid release of 71.2% within the first hour, with a plateau of about 90% cumulative release after 24 hours, were observed. ⁴⁴.

In another study, the *in vitro* release profile of chitosan nanoparticles loaded with AVP (4–5)-NH₂ peptide showed a slow diffusion of AVP peptide from the

polymeric matrix, with only 17.23% released in the first 24 h and approximately 60% over ten days ⁴⁵. Nanoparticles also offer the benefit of gradual and regulated release, improving drug solubility and stability, increasing efficacy, and reducing toxicity ⁴⁶. Even if an extended release as idealized is not achieved, a slower release that exceeds the daily applications of standard antibiotic treatment, which generally occurs every 8 hours, would still represent a notable release profile.

443

444 **CS-TPP-ALG NPs maintain the BotrAMP14 activity**

445

446 Developing formulations containing antimicrobial peptides as a therapeutic
447 option is a demand at both national and global levels. This work proposed encapsulating
448 the BotrAMP14 peptide in chitosan nanoparticles to increase the peptide's
449 bioavailability through controlled release. The antibacterial effect was evaluated using
450 the broth microdilution method in 96-well plates to determine the minimum inhibitory
451 concentration (MIC). The MIC value is defined as the lowest concentration of a given
452 substance that inhibits the growth of a specific organism ⁴⁷. This assay evaluated the
453 potential of empty nanoparticles, BotrAMP14-loaded nanoparticles, and free
454 BotrAMP14 against an isolate of *S. aureus*. The results of the nanoparticles
455 demonstrated 100% growth inhibition, showing an MIC lower than that of the free
456 peptide (Figure 3B).

457 This result highlights that using polymeric nanoparticles can reduce 2-fold the
458 MIC of bioactive peptides against bacteria, possibly due to a synergistic effect of the
459 peptide with the antibacterial activity of the chitosan present in the nanoparticle. This
460 underscores the importance of using nanoparticles as a promising carrier for proteins or

1
2
3 461 venom peptides as an alternative to enhancing the therapeutic effect of these molecules

4
5 462 42,48–50

6
7 463

8
9
10 464 **Conclusion**

11
12 465 Skin and soft tissue infections, especially those caused by *S. aureus*, represent a
13
14 466 significant challenge in clinical practice. This study addressed this issue by developing
15
16 467 chitosan and alginate nanoparticles encapsulated with the BotrAMP14 peptide,
17
18 468 demonstrating its therapeutic potential. Here, we sought to encapsulate and enhance the
19
20 469 efficacy of BotrAMP14, an antimicrobial peptide, in the CS-TPP-ALG NPs. We found
21
22 470 that the nanoencapsulation of BotrAMP14 offers improved antimicrobial efficacy at
23
24 471 lower concentrations, suggesting that the CS-TPP-ALG NP encapsulation of
25
26 472 BotrAMP14 may be a highly effective therapeutic molecule. The nanoparticles
27
28 473 presented an average size of approximately 200 nm, with a polydispersity index of less
29
30 474 than 0.3, indicating a homogeneous size distribution essential for the delivery system.
31
32 475 The encapsulation efficiency of over 90% ensures that a significant amount of the
33
34 476 peptide reaches the site of infection, maximizing its therapeutic concentration.
35
36 477 Furthermore, the in vitro release profile revealed a biphasic behavior, with an initial
37
38 478 phase of slow and sustained release, followed by a faster release, which is ideal for
39
40 479 continuous treatment of infections. Antimicrobial assays demonstrated that the
41
42 480 encapsulated BotrAMP14 maintained its activity against *S. aureus* strains, highlighting
43
44 481 that nanoencapsulation did not compromise its efficacy. These results suggest that this
45
46 482 system may offer an effective alternative to conventional treatments, especially in
47
48 483 increasing bacterial resistance. The following steps in the research may focus on
49
50 484 optimizing chitosan nanoparticle formulations to improve antimicrobial peptides'
51
52 485 encapsulation efficiency and stability.
53
54
55
56
57
58
59
60

References

(1) Karnam, S.; Jindal, A. B.; Agnihotri, C.; Singh, B. P.; Paul, A. T. Topical Nanotherapeutics for Treating MRSA-Associated Skin and Soft Tissue Infection (SSTIs). *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24* (5), 108. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02563-2>.

(2) Forero-Doria, O.; Parra-Cid, C.; Venturini, W.; Espinoza, C.; Araya-Maturana, R.; Valenzuela-Riffo, F.; Saldias, C.; Leiva, A.; Duarte, Y.; Echeverría, J.; Guzmán, L. Novel N-Benzoylimidazolium Ionic Liquids Derived from Benzoic and Hydroxybenzoic Acids as Therapeutic Alternative against Biofilm-Forming Bacteria in Skin and Soft-Tissue Infections. *Bioorg Chem* **2022**, *126*, 105914. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105914>.

(3) Linz, M. S.; Mattappallil, A.; Finkel, D.; Parker, D. Clinical Impact of Staphylococcus Aureus Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics* **2023**, *12* (3), 557. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030557>.

(4) Esposito, S.; Noviello, S.; Leone, S. Epidemiology and Microbiology of Skin and Soft Tissue Infections. *Curr Opin Infect Dis* **2016**, *29* (2), 109–115. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000239>.

(5) Millar, E. V; Schlett, C. D.; Law, N. N.; Whitman, T. J.; Ellis, M. W.; Tribble, D. R.; Bennett, J. W. Opportunities and Obstacles in the Prevention of Skin and Soft-Tissue Infections Among Military Personnel. *Mil Med* **2019**, *184* (Supplement_2), 35–43. <https://doi.org/10.1093/milmed/usz105>.

(6) Kebriaei, R.; Rice, S. A.; Singh, N. B.; Stamper, K. C.; Nguyen, L.; Sheikh, Z.; Rybak, M. J. Combinations of (Lipo)Glycopeptides with β -Lactams against

- 510 MRSA: Susceptibility Insights. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2020**, 75
511 (10), 2894–2901. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa237>.
- 512 (7) Porto, W. F.; Irazazabal, L. N.; Humblot, V.; Haney, E. F.; Ribeiro, S. M.;
513 Hancock, R. E. W.; Ladram, A.; Franco, O. L. EcDBS1R6: A Novel Cationic
514 Antimicrobial Peptide Derived from a Signal Peptide Sequence. *Biochimica et*
515 *Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2020**, 1864 (9), 129633.
516 <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129633>.
- 517 (8) Dijksteel, G. S.; Ulrich, M. M. W.; Middelkoop, E.; Boekema, B. K. H. L.
518 Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides
519 (AMPs). *Front Microbiol* **2021**, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616979>.
- 520 (9) Oliveira, N. G. J.; Cardoso, M. H.; Velikova, N.; Giesbers, M.; Wells, J. M.;
521 Rezende, T. M. B.; de Vries, R.; Franco, O. L. Physicochemical-Guided Design
522 of Cathelicidin-Derived Peptides Generates Membrane Active Variants with
523 Therapeutic Potential. *Sci Rep* **2020**, 10 (1), 9127.
524 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66164-w>.
- 525 (10) Fry, D. E. Antimicrobial Peptides. *Surg Infect (Larchmt)* **2018**, 19 (8), 804–811.
526 <https://doi.org/10.1089/sur.2018.194>.
- 527 (11) Ye, C.; Chi, H. A Review of Recent Progress in Drug and Protein Encapsulation:
528 Approaches, Applications and Challenges. *Materials Science and Engineering: C*
529 **2018**, 83, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.10.003>.
- 530 (12) Jallouk, A. P.; Palekar, R. U.; Pan, H.; Schlesinger, P. H.; Wickline, S. A.
531 Modifications of Natural Peptides for Nanoparticle and Drug Design; 2015; pp
532 57–91. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.12.001>.
- 533 (13) Ezike, T. C.; Okpala, U. S.; Onoja, U. L.; Nwike, C. P.; Ezeako, E. C.; Okpara,
534 O. J.; Okoroafor, C. C.; Eze, S. C.; Kalu, O. L.; Odoh, E. C.; Nwadike, U. G.;

1
2
3 535 Ogbodo, J. O.; Umeh, B. U.; Ossai, E. C.; Nwanguma, B. C. Advances in Drug
4
5 536 Delivery Systems, Challenges and Future Directions. *Heliyon* **2023**, *9* (6),
6
7 537 e17488. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488>.
8
9
10 538 (14) Bezerra, T. P. W.; Bandeira, A. R. G.; Lima, S. H. P. de; Andrade, P. L. de. A
11
12 539 Nanotecnologia Aplicada Ao Desenvolvimento de Fármacos: Revisão Integrativa
13
14 540 Da Literatura. *Research, Society and Development* **2022**, *11* (14), e99111436115.
15
16 541 <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36115>.
17
18
19 542 (15) Waheed, S.; Li, Z.; Zhang, F.; Chiarini, A.; Armato, U.; Wu, J. Engineering
20
21 543 Nano-Drug Biointerface to Overcome Biological Barriers toward Precision Drug
22
23 544 Delivery. *J Nanobiotechnology* **2022**, *20* (1), 395.
24
25 545 <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01605-4>.
26
27
28 546 (16) Hajimohammadi, S.; Momtaz, H.; Tajbakhsh, E. Fabrication and Antimicrobial
29
30 547 Properties of Novel Meropenem-honey Encapsulated Chitosan Nanoparticles
31
32 548 against Multiresistant and Biofilm-forming *Staphylococcus Aureus* as a New
33
34 549 Antimicrobial Agent. *Vet Med Sci* **2024**, *10* (3).
35
36 550 <https://doi.org/10.1002/vms3.1440>.
37
38
39 551 (17) Ke, C.-L.; Deng, F.-S.; Chuang, C.-Y.; Lin, C.-H. Antimicrobial Actions and
40
41 552 Applications of Chitosan. *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (6), 904.
42
43 553 <https://doi.org/10.3390/polym13060904>.
44
45
46 554 (18) Rana, R.; Rani, S.; Kumar, V.; Nakhate, K. T.; Ajazuddin; Gupta, U. Sialic Acid
47
48 555 Conjugated Chitosan Nanoparticles: Modulation to Target Tumour Cells and
49
50 556 Therapeutic Opportunities. *AAPS PharmSciTech* **2022**, *23* (1), 10.
51
52 557 <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02170-z>.
53
54
55
56
57
58
59
60

- (19) Yan, D.; Li, Y.; Liu, Y.; Li, N.; Zhang, X.; Yan, C. Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules* **2021**, *26* (23), 7136. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>.
- (20) Yilmaz Atay, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. In *Functional Chitosan*; Springer Singapore: Singapore, 2019; pp 457–489. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15.
- (21) Calvo, P.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J Appl Polym Sci* **1997**, *63* (1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4).
- (22) Oliveira Lima, K.; Barreto Pinilla, C. M.; Alemán, A.; López-Caballero, M. E.; Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P.; Prentice, C. Characterization, Bioactivity and Application of Chitosan-Based Nanoparticles in a Food Emulsion Model. *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (19), 3331. <https://doi.org/10.3390/polym13193331>.
- (23) Matos, B. N.; Reis, T. A.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Chitosan Nanoparticles for Targeting and Sustaining Minoxidil Sulphate Delivery to Hair Follicles. *Int J Biol Macromol* **2015**, *75*, 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036>.
- (24) Collins, T. J. ImageJ for Microscopy. *Biotechniques* **2007**, *43* (sup1). <https://doi.org/10.2144/000112517>.
- (25) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

- 581 (26) Cho, N.-J.; Frank, C. W.; Kasemo, B.; Höök, F. Quartz Crystal Microbalance
582 with Dissipation Monitoring of Supported Lipid Bilayers on Various Substrates.
583 *Nat Protoc* **2010**, 5 (6), 1096–1106. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.65>.
- 584 (27) Matos, B. N.; Pereira, M. N.; Bravo, M. de O.; Cunha-Filho, M.; Saldanha-
585 Araújo, F.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Chitosan Nanoparticles Loading
586 Oxaliplatin as a Mucoadhesive Topical Treatment of Oral Tumors: Iontophoresis
587 Further Enhances Drug Delivery Ex Vivo. *Int J Biol Macromol* **2020**, 154, 1265–
588 1275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.001>.
- 589 (28) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and Broth Dilution Methods to
590 Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial
591 Substances. *Nat Protoc* **2008**, 3 (2), 163–175.
- 592 (29) Trapani, A.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Novel Drug Nanocarriers
593 Combining Hydrophilic Cyclodextrins and Chitosan. *Nanotechnology* **2008**, 19
594 (18), 185101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/18/185101>.
- 595 (30) Nagpal, K.; Singh, S. K.; Mishra, D. N. Chitosan Nanoparticles: A Promising
596 System in Novel Drug Delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2010**, 58 (11), 1423–
597 1430. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>.
- 598 (31) Sæther, H. V.; Holme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T.
599 Polyelectrolyte Complex Formation Using Alginate and Chitosan. *Carbohydr*
600 *Polym* **2008**, 74 (4), 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.048>.
- 601 (32) Gan, Q.; Wang, T.; Cochrane, C.; McCarron, P. Modulation of Surface Charge,
602 Particle Size and Morphological Properties of Chitosan–TPP Nanoparticles
603 Intended for Gene Delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2005**, 44 (2–3), 65–73.
604 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>.

- (33) López-León, T.; Carvalho, E. L. S.; Seijo, B.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D. Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior. *J Colloid Interface Sci* **2005**, *283* (2), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186>.
- (34) Tsai, M.-L.; Chen, R.-H.; Bai, S.-W.; Chen, W.-Y. The Storage Stability of Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles in a Phosphate Buffer. *Carbohydr Polym* **2011**, *84* (2), 756–761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.040>.
- (35) Kloster, G. A.; Moscoso Londoño, O.; Pirota, K. R.; Mosiewicki, M. A.; Marcovich, N. E. Design of Super-Paramagnetic Bilayer Films Based on Chitosan and Sodium Alginate. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2021**, *2*, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100083>.
- (36) Liu, J.; Xiao, J.; Li, F.; Shi, Y.; Li, D.; Huang, Q. Chitosan-Sodium Alginate Nanoparticle as a Delivery System for ϵ -Polylysine: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity. *Food Control* **2018**, *91*, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.020>.
- (37) Sun, R.; Zhu, J.; Wu, H.; Wang, S.; Li, W.; Sun, Q. Modulating Layer-by-Layer Assembled Sodium Alginate-Chitosan Film Properties through Incorporation of Cellulose Nanocrystals with Different Surface Charge Densities. *Int J Biol Macromol* **2021**, *180*, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.092>.
- (38) Ristori, S.; Grillo, I.; Lusa, S.; Thamm, J.; Valentino, G.; Campani, V.; Caraglia, M.; Steiniger, F.; Luciani, P.; De Rosa, G. Structural Characterization of Self-Assembling Hybrid Nanoparticles for Bisphosphonate Delivery in Tumors. *Mol Pharm* **2018**, *15* (3), 1258–1265. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01085>.

- 629 (39) Nyström, L.; Álvarez-Asencio, R.; Frenning, G.; Saunders, B. R.; Rutland, M.
630 W.; Malmsten, M. Electrostatic Swelling Transitions in Surface-Bound
631 Microgels. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (40), 27129–27139.
632 <https://doi.org/10.1021/acsami.6b09751>.
- 633 (40) Teramura, Y.; Kuroyama, K.; Takai, M. Influence of Molecular Weight of PEG
634 Chain on Interaction between Streptavidin and Biotin–PEG-Conjugated
635 Phospholipids Studied with QCM-D. *Acta Biomater* **2016**, *30*, 135–143.
636 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.003>.
- 637 (41) Guzmán, E.; Ortega, F.; Prolongo, M. G.; Starov, V. M.; Rubio, R. G. Influence
638 of the Molecular Architecture on the Adsorption onto Solid Surfaces: Comb-like
639 Polymers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (36), 16416.
640 <https://doi.org/10.1039/c1cp21967g>.
- 641 (42) Mohammadpour Dounighi, N.; Eskandari, R.; Avadi, M.; Zolfagharian, H.; Mir
642 Mohammad Sadeghi, A.; Rezayat, M. Preparation and in Vitro Characterization
643 of Chitosan Nanoparticles Containing Mesobuthus Eupeus Scorpion Venom as
644 an Antigen Delivery System. *Journal of Venomous Animals and Toxins including*
645 *Tropical Diseases* **2012**, *18* (1), 44–52. [https://doi.org/10.1590/S1678-](https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100006)
646 [91992012000100006](https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100006).
- 647 (43) Chereddy, K. K.; Her, C.-H.; Comune, M.; Moia, C.; Lopes, A.; Porporato, P. E.;
648 Vanacker, J.; Lam, M. C.; Steinstraesser, L.; Sonveaux, P.; Zhu, H.; Ferreira, L.
649 S.; Vandermeulen, G.; Pr  at, V. PLGA Nanoparticles Loaded with Host Defense
650 Peptide LL37 Promote Wound Healing. *Journal of Controlled Release* **2014**,
651 *194*, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.016>.
- 652 (44) Sun, Y.; Liu, Y.; Liu, W.; Lu, C.; Wang, L. Chitosan Microparticles Ionically
653 Cross-Linked with Poly(γ -Glutamic Acid) as Antimicrobial Peptides and Nitric

- 654 Oxide Delivery Systems. *Biochem Eng J* **2015**, *95*, 78–85.
655 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.022>.
- 656 (45) Kecel-Gunduz, S.; Budama-Kilinc, Y.; Cakir-Koc, R.; Zorlu, T.; Bicak, B.;
657 Kokcu, Y.; E. Ozel, A.; Akyuz, S. In Silico Design of AVP (4–5) Peptide and
658 Synthesis, Characterization and in Vitro Activity of Chitosan Nanoparticles.
659 *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *28* (1), 139–157.
660 <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00325-9>.
- 661 (46) Wang, J. J.; Zeng, Z. W.; Xiao, R. Z.; Xie, T.; Zhou, G. L.; Zhan, X. R.; Wang,
662 S. L. Recent Advances of Chitosan Nanoparticles as Drug Carriers. *Int J*
663 *Nanomedicine* **2011**, 765. <https://doi.org/10.2147/IJN.S17296>.
- 664 (47) CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*.
- 665 (48) Mesquita, P. C.; dos Santos-Silva, E.; Streck, L.; Damasceno, I. Z.; Maia, A. M.
666 S.; Fernandes-Pedrosa, M. F.; da Silva-Júnior, A. A. Cationic Functionalized
667 Biocompatible Polylactide Nanoparticles for Slow Release of Proteins. *Colloids*
668 *Surf A Physicochem Eng Asp* **2017**, *513*, 442–451.
669 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.11.013>.
- 670 (49) Rocha Soares, K. S.; Cardozo Fonseca, J. L.; Oliveira Bitencourt, M. A.; Santos,
671 K. S. C. R.; Silva-Júnior, A. A.; Fernandes-Pedrosa, M. F. Serum Production
672 against Tityus Serrulatus Scorpion Venom Using Cross-Linked Chitosan
673 Nanoparticles as Immunoadjuvant. *Toxicon* **2012**, *60* (8), 1349–1354.
674 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.010>.
- 675 (50) Torchilin, V. P. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and
676 Imaging. *AAPS J* **2007**, *9* (2), E128–E147. <https://doi.org/10.1208/aapsj0902015>.
- 677
678



Screening for cysteine-stabilized scaffolds for developing proteolytic-resistant AMPs

Mariana Rocha Maximiano^{a,b,†}, Samilla Beatriz Rezende^{a,†},
 Thuanny Borba Rios^{a,b}, Michel Lopes Leite^c,
 Liana Costa Pereira Vilas Boas^{b,d}, Nicolau Brito da Cunha^b,
 Állan da Silva Pires^b, Marlon Henrique Cardoso^{a,b},
 and Octávio Luiz Franco^{a,b,d,*}

^aS-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

^bCentro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

^cDepartamento de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^dPrograma de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

*Corresponding author: e-mail address: ocf Franco@gmail.com

Contents

1. Introduction	68
2. Materials and equipment	70
2.1 <i>In silico</i>	70
2.2 <i>In vitro</i>	70
3. Step-by-step method details	71
3.1 <i>In silico</i>	71
3.2 Peptide's synthesis	86
3.3 Activity evaluation <i>in vitro</i>	86
4. Safety consideration	96
Acknowledgment	96
References	96

Abstract

Antimicrobial peptides (AMP) are present in all organisms and can present several activities and potential applications in human and animal health. Screening these molecules scaffolds represents a key point for discovering and developing novel biotechnological products, including antimicrobial, antiviral and anticancer drugs candidates and

[†] These authors contributed equally.

Repurposing streptomycin and chloramphenicol against bacterial pathogens by combination with diminazene aceturate

Thuanny Borba Rios^{1,2,4}, Osmar Nascimento Silva³, Camila Maurmann de Souza⁴, Isabel Cristina Marques Fensterseifer⁴, Angela Mehta⁵, Octávio Luiz Franco^{1,2,4,*}

¹S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande—MS, 79117-900, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia) Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora—MG, 36036-900, Brazil

³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Evangélica de Anápolis, Av. Universitária, s/n - Cidade Universitária, Anápolis—GO, Brazil

⁴Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia Universidade Católica de Brasília, St. de Grandes Áreas Norte 916—Asa Norte, Brasília - DF, 70790-160, Brazil

⁵Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) Caixa Postal 02372 – Brasília, DF—CEP, 70770-917, Brazil

*Corresponding author. S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil. E-mail: ocfranco@gmail.com

Abstract

Bacterial resistance is a threat to health worldwide, mainly due to reduced effective treatment. In this context, the search for strategies to control such infections and suppress antimicrobial resistance is necessary. One of the strategies that has been used is combination therapy. In the present work, we investigated the *in vitro* efficacy of the antimicrobials diminazene aceturate (DA), chloramphenicol (CHL), and streptomycin (STP) alone and in combination against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* clinical isolates. DA was capable of inhibiting all strains with MIC of 25–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while STP and CHL showed antibacterial activity with minimum inhibitory concentration (MICs) of ≤ 3.12 –400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The combination of aceturate with STP showed synergism toward almost all Gram-negative bacteria, with fractional inhibitory concentration index (FICIs) of 0.09–0.37. In addition, for CHL and aceturate, synergisms for Gram-negative and -positive strains were observed. A time-kill assay against *E. coli* revealed that the aceturate and STP combination can inhibit bacterial growth in a shorter time when compared with single antibiotics. In addition, antimicrobials did not show hemolytic activity even at the highest concentrations used. Therefore, the antimicrobial combinations presented in this work showed important results, demonstrating that combined therapy can be used as an alternative strategy for pathogen control.

Significance and impact of the study

Here, synergistic interactions between DA, a drug used for trypanosomiasis control in animals, and STP and CHL, commonly utilized against Gram-positive and -negative bacteria, have been reported. DA, when combined with STP and CHL, showed synergistic effects against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *S. aureus* clinical isolates. These data suggest that DA in combination with antibiotics can be used as a strategy for the repositioning of these in the treatment of new diseases.

Keywords: bacterial resistance, antimicrobials, synergism, diminazene aceturate, chloramphenicol, streptomycin

Introduction

Antimicrobial resistance is considered one of the most important public health problems of the 21st century, due to its increasing incidence (World Health Organization 2014, IACG 2019). In addition, the constant emergence of antibiotic-resistant bacterial strains (Long and Vester 2012) makes resistance a challenge that requires a multifaceted approach, including biomedical innovation, better control of antibiotic consumption and antimicrobial resistance rates, rapid microbiological diagnosis, and reduced clinical and veterinary use (Cassir et al. 2014).

The acquired and inherent resistance of bacterial strains has arisen from therapeutic treatments. In view of the fact that

bacterial resistance may become inevitable, the pharmaceutical industry has lost interest in the discovery of new antimicrobials, taking into account the high costs for clinical trials and the long period for completing preclinical and clinical tests (Martens and Demain 2017). In addition, the lack of clarity, the level of bureaucracy, changes in regulatory rules, and the difference in the clinical study assumptions between countries are other obstacles for the industry, seeking rapid and substantial returns (Sharma et al. 2018). Changes made by agencies to clinical trial standards make the development and validation of a new drug a time-consuming, costly, and highly bureaucratic process. Furthermore, the success of its final production is never guaranteed, as shown in 2019, when only four an-

Received: May 6, 2022. Revised: September 2, 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of Applied Microbiology International. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com



Contents lists available at ScienceDirect

Sensing and Bio-Sensing Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sbsr

Nanosensors for animal infectious disease detection

Thuanny Borba Rios^{a,b}, Mariana Rocha Maximiano^{a,b}, Gabriel Cidade Feitosa^b,
Martin Malmsten^{c,d}, Octávio Luiz Franco^{a,b,*}

^a S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^c Department of Pharmacy, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark

^d Physical Chemistry 1, University of Lund, S-221 00 Lund, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Agribusiness
Animal health
Diagnostic
Immunosensors
Nanoparticles
Nanosensors
Nanotechnology
Peptides

ABSTRACT

Infectious diseases in farm animals triggered by pathogenic microorganisms affect the health and well-being of livestock and human populations. Pathogen detection is an important step for the successful diagnosis, treatment and control of infectious diseases in animals. Pathogens that persist in the poultry and livestock industries can be responsible for more than 70% of emerging infections. Thus, rapid diagnostic tools are extremely important. In recent years, nanotechnology has emerged as a great opportunity to tackle this challenge and to develop fast, accurate and economical diagnostics for the detection of pathogens. Various nanostructures, due to the presence of unique characteristics shown in nanomaterials, have already been applied in biodiagnostics to detect specific molecular targets, including pathogen detection. In this context, this review focuses on the application, role and challenges of nanosensors in detecting disease-causing pathogens in agriculture. Several nanostructures are investigated for their utility in providing innovative solutions for pathogen detection in farm animals. This comprehensive examination seeks to unravel the intricate nanosensors landscape, shedding some light on their role in advancing diagnostic capabilities within the agricultural domain. By elucidating the challenges inherent in their application, the review contributes to the ongoing discourse on harnessing nanotechnology for the detection and management of infectious diseases in livestock, ultimately paving the way for developments in veterinary diagnostics.

1. Introduction

Mirroring the immense increase in the world population, the demand for animal origin food products is increasing and projected to double by 2050 [1]. This increase in demand for food points toward an imbalance in relation to supply, which must be addressed if food supply and security is to be preserved [2]. Even temporary interruptions in animal production can have severe consequences, triggering a cascade of harmful events and impairing the supply balance of animal-based proteins for the human population [3,4]. In this scenario, infectious agents that can cause animal diseases are the ones which pose the largest threat to the stability of world production systems [5,6] and can impact animal welfare, reducing potential production and cost-effectiveness, in addition to having potential environmental and biodiversity consequences worldwide [7,8].

Pathogens can cause infectious diseases that display symptoms with onsets ranging from minutes to hours or even days after the original infection [9,10]. These infections can spread to healthy animals from an affected animal or vector [9]. Correct and efficient diagnosis of disorders is further precluded by the complexity and diversity of disease-causing microorganisms, as well as by the lengthy incubation periods of some of these agents prior to the onset of disease symptoms. Adding to this, a wide range of pathogens cause diseases, including bacteria, viruses, fungi, protozoa, parasitic worms, and prions, with bacteria having the greatest influence on the animal food supply chain [9]. Bacterial infections can present a threat to human and animal health and are one of the most common causes of death worldwide due to an increasing incidence and spread [11]. Bacterial infections were shown to be responsible for 7.7 million fatalities in 2019, which equates to one-eighth of all global deaths and elevates bacterial infections to the

* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Modulo C, Brasília-DF, Brazil.

E-mail address: ocfranco@gmail.com (O.L. Franco).

<https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2024.100622>

Received 26 September 2023; Received in revised form 24 December 2023; Accepted 1 February 2024

Available online 4 February 2024

2214-1804/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anti-Staphy Peptides Rationally Designed from Cry10Aa Bacterial Protein

Thuanny Borba Rios, Mariana Rocha Maximiano, Fabiano Cavalcanti Fernandes, Gabriella Cavalcante Amorim, William Farias Porto, Danieli Fernanda Buccini, Valentina Nieto Marín, Gabriel Cidade Feitosa, Carlos Daniel Pereira Freitas, Juliana Bueno Barra, Antonio Alonso, Maria Fátima Grossi de Sá, Luciano Moraes Lião,* and Octávio Luiz Franco*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07455>



Read Online

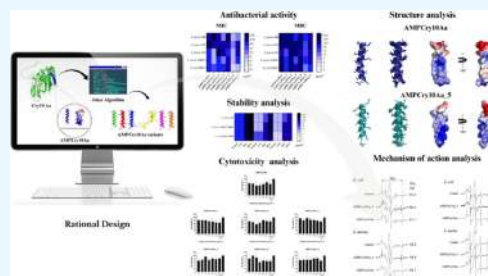
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Bacterial infections pose a significant threat to human health, constituting a major challenge for healthcare systems. Antibiotic resistance is particularly concerning in the context of treating staphylococcal infections. In addressing this challenge, antimicrobial peptides (AMPs), characterized by their hydrophobic and cationic properties, unique mechanism of action, and remarkable bactericidal and immunomodulatory capabilities, emerge as promising alternatives to conventional antibiotics for tackling bacterial multidrug resistance. This study focuses on the Cry10Aa protein as a template for generating AMPs due to its membrane-penetrating ability. Leveraging the Joker algorithm, six peptide variants were derived from α -helix 3 of Cry10Aa, known for its interaction with lipid bilayers. In vitro, antimicrobial assays



determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) required for inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Time-kill kinetics were performed using the parental peptide AMPCry10Aa, as well as AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5, against *E. coli* ATCC, *S. aureus* 111 and *S. aureus* ATCC strains showing that AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5 peptides can completely reduce the initial bacterial load with less than 2 h of incubation. AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5 present stability in human serum and activity maintenance up to 37 °C. Cytotoxicity assays, conducted using the MTT method, revealed that all of the tested peptides exhibited cell viability >50% (IC₅₀). The study also encompassed evaluations of the structure and physical-chemical properties. The three-dimensional structures of AMPCry10Aa and AMPCry10Aa_5 were determined through nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, indicating the adoption of α -helical segments. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy elucidated the mechanism of action, demonstrating that AMPCry10Aa_5 enters the outer membranes of *E. coli* and *S. aureus*, causing substantial increases in lipid fluidity, while AMPCry10Aa slightly increases lipid fluidity in *E. coli*. In conclusion, the results obtained underscore the potential of Cry10Aa as a source for developing antimicrobial peptides as alternatives to conventional antibiotics, offering a promising avenue in the battle against antibiotic resistance.

INTRODUCTION

Bacterial infections, due to their rising occurrence and dissemination, pose a hazard to human health and a severe concern for healthcare systems.¹ Emerging and re-emerging infectious diseases have been identified as one of the greatest public health issues in the last three decades, and despite modern health care, bacterial infectious diseases remain one of the leading causes of global mortality.²

Staphylococcus aureus is a Gram-positive opportunistic pathogen responsible for several diseases, ranging from skin infections and abscesses to much more severe endocarditis, osteomyelitis, pneumonia, meningitis, and sepsis.^{3–5} Resistance to currently used antibiotics, such as methicillin, vancomycin,

daptomycin, and linezolid, is a serious issue in staphylococcal infection treatment.^{6–8} Antimicrobial resistance is a natural phenomenon produced by exposure of microorganisms to antibiotic molecules and has been treated as one of the greatest threats to public health in the 21st century.^{9,10} Selective pressure

Received: September 26, 2023

Revised: June 3, 2024

Accepted: June 5, 2024



OPEN ACCESS

EDITED BY
Elizabete de Souza Cândido,
Dom Bosco Catholic University, Brazil

REVIEWED BY
Håvard Jenssen,
Roskilde University, Denmark
Mark Anthony Jackson,
Queensland University of Technology,
Australia
Edward Kalani Gilding,
The University of Queensland, Australia

*CORRESPONDENCE
Octávio Luiz Franco,
ocfranco@gmail.com

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Protein
Biochemistry for Basic and Applied
Sciences,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

RECEIVED 06 March 2022
ACCEPTED 15 July 2022
PUBLISHED 23 August 2022

CITATION
Maximiano MR, Rios TB, Campos ML,
Prado GS, Dias SC and Franco OL
(2022), Nanoparticles in association
with antimicrobial peptides (NanoAMPs)
as a promising combination for
agriculture development.
Front. Mol. Biosci. 9:890654.
doi: 10.3389/fmolb.2022.890654

COPYRIGHT
© 2022 Maximiano, Rios, Campos,
Prado, Dias and Franco. This is an open-
access article distributed under the
terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Nanoparticles in association with antimicrobial peptides (NanoAMPs) as a promising combination for agriculture development

Mariana Rocha Maximiano^{1,2}, Thuanny Borba Rios^{1,2},
Marcelo Lattarulo Campos³, Guilherme Souza Prado⁴,
Simoni Campos Dias^{2,5} and Octávio Luiz Franco^{1,2*}

¹S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil, ²Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil, ³Integrative Plant Research Laboratory, Departamento de Botânica e Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal de MT, Cuiabá, Brazil, ⁴Embrapa Arroz e Feijão, Laboratório de Biotecnologia, Goiânia, GO, Brazil, ⁵Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Antimicrobial peptides are small molecules, up to 10 kDa, present in all kingdoms of life, including in plants. Several studies report that these molecules have a broad spectrum of activity, including antibacterial, antifungal, antiviral, and insecticidal activity. Thus, they can be employed in agriculture as alternative tools for phytopathogen and pest control. However, the application of peptides in agriculture can present challenges, such as loss of activity due to degradation of these molecules, off-target effects, and others. In this context, nanotechnology can offer versatile structures, including metallic nanoparticles, liposomes, polymeric nanoparticles, nanofibers, and others, which might act both in protection and in release of AMPs. Several polymers and biomaterials can be employed for the development of nanostructures, such as inorganic metals, natural or synthetic lipids, synthetic and hybrid polymers, and others. This review addresses the versatility of NanoAMPs (Nanoparticles in association with antimicrobial peptides), and their potential applications in agribusiness, as an alternative for the control of phytopathogens in crops.

KEYWORDS

antimicrobial peptides, nanostructure, crop production, biotic stress, food production, biotechnology, agribusiness

1 Introduction

Antimicrobial peptides (AMP) are small (up to 10 kDa) cationic molecules, with amphipathic structures composed of hydrophobic and positively charged domains (Bin Hafeez et al., 2021; Sarkar et al., 2021). These molecules have been found in all kingdoms of life. Contrary to what their name suggests, AMPs can present miscellaneous activities

REVIEW ARTICLE

Genetic basis of antibiotic resistance in bovine mastitis and its possible implications for human and ecological health

Wendy Johana Velasco Garcia^a, Nilton Araripe dos Santos Neto^{a,b}, Thuanny Borba Rios^c, Mariana Rocha Maximiano^{a,c}, Camila Maurmann de Souza^{a,c} and Octávio Luiz Franco^{a,b,c}

^aCentro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ^bUniversidade de Brasília, Pós-Graduação em Patologia Molecular, Brasília, DF, Brazil; ^cS-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

ABSTRACT

Bovine mastitis is a mammary gland inflammation that can occur due to infectious pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which are, respectively, the most prevalent Gram-positive and Gram-negative bacteria associated with this disease. Currently, antibiotic treatment has become more complicated due to the presence of resistant pathogens. This review, therefore, aims to identify the most common resistance genes reported for these strains in the last four years. During the review, it was noted that *bla_z*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{ampC}* are the most reported genes for *S. aureus* and *E. coli*, associated with drug inactivation, mainly β -lactamases. They are characterized by generating bacterial resistance to β -lactam antibiotics, the most common treatment in animal and human bacterial treatments (penicillins and cephalosporins, among others). Genes associated with efflux systems were also present in the two strains and included *norA*, *tetA*, *tetC*, and *tetK*, which generate resistance to macrolide and tetracycline antibiotics. Additionally, the effects of spreading resistance between animals and humans through direct contact (such as consumption of contaminated milk) or indirect contact (through environmental contamination) has been deeply discussed, emphasizing the importance of having adequate sanitation and antibiotic control and administration protocols.

ARTICLE HISTORY

Received 17 October 2023
Revised 7 June 2024
Accepted 11 June 2024

KEYWORDS

Bovine mastitis;
antibiotics; resistance;
genes; genomics

Introduction

Bovine mastitis, characterized by acute inflammation in the breast tissues, can have various origins, either non-infectious, stemming from irritating chemicals, physical trauma, or udder injuries, or infectious, which is the most prevalent cause, resulting from microorganisms such as algae, fungi, bacteria, and viruses (Wn and Sg 2020). There have been reports of over 100 microorganisms being accountable for infectious bovine mastitis, encompassing both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Holko et al. 2019). Among the most widespread Gram-negative bacteria are *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, while *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* are included in the Gram-positive bacteria category (Ashraf and Imran 2020).

The typical signs in infected cows include swelling, heat, and soreness in the udder, abnormally colored milk (yellow color and with viscosity alterations), elevated body temperatures, lethargy, and anorexia

(Ashraf and Imran 2020). Clinical and subclinical mastitis are the two main subtypes of the complex disease known as bovine mastitis. Clinical mastitis manifests both local and systemic stages, including afflicted areas redness and inflammation, pain, lack of appetite, body temperature increase, as well as a milk production decrease and composition changes (Wn and Sg 2020; Ashraf and Imran 2020). The mammary gland and milk appear as they normally would in subclinical mastitis. However, one of the main subclinical mastitis signs consists of a somatic cell count (SCC) increase (Wn and Sg 2020).

The economic damage resulting from these infections is related to direct and indirect losses (Azooz et al. 2020), which include treatment costs, discarded milk, fatalities, and costs associated with repeated mastitis cases (Ashraf and Imran 2020; Hayashi et al. 2023). In addition to the decrease in milk production, early drying, and other associated health problems have also

CONTACT Octávio Luiz Franco  ocfranco@gmail.com  Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília 70790-160, Brazil
© 2024 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Q1

Journal Pre-proof

Proteomic screening for the identification of proteins involved in resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton

Ivonaldo Reis Santos, Thuanny Borba Rios, Mariana Rocha Maximiano, Wirtton Macedo Coutinho, Liziane Maria De Lima, Luciano Paulino Silva, Osmundo Brilhante Oliveira-Neto, Angela Mehta

PII: S0885-5765(20)30230-7

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101562>

Reference: YPMPP 101562

To appear in: *Physiological and Molecular Plant Pathology*

Received Date: 12 April 2020

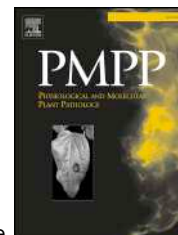
Revised Date: 30 July 2020

Accepted Date: 5 October 2020

Please cite this article as: Santos IR, Rios TB, Maximiano MR, Coutinho WM, De Lima LM, Silva LP, Oliveira-Neto OB, Mehta A, Proteomic screening for the identification of proteins involved in resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101562>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.



Review

Peptide Stapling Applied to Antimicrobial Peptides

Ana Laura Pereira Lourenço ¹, Thuanny Borba Rios ^{1,2}, Állan Pires da Silva ¹, Octávio Luiz Franco ^{1,2}
and Marcelo Henrique Soller Ramada ^{1,3,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília 71966-700, Brazil

² S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande 79117-900, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília 71966-700, Brazil

* Correspondence: marcelo.ramada@p.ucb.br

Abstract: Antimicrobial peptides (AMPs) are considered a promising therapeutic approach against multi-drug resistant microorganisms. Besides their advantages, there are limitations to be overcome so that these molecules can become market competitive. One of the biggest limitations is proteolytic susceptibility, which could be overcome by structural modifications such as cyclization, especially for helix-constraining strategies. Over the years, many helix stabilization techniques have arisen, such as lactam-bridging, triazole-based, N-alkylation and all-hydrocarbon stapling. All-hydrocarbon stapling takes advantage of modified amino acid residues and olefinic cross-linking to constrain peptide helices. Despite being a well-established strategy and presenting efficient stability results, there are different limitations especially related to toxicity. In this review, recent studies on stapled AMPs for antimicrobial usage are explored with the aim of understanding the future of these molecules as putative antimicrobial agents.

Keywords: antimicrobial peptides; stapling; all-hydrocarbon stapling; cyclization



Citation: Lourenço, A.L.P.; Rios, T.B.; da Silva, Á.P.; Franco, O.L.; Ramada, M.H.S. Peptide Stapling Applied to Antimicrobial Peptides. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1400. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091400>

Academic Editors: J. Michael Conlon, Marc Maresca and Bong-Jin Lee

Received: 10 August 2023

Revised: 30 August 2023

Accepted: 30 August 2023

Published: 2 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diseases and infections affecting humans, animals and plants are mostly managed by antimicrobial agents. Unfortunately, these antimicrobial agents, which are critical tools in our society, are becoming ineffective when facing resistant strains. The emergence of multi-drug resistant microorganisms has been a human and animal health threat since the discovery of resistant strains [1–3]. During the last three decades, antimicrobial peptides (AMPs) have demonstrated potential as antibiotic drugs able to face this global problem. Through wide-ranging research, natural and non-natural AMPs have been observed to kill bacteria through many mechanisms, including membranolytic and non-membranolytic modes of action, although the specific molecular targets for most peptides are still poorly described [4,5]. However, some physicochemical properties such as positive charge and amphiphilic properties have been widely associated with most peptides' antimicrobial activity [3].

Despite being interesting candidates, linear AMPs are usually unstable molecules that can rapidly undergo proteolytic degradation. Apart from their instability, they cause nonspecific membrane toxicity, presenting cytotoxic activity at low concentrations. These are by far the main limitations holding back the development of AMP-based antibiotic drugs [6–8]. Therefore, chemical modifications of AMPs are essentially oriented to improve their stability and antimicrobial activity and decrease cytotoxicity.

Several chemical modifications can be made to peptide structures to improve their properties, whether chemical, physical or biological. Nowadays, the main approaches proposed are insertion of D-amino acids, PEGylation, acetylation, dimerization, lipidation and



Priming of defense-related genes in *Brassica oleracea* var. *capitata* using concentrated metabolites produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899

Ivonaldo Reis Santos^{1,2} · Daiane Gonzaga Ribeiro^{1,3} · Fabiano Touzjdian Pinheiro Kohlrausch Távora^{1,4} · Mariana Rocha Maximiano^{1,3} · Ana Carolina Rabelo¹ · Thuanny Borba Rios¹ · Fábio Bueno Reis Junior⁵ · Manuel Megías⁶ · Luciano Paulino Silva^{1,2} · Angela Mehta¹

Received: 31 August 2021 / Accepted: 18 February 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

To verify the potential of metabolites extracted from *Rhizobium tropici* to trigger the priming of defense responses in cruciferous plants, we analyzed the expression of defense-related genes by qRT-PCR. *Brassica oleracea* var. *capitata*, susceptible to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, were grown in greenhouse conditions. At 18 days after sowing, plants were inoculated with 1 mL of 1% concentrated metabolites produced by *R. tropici* (CM-RT) in the root. In a second experiment, leaves were sprayed with 1 mL of a solution containing 1% CM-RT. Aerial and root tissue were collected separately at 0 (non-treated control condition), 24, and 48 h after application, submitted to RNA extraction and gene expression analysis by qRT-PCR. The results showed that, after root treatment with CM-RT, most evaluated genes were upregulated at 24 h after application and downregulated at 48 h after application in roots, while in leaves, genes were downregulated both at 24 and 48 h after application. On the other hand, leaf treatment with CM-RT showed that most evaluated genes in leaves and roots were upregulated at 24 and 48 h after application. These results indicate that the effect of CM-RT applied in roots seems restricted to the applied region and is not sustained, while the application in leaves results in a more systemic response and maintenance of the effect of CM-RT for a longer period. The results obtained in this study emphasize the biotechnological potential of using metabolites of *R. tropici* as an elicitor of active defense responses in plants.

Keywords Black rot · *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* · Defense response · Concentrated metabolites

Introduction

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc), responsible for the black rot disease, is an important bacterium that affects all cruciferous plants cultivated for food and spices and used as ornamental plants. The prevention of black rot disease has been of paramount importance for infection control, especially since it is transmitted through infected seeds [1]. This disease has been partially controlled by the use of

chemical applications, which are hazardous for human and animal health, as well as to the environment.

Currently, the search for disease control strategies focused on green technologies is becoming increasingly important in integrated pest management programs, especially when discussing integrated production towards sustainable agriculture. In this context, an important strategy for pest control is the use of metabolites from microorganisms as plant defense inducers. Extracts from different living organisms have been investigated as priming agents of plant resistance and have been able to control phytopathogens [2–6]. Primed plants exhibited faster and more robust activation of defense responses against subsequent challenges by insects, microbes, or abiotic stress [6, 7] and displayed a considerable upregulation in the expression of defense response-associated genes, such as those encoding peroxidase enzymes, chitinases, and beta-1,3-glucanase, known as pathogenesis-related proteins (PR proteins) [8, 9].

Responsible Editor: Luc F.M. Rouws

✉ Luciano Paulino Silva
luciano.paulino@embrapa.br

✉ Angela Mehta
angela.mehta@embrapa.br

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 22 March 2022

Springer

REFERÊNCIAS

ABASALIZADEH, F.; MOGHADDAM, S. V.; ALIZADEH, E.; AKBARI, E.; KASHANI, E.; FAZLJOU, S. M. B.; TORBATI, M.; AKBARZADEH, A. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. **Journal of Biological Engineering**, v. 14, n. 1, p. 8, 13 dez. 2020.

AELENEI, N.; POPA, M. I.; NOVAC, O.; LISA, G.; BALAITA, L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 5, p. 1095–1102, 22 mai. 2009.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, nov. 2004.

ALGHARIB, S. A.; DAWOOD, A.; XIE, S. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 292–308, 1 jan. 2020.

ALI, A. A.; AL BOSTAMI, R. D.; AL-OTHMAN, A. Nanogel-based composites for bacterial antibiofilm activity: advances, challenges, and prospects. **RSC Advances**, v. 14, n. 15, p. 10546–10559, 2024.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, fev. 2010.

AZEVEDO, M. A.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; CERQUEIRA, M. A. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 141–146, nov. 2014.

BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins - a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 60, n. 4, p. 711–720, 1 abr. 2003.

BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in

aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, n. 2, p. 270–277, dez. 2008.

BEZERRA, T. P. W.; BANDEIRA, A. R. G.; LIMA, S. H. P. de; ANDRADE, P. L. de. A nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e99111436115, 20 out. 2022.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.

BOMBIN, A. D. J.; DUNNE, N.; MCCARTHY, H. O. Delivery of a peptide/microRNA blend via electrospun antimicrobial nanofibres for wound repair. **Acta Biomaterialia**, v. 155, p. 304–322, jan. 2023.

BUCATARU, C.; CIOBANASU, C. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. **Microbiological Research**, v. 286, p. 127822, set. 2024.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 15 mar. 2018.

CALVO, P.; REMUÑO N-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125–132, 3 jan. 1997.

CASADIDIO, C.; PEREGRINA, D. V.; GIGLIOBIANCO, M. R.; DENG, S.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 369, 21 jun. 2019.

CASTAÑEDA-REYES, E. D.; PEREA-FLORES, M. de J.; DAVILA-ORTIZ, G.; LEE, Y.; GONZALEZ DE MEJIA, E. <p>Development, Characterization and Use of Liposomes as Amphipathic Transporters of Bioactive Compounds for Melanoma Treatment and Reduction of Skin Inflammation: A Review</p>. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 7627–7650, out. 2020.

CHAKRABORTY, S. P.; SAHU, S. K.; MAHAPATRA, S. K.; SANTRA, S.; BAL, M.; ROY, S.; PRAMANIK, P. Nanoconjugated vancomycin: new opportunities for the

development of anti-VRSA agents. **Nanotechnology**, v. 21, n. 10, p. 105103, 12 mar. 2010.

CHEREDDY, K. K.; HER, C.-H.; COMUNE, M.; MOIA, C.; LOPES, A.; PORPORATO, P. E.; VANACKER, J.; LAM, M. C.; STEINSTRASSER, 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.

CHO, N.-J.; FRANK, C. W.; KASEMO, B.; HÖÖK, F. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. **Nature Protocols**, v. 5, n. 6, p. 1096–1106, 20 jun. 2010.

COLLINS, T. J. ImageJ for Microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. sup1, 16 jul. 2007.

COSTA, F.; TEIXEIRA, C.; GOMES, P.; MARTINS, M. C. L. Clinical Application of AMPs. *Em: Antimicrobial Peptides. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer, 2019. p. 281–298.

COTE, C. K.; BLANCO, I. I.; HUNTER, M.; SHOE, J. L.; KLIMKO, C. P.; PANCHAL, R. G.; WELKOS, S. L. Combinations of early generation antibiotics and antimicrobial peptides are effective against a broad spectrum of bacterial biothreat agents. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104050, mai. 2020.

CRUZ, J.; FLÓREZ, J.; TORRES, R.; URQUIZA, M.; GUTIÉRREZ, J. A.; GUZMÁN, F.; ORTIZ, C. C. Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Nanotechnology**, v. 28, n. 13, p. 135102, 1 mar. 2017.

DIJKSTEEL, G. S.; ULRICH, M. M. W.; MIDDELKOOP, E.; BOEKEMA, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 22 fev. 2021.

DIN, F. ud; AMAN, W.; ULLAH, I.; QURESHI, O. S.; MUSTAPHA, O.; SHAFIQUE, S.; ZEB, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of

selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 7291–7309, out. 2017.

ESPOSITO, S.; NOVIELLO, S.; LEONE, S. Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 109–115, abr. 2016.

FALCAO, C. B.; DE LA TORRE, B. G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A. E.; ANDREU, D.; RÁDIS-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, 7 nov. 2014.

FALCAO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; DE LA TORRE, B. G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M. Á.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ANDREU, D. Structural Dissection of Crotalidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 8553–8563, 12 nov. 2015.

FATHI, H. A.; ABDELKADER, A.; ABDELKARIM, M. S.; ABDELAZIZ, A. A.; EL-MOKHTAR, M. A.; ALLAM, A.; FETIH, G.; EL BADRY, M.; ELSABAHY, M. Electrospun vancomycin-loaded nanofibers for management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced skin infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 586, p. 119620, ago. 2020.

FIELD, D.; O' CONNOR, R.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against *Staphylococcus* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 18 abr. 2016.

FORERO-DORIA, O.; PARRA-CID, C.; VENTURINI, W.; ESPINOZA, C.; ARAYA-MATURANA, R.; VALENZUELA-RIFFO, F.; SALDIAS, C.; LEIVA, A.; DUARTE, Y.; ECHEVERRÍA, J.; GUZMÁN, L. Novel N-benzoylimidazolium ionic liquids derived from benzoic and hydroxybenzoic acids as therapeutic alternative against Biofilm-forming bacteria in skin and soft-tissue infections. **Bioorganic Chemistry**, v. 126, p. 105914, set. 2022.

FOURNIÈRE, M.; LATIRE, T.; SOUAK, D.; FEUILLOLEY, M. G. J.; BEDOUX, G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin

Microbiota and the Influence of Cosmetics. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1752, 7 nov. 2020.

FRY, D. E. Antimicrobial Peptides. **Surgical Infections**, v. 19, n. 8, p. 804–811, dez. 2018.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 65–73, ago. 2005.

GAO, W.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 46–57, mar. 2018.

GASCON, S.; GIRALDO SOLANO, A.; EL KHEIR, W.; THERRIAULT, H.; BERTHELIN, P.; CATTIER, B.; MARCOS, B.; VIRGILIO, N.; PAQUETTE, B.; FAUCHEUX, N.; LAUZON, M.-A. Characterization and Mathematical Modeling of Alginate/Chitosan-Based Nanoparticles Releasing the Chemokine CXCL12 to Attract Glioblastoma Cells. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 356, 14 abr. 2020.

GENNARO, R.; SKERLAVAJ, B.; ROMEO, D. Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 3142–3146, out. 1989.

GIACOMETTI, A. In vitro effect on *Cryptosporidium parvum* of short-term exposure to cathelicidin peptides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 843–847, 1 abr. 2003.

GÜLTEKIN, H. E.; YAŞAYAN, G.; BAL-ÖZTÜRK, A.; BIGHAM, A.; SIMCHI, A. (Arash); ZAREPOUR, A.; IRAVANI, S.; ZARRABI, A. Advancements and applications of upconversion nanoparticles in wound dressings. **Materials Horizons**, v. 11, n. 2, p. 363–387, 2024.

GURUNATHAN, S. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 29, p. 217–226, set. 2015.

GUZMÁN, E.; ORTEGA, F.; PROLONGO, M. G.; STAROV, V. M.; RUBIO, R. G. Influence of the molecular architecture on the adsorption onto solid surfaces: comb-like polymers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 36, p. 16416, 2011.

HARIPRIYAA, M.; SUTHINDHIRAN, K. Pharmacokinetics of nanoparticles: current knowledge, future directions and its implications in drug delivery. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 113, 11 dez. 2023.

HIRATA, M.; SHIMOMURA, Y.; YOSHIDA, M.; MORGAN, J. G.; PALINGS, I.; WILSON, D.; YEN, M. H.; WRIGHT, S. C.; LARRICK, J. W. Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1421–1426, abr. 1994.

HOANG, T. P. N.; GHORI, M. U.; CONWAY, B. R. Topical Antiseptic Formulations for Skin and Soft Tissue Infections. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 558, 15 abr. 2021.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, dez. 2012.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 16 out. 2020.

HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 7–16, 3 mai. 1980.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

JALLOUK, A. P.; PALEKAR, R. U.; PAN, H.; SCHLESINGER, P. H.; WICKLINE, S. A. Modifications of Natural Peptides for Nanoparticle and Drug Design. *Em*: [s.l: s.n.]p. 57–91.

JHAVERI, A. M.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 25 abr. 2014.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 78, p. 53–68, set. 1987.

KARAS, Michael.; HILLENKAMP, Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299–2301, 15 out. 1988.

KARNAM, S.; JINDAL, A. B.; AGNIHOTRI, C.; SINGH, B. P.; PAUL, A. T. Topical Nanotherapeutics for Treating MRSA-Associated Skin and Soft Tissue Infection (SSTIs). **AAPS PharmSciTech**, v. 24, n. 5, p. 108, 26 abr. 2023.

KASZUBA, M.; CORBETT, J.; WATSON, F. M.; JONES, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1927, p. 4439–4451, 28 set. 2010.

KAZEMZADEH-NARBAT, M.; KINDRACHUK, J.; DUAN, K.; JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W.; WANG, R. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. **Biomaterials**, v. 31, n. 36, p. 9519–9526, dez. 2010.

KEBRIAEI, R.; RICE, S. A.; SINGH, N. B.; STAMPER, K. C.; NGUYEN, L.; SHEIKH, Z.; RYBAK, M. J. Combinations of (lipo)glycopeptides with β -lactams against MRSA: susceptibility insights. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 10, p. 2894–2901, 1 out. 2020.

KECEL-GUNDUZ, S.; BUDAMA-KILINC, Y.; CAKIR-KOC, R.; ZORLU, T.; BICAK, B.; KOKCU, Y.; E. OZEL, A.; AKYUZ, S. In Silico design of AVP (4–5) peptide and synthesis, characterization and in vitro activity of chitosan nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 139–157, 16 jun. 2020.

KLEINE-BRUEGGENEY, H.; ZORZI, G. K.; FECKER, T.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; GOYCOOLEA, F. M. A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 99–108, nov. 2015.

KLOSTER, G. A.; MOSCOSO LONDOÑO, O.; PIROTA, K. R.; MOSIEWICKI, M. A.; MARCOVICH, N. E. Design of super-paramagnetic bilayer films based on chitosan and sodium alginate. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100083, dez. 2021.

KOPECKI, Z. Development of next-generation antimicrobial hydrogel dressing to combat burn wound infection. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, 26 fev. 2021.

LAKSHMAIAH NARAYANA, J.; CHEN, J.-Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88–94, out. 2015.

LANDRISCINA, A.; ROSEN, J.; FRIEDMAN, A. J. Biodegradable chitosan nanoparticles in drug delivery for infectious disease. **Nanomedicine**, v. 10, n. 10, p. 1609–1619, mai. 2015.

LECAROZ, C. Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 549–556, 1 jul. 2006.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, mar. 2015.

LEE, M. S.; ALEXANDER-KATZ, A.; MACFARLANE, R. J. Nanoparticle Assembly in High Polymer Concentration Solutions Increases Superlattice Stability. **Small**, v. 17, n. 36, 28 set. 2021.

LI, B.; ELANGO, J.; WU, W. Recent Advancement of Molecular Structure and Biomaterial Function of Chitosan from Marine Organisms for Pharmaceutical and Nutraceutical Application. **Applied Sciences**, v. 10, n. 14, p. 4719, 8 jul. 2020.

LI, L.; WANG, L.; GAO, Y.; WANG, J.; ZHAO, X. Effective Antimicrobial Activity of Plectasin-Derived Antimicrobial Peptides against *Staphylococcus aureus* Infection in Mammary Glands. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 4 dez. 2017.

LI, M.; LU, W.; SUN, Y.; DONG, C. Antimicrobial Peptides: Sources, Expression Systems, and Applications. **Current Protein & Peptide Science**, v. 24, n. 8, p. 640–654, out. 2023.

LINZ, M. S.; MATTAPPALLIL, A.; FINKEL, D.; PARKER, D. Clinical Impact of Staphylococcus aureus Skin and Soft Tissue Infections. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 557, 11 mar. 2023.

LIU, H.; ZHAN, J.; LIN, R.; YIN, Y.; REN, L. Strong infiltrative HHC36 antimicrobial peptide/silver nanoparticles-loaded carboxymethyl chitosan/sodium alginate hydrogel for acne vulgaris therapy. **Nanotechnology**, v. 34, n. 49, p. 495101, 3 dez. 2023.

LIU, J.; XIAO, J.; LI, F.; SHI, Y.; LI, D.; HUANG, Q. Chitosan-sodium alginate nanoparticle as a delivery system for ϵ -polylysine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. **Food Control**, v. 91, p. 302–310, set. 2018.

LÓPEZ-LEÓN, T.; CARVALHO, E. L. S.; SEIJO, B.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, n. 2, p. 344–351, mar. 2005.

LUO, Y.; TENG, Z.; LI, Y.; WANG, Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 221–229, mai. 2015.

MALLICK, S.; NAG, M.; LAHIRI, D.; PANDIT, S.; SARKAR, T.; PATI, S.; NIRMAL, N. P.; EDINUR, H. A.; KARI, Z. A.; AHMAD MOHD ZAIN, M. R.; RAY, R. R. Engineered Nanotechnology: An Effective Therapeutic Platform for the Chronic Cutaneous Wound. **Nanomaterials**, v. 12, n. 5, p. 778, 25 fev. 2022.

MATOS, B. N.; PEREIRA, M. N.; BRAVO, M. de O.; CUNHA-FILHO, M.; SALDANHA-ARAÚJO, F.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles loading oxaliplatin as a mucoadhesive topical treatment of oral tumors: Iontophoresis further enhances drug delivery ex vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 1265–1275, jul. 2020.

MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, abr. 2015.

MATUS, C. E.; EHRENFELD, P.; FIGUEROA, C. D. The family of kallikrein-related peptidases and kinin peptides as modulators of epidermal homeostasis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 323, n. 4, p. C1070–C1087, 1 out. 2022.

MAXIMIANO, M. R.; RIOS, T. B.; CAMPOS, M. L.; PRADO, G. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Nanoparticles in association with antimicrobial peptides (NanoAMPs) as a promising combination for agriculture development. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 23 ago. 2022.

MAYA, S.; INDULEKHA, S.; SUKHITHASRI, V.; SMITHA, K. T.; NAIR, S. v.; JAYAKUMAR, R.; BISWAS, R. Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 392–399, nov. 2012.

MCMILLAN, K. A. M.; COOMBS, M. R. P. Review: Examining the Natural Role of Amphibian Antimicrobial Peptide Magainin. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5436, 20 nov. 2020.

MCSWEENEY, M. D.; WESSLER, T.; PRICE, L. S. L.; CIOCIOLA, E. C.; HERITY, L. B.; PISCITELLI, J. A.; ZAMBONI, W. C.; FOREST, M. G.; CAO, Y.; LAI, S. K. A minimal physiologically based pharmacokinetic model that predicts anti-PEG IgG-mediated clearance of PEGylated drugs in human and mouse. **Journal of Controlled Release**, v. 284, p. 171–178, ago. 2018.

MEDIDHI, K. R.; PADMANABHAN, V. Viscosity of polyelectrolyte-grafted nanoparticle solutions. **Soft Matter**, v. 17, n. 12, p. 3455–3462, 2021.

MESQUITA, P. C.; DOS SANTOS-SILVA, E.; STRECK, L.; DAMASCENO, I. Z.; MAIA, A. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Cationic functionalized biocompatible polylactide nanoparticles for slow release of proteins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 513, p. 442–451, jan. 2017.

MILLAR, E. V.; SCHLETT, C. D.; LAW, N. N.; WHITMAN, T. J.; ELLIS, M. W.; TRIBBLE, D. R.; BENNETT, J. W. Opportunities and Obstacles in the Prevention of Skin and Soft-Tissue Infections Among Military Personnel. **Military Medicine**, v. 184, n. Supplement_2, p. 35–43, 1 nov. 2019.

MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, N.; ESKANDARI, R.; AVADI, M.; ZOLFAGHARIAN, H.; MIR MOHAMMAD SADEGHI, A.; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 44–52, 2012.

MORETTA, A.; SCIEUZO, C.; SALVIA, R.; POPOVIĆ, Ž. D.; SGAMBATO, A.; FALABELLA, P. Tools in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: Applications for New Antimicrobial Peptides Discovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 28, n. 35, p. 2856–2866, out. 2022.

MUBEEN, B.; ANSAR, A. N.; RASOOL, R.; ULLAH, I.; IMAM, S. S.; ALSHEHRI, S.; GHONEIM, M. M.; ALZAREA, S. I.; NADEEM, M. S.; KAZMI, I. Nanotechnology as a Novel Approach in Combating Microbes Providing an Alternative to Antibiotics. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1473, 30 nov. 2021.

MUSTAFA, F. E.-Z. A.; ABDEL-MAKSoud, F. M.; HASSAN, A. H. S.; MOKHTAR, D. M. Melatonin induces a stimulatory action on the scrotal skin components of Soay ram in the non-breeding season. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10154, 23 jun. 2020.

NAIK, G. alias R. R.; ROY, A. A.; MUTALIK, S.; DHAS, N. Unleashing the power of polymeric nanoparticles — Creative triumph against antibiotic resistance: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 278, p. 134977, out. 2024.

NAQVI, S.; PANGHAL, A.; FLORA, S. J. S. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 9 jun. 2020.

NAZLI, A.; TAO, W.; YOU, H.; HE, X.; HE, Y. Treatment of MRSA Infection: Where are We? **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 28, p. 4425–4460, ago. 2024.

OLIVEIRA LIMA, K.; BARRETO PINILLA, C. M.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Characterization, Bioactivity and Application of Chitosan-Based Nanoparticles in a Food Emulsion Model. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3331, 29 set. 2021.

OLIVEIRA, N. G. J.; CARDOSO, M. H.; VELIKOVA, N.; GIESBERS, M.; WELLS, J. M.; REZENDE, T. M. B.; DE VRIES, R.; FRANCO, O. L. Physicochemical-guided

design of cathelicidin-derived peptides generates membrane active variants with therapeutic potential. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9127, 4 jun. 2020.

OSORIO-ALVARADO, C. E.; ROPERO-VEGA, J. L.; FARFÁN-GARCÍA, A. E.; FLÓREZ-CASTILLO, J. M. Immobilization Systems of Antimicrobial Peptide Ib-M1 in Polymeric Nanoparticles Based on Alginate and Chitosan. **Polymers**, v. 14, n. 15, p. 3149, 2 ago. 2022.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 139–147, dez. 2002.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F.; CAMPOS, E. V. R.; RODRIGUEZ-TORRES, M. del P.; ACOSTA-TORRES, L. S.; DIAZ-TORRES, L. A.; GRILLO, R.; SWAMY, M. K.; SHARMA, S.; HABTEMARIAM, S.; SHIN, H.-S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, 19 dez. 2018.

PETER BERGMAN; LILIAN WALTER-JALLOW; KRISTINA BROLIDEN; BIRGITTA AGERBERTH; JOHAN SODERLUND. The Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits HIV-1 Replication. **Current HIV Research**, v. 5, n. 4, p. 410–415, 1 jul. 2007.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 28 mar. 2018.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, , António J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, mar. 2006.

PIRAS, A. M.; MAISETTA, G.; SANDRESCHI, S.; GAZZARRI, M.; BARTOLI, C.; GRASSI, L.; ESIN, S.; CHIELLINI, F.; BATONI, G. Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity in vitro against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 06, 28 abr. 2015.

POULAKOU, G.; LAGOU, S.; TSIODRAS, S. What's new in the epidemiology of skin and soft tissue infections in 2018? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 77–86, abr. 2019.

PRAMANIK, A.; GARG, S. Design of diffusion-controlled drug delivery devices for controlled release of Paclitaxel. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 94, n. 2, p. 1478–1487, 29 ago. 2019.

QIN, P.; TANG, J.; SUN, D.; YANG, Y.; LIU, N.; LI, Y.; FU, Z.; WANG, Y.; LI, C.; LI, X.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; SUN, J.; DENG, Z.; HE, L.; WANG, Y.; YANG, X. Zn ²⁺ Cross-Linked Alginate Carrying Hollow Silica Nanoparticles Loaded with RL-QN15 Peptides Provides Promising Treatment for Chronic Skin Wounds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, n. 26, p. 29491–29505, 6 jul. 2022.

RĂILEANU, M.; BORLAN, R.; CAMPU, A.; JANOSI, L.; TURCU, I.; FOCSAN, M.; BACALUM, M. No country for old antibiotics! Antimicrobial peptides (AMPs) as next-generation treatment for skin and soft tissue infection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 642, p. 123169, jul. 2023.

RAMÔA, A. M.; CAMPOS, F.; MOREIRA, L.; TEIXEIRA, C.; LEIRO, V.; GOMES, P.; DAS NEVES, J.; MARTINS, M. C. L.; MONTEIRO, C. Antimicrobial peptide-grafted PLGA-PEG nanoparticles to fight bacterial wound infections. **Biomaterials Science**, v. 11, n. 2, p. 499–508, 2023.

RANA, R.; RANI, S.; KUMAR, V.; NAKHATE, K. T.; AJAZUDDIN; GUPTA, U. Sialic Acid Conjugated Chitosan Nanoparticles: Modulation to Target Tumour Cells and Therapeutic Opportunities. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 1, p. 10, 3 jan. 2022.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RISTORI, S.; GRILLO, I.; LUSA, S.; THAMM, J.; VALENTINO, G.; CAMPANI, V.; CARAGLIA, M.; STEINIGER, F.; LUCIANI, P.; DE ROSA, G. Structural Characterization

of Self-Assembling Hybrid Nanoparticles for Bisphosphonate Delivery in Tumors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1258–1265, 5 mar. 2018.

ROCHA SOARES, K. S.; CARDOZO FONSECA, J. L.; OLIVEIRA BITENCOURT, M. A.; SANTOS, K. S. C. R.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Serum production against Tityus serrulatus scorpion venom using cross-linked chitosan nanoparticles as immunoadjuvant. **Toxicon**, v. 60, n. 8, p. 1349–1354, dez. 2012.

SÆTHER, H. V.; HOLME, H. K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRØD, O.; STOKKE, B. T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 813–821, nov. 2008.

SALOUTI, M.; AHANGARI, A. Nanoparticle based Drug Delivery Systems for Treatment of Infectious Diseases. *Em: Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. [s.l.] InTech, 2014.

SALVATI, B.; FLÓREZ-CASTILLO, J. M.; SANTAGAPITA, P. R.; BARJA, B. C.; PERULLINI, M. One-pot synthesis of alginate-antimicrobial peptide nanogel. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 665–679, 6 abr. 2024.

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.

SASHIWA, H.; AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 9, p. 887–908, set. 2004.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B. P.; GULHANE, R. D.; GILL, J. P. S.; RAY, P.; PUNIYA, A. K.; PANWAR, H. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, 8 jan. 2018.

SHI, S.; JIA, J.; GUO, X.; ZHAO, Y.; CHEN, D.; GUO, Y.; ZHANG, X. Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 6499–6506, dez. 2016.

SOUTO, E. B.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, M. I.; TEIXEIRA, M. C.; SHIMOJO, A. A. M.; SORIANO, J. L.; NAVEROS, B. C.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, S. B.; SANTINI, A. New Nanotechnologies for the Treatment and Repair of Skin Burns Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 393, 8 jan. 2020.

SOUZA, M. P. C. de; SÁBIO, R. M.; RIBEIRO, T. de C.; SANTOS, A. M. dos; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M. Highlighting the impact of chitosan on the development of gastroretentive drug delivery systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 804–822, set. 2020.

STEWART, P. L. Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 2, 23 mar. 2017.

SUN, R.; ZHU, J.; WU, H.; WANG, S.; LI, W.; SUN, Q. Modulating layer-by-layer assembled sodium alginate-chitosan film properties through incorporation of cellulose nanocrystals with different surface charge densities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 510–522, jun. 2021.

SUN, Y.; LIU, Y.; LIU, W.; LU, C.; WANG, L. Chitosan microparticles ionically cross-linked with poly(γ -glutamic acid) as antimicrobial peptides and nitric oxide delivery systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 78–85, mar. 2015.

TAN, Q.; CHEN, Z.; LIU, L.; HUANG, X. Functionalized Rhodium Nanoparticles as Antimicrobial Agents for Treatment of Drug-Resistant Skin and Soft Tissue Infections. **Advanced Healthcare Materials**, v. 12, n. 19, 5 jul. 2023.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, ago. 1988.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. E128–E147, jun. 2007.

TORRES, M. D. T.; SOTHISELVAM, S.; LU, T. K.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3547–3567, ago. 2019.

TSAI, M.-L.; CHEN, R.-H.; BAI, S.-W.; CHEN, W.-Y. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756–761, 1 mar. 2011.

VARGAS-MOLINERO, H. Y.; SERRANO-MEDINA, A.; PALOMINO-VIZCAINO, K.; LÓPEZ-MALDONADO, E. A.; VILLARREAL-GÓMEZ, L. J.; PÉREZ-GONZÁLEZ, G. L.; CORNEJO-BRAVO, J. M. Hybrid Systems of Nanofibers and Polymeric Nanoparticles for Biological Application and Delivery Systems. **Micromachines**, v. 14, n. 1, p. 208, 14 jan. 2023.

VON SPECHT, M. H.; GARDELLA, N.; UBEDA, C.; GRENON, S.; GUTKIND, G.; MOLLERACH, M. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in a pediatric hospital in Argentina. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 09, p. 1119–1128, 12 set. 2014.

WANG, J.; DOU, X.; SONG, J.; LYU, Y.; ZHU, X.; XU, L.; LI, W.; SHAN, A. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 831–859, 24 mai. 2019.

WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, p. 765, abr. 2011.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 1227–1249, fev. 2017.

WANG, S.; ZENG, X.; YANG, Q.; QIAO, S. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 3 mai. 2016.

WANG, Y.; SONG, X.; ZHUANG, L.; LANG, H.; YU, L.; YAN, X.; HE, Z. Kinetic control of Phytic acid/Lixisenatide/Fe (III) ternary nanoparticles assembly process for sustained peptide release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 611, p. 121317, jan. 2022.

WATER, J. J.; SMART, S.; FRANZYK, H.; FOGED, C.; NIELSEN, H. M. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against

Staphylococcus aureus in infected epithelial cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 92, p. 65–73, mai. 2015.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WIESENTHAL, A.; HUNTER, L.; WANG, S.; WICKLIFFE, J.; WILKERSON, M. Nanoparticles: small and mighty. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 3, p. 247–254, mar. 2011.

XIAO, J.; NIAN, S.; HUANG, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 166–175, out. 2015.

XUAN, J.; FENG, W.; WANG, J.; WANG, R.; ZHANG, B.; BO, L.; CHEN, Z.-S.; YANG, H.; SUN, L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, p. 100954, mai. 2023.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 173–187, jan. 2011.

YAH, C. S.; SIMATE, G. S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 43, 2 dez. 2015.

YAN, D.; LI, Y.; LIU, Y.; LI, N.; ZHANG, X.; YAN, C. Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7136, 25 nov. 2021.

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.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 1 mar. 2003.

ZANETTI, M. The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. **Current Issues in Molecular Biology**, 2005.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, jun. 2015.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, ago. 1987.

ZHANG, Z.-H.; WANG, X.-P.; AYMAN, W. Y.; MUNYENDO, W. L. L.; LV, H.-X.; ZHOU, J.-P. Studies on lactoferrin nanoparticles of gambogic acid for oral delivery. **Drug Delivery**, v. 20, n. 2, p. 86–93, 16 fev. 2013.

ZHU, Z.; ZHENG, T.; HOMER, R. J.; KIM, Y.-K.; CHEN, N. Y.; COHN, L.; HAMID, Q.; ELIAS, J. A. Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. **Science**, v. 304, n. 5677, p. 1678–1682, 11 jun. 2004.

ZIMPOCH, J.; ZIELINSKA, D.; MICHALAK-MICKA, K.; RÜTSCHKE, D.; BÖNI, R.; BIEDERMANN, T.; KLAR, A. S. Bio-engineering a prevascularized human tri-layered skin substitute containing a hypodermis. **Acta Biomaterialia**, v. 134, p. 215–227, out. 2021.