

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS –
METÁLICO-ORGÂNICAS - PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

DANIEL BARROS ORTEGA

ORIENTADOR: MARCELO PORTO BEMQUERER

CO ORIENTADORA: MAGALI APARECIDA RODRIGUES

Brasília

2014

DANIEL BARROS ORTEGA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS –
METÁLICO-ORGÂNICAS - PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular do Departamento de
Biologia Celular da Universidade de
Brasília como requisito para obtenção
do título de mestre em Biologia
Molecular

Orientador: Marcelo Porto
Bemquerer

Brasília

2014

"Hope in reality is the worst of all evils because it prolongs the torments of man."

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTO

Ao Marcelo e a Magali por terem se empenhado em me acompanhar durante esta jornada tortuosa.

Ao Luciano por ter me apresentado à nanotecnologia e pela preocupação em relação ao meu bem estar.

Ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massas pelas bases do projeto e por me ajudarem nas reflexões sobre o ser humano.

Aos participantes da banca pelas dicas e pelos conselhos.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica pela disposição e presteza.

A Bia e ao pessoal da Universidade Católica de Brasília por ter cedido o espaço para a condução dos experimentos.

Ao departamento de Biologia Celular da UnB pela compreensão e pelo serviço bem prestado.

Aos amigos que foram importantes durante todo o percurso trilhado até este momento.

Principalmente à minha mãe, minha irmã e ao meu sobrinho, que a cada dia me dão forças para seguir em frente pelo simples fato de existirem em minha vida.

Obrigado a todos que, mesmo sem saberem, colaboraram não só para o andamento deste projeto, mas também para uma compreensão um pouco maior sobre a Vida.

RESUMO

Nanopartículas de alumina apresentam toxicidade atenuada quando em contato com micro-organismos, sendo um material inorgânico valioso para a modificação com moléculas antimicrobianas. Peptídeos antimicrobianos podem ser ferramentas biotecnológicas de grande importância tanto nas ciências de alimentos como na agricultura. Nanoestruturas metálicas como a alumina são insolúveis em meios aquosos, portanto os ensaios tradicionais de atividade antimicrobiana não distinguem a absorvência oriunda da proliferação de micro-organismos do espalhamento de luz causado pelas nanopartículas. Neste trabalho, o peptídeo antimicrobiano HSP2 foi sintetizado pelo método de fase sólida, purificado por cromatografia de fase reversa e caracterizado por espectrometria de massa. As nanopartículas de alumina foram sintetizadas, derivatizadas e ligadas ao peptídeo sintético HSP2 (H-GILEAIKAIKAAG-NH₂). Em seguida, as nanoestruturas obtidas foram caracterizadas por difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho, adsorção e dessorção de nitrogênio, microscopia eletrônica de transmissão e submetidas a ensaios de viabilidade celular e de avaliação do potencial antimicrobiano. Os resultados obtidos pela caracterização físico-química não foram suficientes para determinar o grau de modificação das nanopartículas, contudo os ensaios de atividade antimicrobiana e de viabilidade celular foram eficientes em identificar as culturas de células que tiveram seu crescimento inibido pela presença de nanopartículas conjugadas ao peptídeo antimicrobiano.

Palavras-chave: nanoestruturas de alumina, ensaio de atividade antimicrobiana, peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

Alumina nanoparticles show low toxicity when in contact with microorganisms, which makes them a valuable material to be derivatized with antimicrobial molecules. Antimicrobial peptides are important biotechnological tools used either in medical sciences or in agriculture and food sciences or . Metallic nanostructures such as alumina are insoluble in liquid medium, therefore the traditional assay used for evaluation of the antimicrobial potential does not distinguish the absorbance of the microorganisms proliferation from the light scattering caused by the nanoparticles. In this work, the antimicrobial peptide HSP2 (H-GILEAIKAIKAAG-NH₂) was synthesized, purified, and characterized. Alumina nanoparticles were synthesized, superficially changed with an amino group and bound to the synthetic peptide HSP2. After completing the synthesis, the obtained nanostructures were characterized by X-ray diffraction, infra-red spectroscopy, nitrogen adsorption and desorption, transmission electron microscopy and submitted to the cellular viability assay and antimicrobial potential evaluation. The results based on the characterization were not enough to determine the modification degree of the nanostructures, nevertheless the antimicrobial activity assay and the cellular viability assay were efficient to identify the cell cultures that had their growth inhibited by the conjugated nanoparticle-peptide presence.

Keywords: alumina nanostructure, antimicrobial activity assay, antimicrobial peptide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. As nanopartículas	9
1.2. O potencial antimicrobiano das nanopartículas metálicas	11
1.3. Toxicidade de Nanopartículas de Alumina	13
1.4. A prevenção de doenças infecciosas pelo controle de micro-organismos	13
1.5. Os peptídeos antimicrobianos	14
1.6. Nanoestruturas híbridas orgânico-metálicas	16
1.7. O peptídeo sintético HSP2	19
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Material	22
4.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH ₂ .	22
4.2.1. Síntese de peptídeo em Fase Sólida	22
4.2.2. Purificação por Cromatografia Líquida de Fase Reversa	25
4.2.3. Caracterização por Espectrometria de Massa.....	25
4.2.4. Quantificação do peptídeo HSP2 amidado	26
4.2.5. Ensaio de atividade antimicrobiana do peptídeo sintético HSP2	26
4.3. Preparação da nanopartícula de alumina, derivatizações químicas e ligação do peptídeo H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH ₂ .	27
4.4. Caracterização das nanopartículas de alumina, de alumina aminada e das nanoestruturas híbridas.	32
4.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão	32

4.4.2. Adsorção e Dessorção de Nitrogênio.....	32
4.4.3. Difração de Raio X de Pó.....	33
4.4.4. Espectroscopia de Infravermelho	33
4.4.5 Avaliação do Ensaio Colorimétrico como Teste de Viabilidade Celular.	33
4.4.6. Teste de Atividade Antimicrobiana e de Viabilidade Celular na Presença de Nanopartículas	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Caracterização da alumina (Al ₂ O ₃)	38
5.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH ₂ .	40
5.3. Quantificação do peptídeo HSP2 amidado	44
5.4. Preparação da nanopartícula de alumina, derivatizações químicas e ligação do peptídeo H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH ₂ .	44
5.4.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão	44
5.4.2. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho.....	48
5.5. Ensaio de atividade antimicrobiana do peptídeo HSP2 amidado, da nanopartícula de alumina e da nanopartícula de alumina aminada.	51
5.6. Avaliação do potencial do ensaio colorimétrico como teste de viabilidade celular na presença de nanopartículas	54
5.7. Ensaio de atividade antimicrobiana e ensaio de viabilidade celular na presença de nanopartículas de alumina (Al ₂ O ₃), nanopartículas de alumina aminada (Al ₂ O ₃ NH ₂) e nanopartículas de alumina modificadas com o HSP2	55
6. CONCLUSÕES	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. As nanopartículas

O termo “nanopartícula” designa todo material produzido intencionalmente com ao menos uma de suas dimensões medindo até 100 nm. A obtenção de materiais em escala nanoestruturada pode fornecer propriedades aos materiais que anteriormente não eram encontradas quando eles eram obtidos em escala microscópica ou molecular, devido à mudança nas suas propriedades físicas e químicas. Essas mudanças vêm sendo empregadas para a obtenção de materiais tanto para a área da saúde quanto para aplicações em eletrônica (WILSON, 2002).

As mudanças físicas e químicas ocorridas no material são devidas principalmente à modulação do transporte de carga. As cargas em um material percorrem uma distância L que depende da velocidade v e do tempo, t , sendo definida como, $L=v.t$, até encontrar um defeito ou impurezas no cristal que funciona como resistor. Quando ocorre a redução do tamanho do material ocorre simultaneamente um aumento na sua pureza e uma diminuição nos seus defeitos. Por outro lado, quando materiais condutores de elétrons em escala macroscópica são obtidos, os elétrons transitam livremente de forma desorganizada no material e quando o tamanho do material é reduzido à escala nanométrica em todas as dimensões ocorre o confinamento quântico, restringindo os elétrons a esse espaço. A modulação da condutividade na nanotecnologia é bastante interessante para indústrias de materiais eletrônicos, fotônicos e antimicrobianos (POOLE ; OWENS, 2003).

Pode-se verificar uma vasta aplicação para nanopartículas metálicas, um exemplo a ser citado é a obtenção de polímeros e cerâmicas dopados com nanopartículas metálicas (SCHMITT *et al.*, 1997). A dopagem é um processo eletrônico no qual adicionam-se “impurezas” em metais semicondutores para que estes apresentem condutividade específica.

Há nanopartículas utilizadas no tratamento de esgoto e na remoção de contaminantes da água potável. Entre as nanopartículas utilizadas destacam-se as de titânia, sílica, alumina e a prata. Neste processo, observou-se uma redução das incrustações sobre as membranas utilizadas, levando ao aumento da qualidade da permeabilidade de membranas e do fluxo de água, o que melhora o desempenho do processo. (KIM ; VAN DER BRUGGEN, 2010).

Outra vertente de utilização das nanopartículas é em eletroanálises. A grande vantagem das nanopartículas, neste caso, provém da sua capacidade de diferenciar com maior nitidez sinais eletrônicos de ruídos de fundo (CAMPBELL; COMPTON, 2010). Nanopartículas de prata, ouro, platina, paládio, rutênio, cobre e níquel são estudadas para identificar sob quais condições cada elemento tende a ser mais estável, o que é fundamental para que sejam utilizados como ferramentas na eletroanálise. Outra vantagem importante das nanopartículas metálicas é a facilidade de métodos de modificação de sua superfície, permitindo a ligação covalente de moléculas orgânicas e biomoléculas e produzindo assim materiais híbridos orgânico-inorgânicos. Reações quimiosseletivas e que podem ser conduzidas em condições brandas dependem da escolha adequada de eletrófilos e nucleófilos e alguns exemplos amplamente utilizados podem ser citados como a reação entre um tiol e um maleimida para a formação de um tioéter, a reação entre uma amina e um epóxido para a formação de uma hidoxilamina, a formação de amida entre um derivado ativado de ácido carboxílico e uma amina e a moderna reação de cicloadição de Click, por meio de condensação entre uma azida e um alcino, mediada por Cu(I) (SAPSFORD *et al.*, 2013). Conjugadas a biomoléculas, nanopartículas biodegradáveis estão sendo sintetizadas e estudadas para atuarem como carreadoras de fármacos e genes para células e tecidos (PANYAM; LABHASETWAR, 2012) e nanopartículas de prata biogênicas estão sendo ligadas a peptídeos antimicrobianos catiônicos para agir contra micobactérias (MOHANTY *et al.*, 2013).

Mesmo com tantas aplicações, há grandes desafios na síntese de nanopartículas: controlar o tamanho da partícula, modular as propriedades da superfície e, quando presente, a liberação controlada de algum fármaco associado para atingir sítios específicos em doses terapêuticas ainda são

obstáculos que não foram totalmente alcançados (BURDA *et al.*, 2005; MOHANRAJ; CHEN, 2006). Nos últimos anos a síntese de nanopartículas por meio de micro-organismos tem facilitado o controle de algumas características físicas das nanopartículas. BYRNE *et al.* (2011) conseguiram controlar o tamanho de nanopartículas de magnetita produzidas por *Geobacter sulfurreducens* ao ajustar o total de biomassa introduzida no início do processo de bioprodução.

Devido a sua área superficial extremamente elevada em relação ao seu volume existe um grande desafio em obter materiais em escala nanométrica, uma vez que esses materiais podem apresentar-se na forma metaestável (GOPALAKRISHNAN, 1995), Uma maneira de arquitetar as nanoestruturas é através da tão conhecida metodologia “bottom up”, que consiste em unir átomos ou moléculas de uma forma consolidada e organizada. Normalmente essa obtenção ocorre por reações químicas controladas por catálises ou por automontagem. Esse processo é amplamente encontrado na biologia, onde as enzimas podem ser os catalisadores para controlar a formação de nanoestruturas ou nanoestruturas podem ser formadas por auto-associação de peptídeos (LIU *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2010). Contrastando com essa metodologia encontra-se a estratégia “top-down” que parte de um material de dimensões macroscópicas que é reduzido à escala nanométrica. A técnica mais utilizada nesta metodologia é a litografia, que consiste em irradiar uma superfície em pontos específicos, onde a parte não modificada é recoberta com material não fotossensível (WILNER; WILNER, 2010).I

1.2. O potencial antimicrobiano das nanopartículas metálicas

Os mecanismos de ação antimicrobiana das nanopartículas metálicas não são plenamente conhecidos, mas estudos com nanopartículas de prata indicam a ligação dessas à parede celular e à membrana plasmática dos micro-organismos. Sabe-se que esta interação ocorre por meio de uma associação diferenciada com oligossacarídeos e peptídeoglicanas superficiais, o que ocasiona alterações morfológicas na célula bacteriana. Íons de prata,

especificamente, interagem eletrostaticamente com as peptidoglicanas presentes na parede celular de bactérias, havendo ainda evidências de captura de moléculas por meio de associação com grupamento tiol (FENG *et al.*, 2000).

As enzimas também podem interagir com nanopartículas, especificamente as de prata ou de ouro, por meio dos grupos sulfídricos, o que inativa a proteína e conseqüentemente o metabolismo celular, já que muitas destas enzimas participam do transporte ativo de íons e energia. Esta inativação acaba bloqueando o processo de respiração celular e da transferência de elétrons. Ainda em relação às nanopartículas de prata, a interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA) é possível por meio do deslocamento das ligações de hidrogênio entre as bases purina e pirimidina, o que impede a replicação do material genético (SONDI; SONDI, 2004).

Além da ação antimicrobiana natural que algumas nanopartículas metálicas apresentam, há a possibilidade de um mesmo tipo de material ser submetido a diferentes tipos de modificações superficiais e funcionalizações moleculares, aumentando consideravelmente o número de novos materiais antimicrobianos. SAPFORD *et. al* (2013) discorrem sobre diferentes métodos de modificações, entre elas a interação puramente eletrostática entre a nanopartícula com um ligante negativamente carregado e uma região catiônica de um peptídeo e a conjugação de nanopartículas a peptídeos utilizando-se de um grupamento tiol que se liga diretamente à nanopartícula.

É importante destacar que a eficiência da ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas está diretamente vinculada à sua grande área superficial, pois as chances de contato entre a nanopartícula e a membrana plasmática são maiores, o que aumenta e favorece a entrada da nanoestrutura na célula (BELLANTONE *et. al*, 2002; FENG *et. al* 2000; ARAÚJO, 2010). Ainda assim, a atividade antimicrobiana varia muito dependendo da composição química, pois enquanto nanopartículas de Ag são amplamente usadas como produtos antimicrobianos, a alumina tem baixa ação antimicrobiana e a ação de outras nanoestruturas inorgânicas ainda não é tão conhecida (RAI *et al.*, 2009).

1.3. Toxicidade de Nanopartículas de Alumina

Em relação às nanoestruturas óxidas, como o caso da alumina, o potencial antimicrobiano ainda está sendo investigado. Estudos de toxicidade destas nanopartículas foram conduzidos por SADIQ *et al.* (2009); foram testadas concentrações variando de 10 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanopartículas contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. SADIQ *et al.* observaram ação inibitória moderada de crescimento celular á concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Desta forma, acredita-se que as nanopartículas de alumina apresentam toxicidade extremamente atenuada quando em contato com micro-organismos, sendo assim um material inorgânico valioso para a modificação com moléculas antimicrobianas. Deve-se considerar ainda que a superfície hidroxilada da alumina tem caráter nucleofílico, a qual pode reagir com grupamentos eletrofílicos de moléculas orgânicas ou biomoléculas. A substituição da hidroxila por outro nucleófiolo como amina ou sulfidrilta também pode ser conduzida em condições reacionais brandas, em uma única etapa (CHAUBE *et al.*, 2005; SAPSFORD *et al.*, 2013).

1.4. A prevenção de doenças infecciosas pelo controle de micro-organismos

A prevenção de doenças infecciosas é um desafio global, pois os micro-organismos distribuem-se ao redor do mundo e espalham-se das formas mais variadas, tal como pelo consumo de água ou comida contaminadas. Os organismos patogênicos espalham-se também por meio das doenças hospitalares ou epidemias. Além disso, bactérias e fungos possuem capacidade reprodutora elevada e são transportados com facilidade de um ambiente para outro e, apesar de muitas vezes serem específicos em relação ao habitat, esses organismos podem apresentar formas esporulares e inertes

que permitem sua sobrevivência nos ambientes até que as condições sejam favoráveis à retomada da atividade metabólica. Outro fato importante que vem contribuindo para o aumento de casos de doenças infectocontagiosas causadas por micro-organismos é o uso indiscriminado de antibióticos, já que esta prática favorece a seleção de linhagens resistentes de bactérias, fungos e/ou vírus (PRESCOTT, 2002).

Além disso, sabe-se que estes micro-organismos evoluem a taxas aceleradas devido aos seus ciclos de vida curtos, permitindo, por seleção natural, a prevalência de linhagens resistentes (HUGHES; ANDERSSON, 2012). Outro fator que contribui, nos dias de hoje, para um aumento na proliferação de micro-organismos patogênicos é o aumento populacional e a falta de saneamento básico nas regiões mais pobres do mundo. Com o aumento da população, é mais fácil que o ser humano entre em contato com um micro-organismo e este desenvolva resistência a determinados mecanismos de defesa. Trata-se, aqui, de uma questão probabilística, já que o aumento de micro-organismos aliado ao aumento populacional aumentam as chances de interação entre eles. A falta de saneamento básico leva à formação de nichos adequados para a proliferação destes organismos (PRESCOTT, 2002).

Neste contexto, por mais controverso que seja, é de extrema importância a busca de agentes antimicrobianos capazes de atenuar os efeitos dos micro-organismos. Contudo, a busca de novos agentes antimicrobianos não é objeto final de pesquisa; é necessário também buscar entender como esses agentes antimicrobianos atuam sobre bactérias, por exemplo. Compreendendo melhor a forma de atuação torna-se mais fácil desenvolver fármacos e outros materiais antimicrobianos mais eficazes. (LI *et al.*, 2008).

1.5. Os peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são produzidos naturalmente entre os mais diversos tipos de organismos, sendo uma estratégia preventiva de plantas,

animais e de outros micro-organismos. A maioria dos peptídeos antimicrobianos compartilha algumas características físico-químicas em comum, como o caráter catiônico e anfifílico, com cadeia peptídica variando entre 10 e 50 resíduos de aminoácidos (HANCOCK; SAHL, 2006; SNYDER; WOROBO, 2014).

Atualmente já é bem estabelecida a etapa inicial da interação peptídeo-célula. Esta interação é basicamente uma atração eletrostática entre o peptídeo (catiônico) e os fosfolipídios aniônicos da membrana celular. O que ocorre em seguida acredita-se que seja a inserção do peptídeo na parte hidrofóbica da bicamada lipídica (ZASLOFF, 2002; BECHINGER, 2009;). Desta forma os peptídeos antimicrobianos interagem diretamente com as membranas, causando perturbações e desestabilizações que podem resultar no rompimento da membrana celular, levando ao extravasamento do material do citoplasma e à morte da célula (ZASLOFF, 2002; BECHINGER, 2009;).

Peptídeos antimicrobianos podem ser ferramentas biotecnológicas de grande importância em diversos campos, como nas ciências de alimentos, na agricultura ou mesmo no combate a organismos fitopatogênicos (BADOSA *et al.*, 2007; MONTESINOS, 2007; SNYDER; WOROBO, 2014). Um campo de atuação vinculado diretamente à saúde pública está relacionado ao aumento em todo o mundo do número de patógenos resistentes a diversos tipos de antibióticos, o que leva a comunidade científica a buscar por novos compostos antimicrobianos (AOKI; UEDA, 2013; BRANDELLI, 2012).

Desta forma, os peptídeos antimicrobianos são uma alternativa promissora, pois são menos susceptíveis à possível resistência adquirida pelos patógenos como ocorre com os antibióticos, o que permite sua utilização de diferentes maneiras até mesmo como revestimento de materiais cirúrgicos (BRANDELLI, 2012), podendo reduzir consideravelmente os casos de infecções hospitalares.

Contudo, a escolha de peptídeos antimicrobianos com ação elevada contra bactérias e fungos depende da compreensão de seu mecanismo de ação, incluindo aí o aspecto de como a composição lipídica das membranas interfere na ação lítica destas biomoléculas. Sabe-se que a presença de

colesterol e uma composição específica de fosfolipídios, por exemplo, reduzem a ação de alguns peptídeos antimicrobianos (VERLY *et al.*, 2008, 2009), entretanto outras sequências curtas de aminoácidos mostram-se não seletivas para células animais, vegetais ou bacterianas. Aspectos físico-químicos da interação de peptídeos antimicrobianos com bicamadas lipídicas ainda têm sido investigados para revelar a importância de fenômenos como agregação do peptídeo ou de lipídeos da membrana, modo e extensão de inserção do peptídeo na bicamada lipídica e mecanismo de ação por meio de formação de poros ou por ação detergente (SEELIG, 1997; ZASLOFF, 2002; BECHINGER; LOHNER, 2006; BECHINGER, 2009; VERLY *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2013)

1.6. Nanoestruturas híbridas orgânico-metálicas

A bionanotecnologia é a interface entre os sistemas biológicos e os nanomateriais. Este campo da nanotecnologia é único e a relação entre seus componentes (biomoléculas e nanomateriais) pode ocorrer em dois sentidos distintos dependendo do objetivo buscado, já que as biomoléculas podem ser hora as ferramentas auxiliares para a criação de novos materiais (WILNER; WILNER, 2010), hora as ferramentas realmente funcionais para a derivatização de materiais inorgânicos como sílica, alumina, ouro e prata (SAPSFORD *et al.*, 2013). Na prática, significa dizer que existem basicamente dois objetivos funcionais dentro da bionanotecnologia. Pode-se, portanto, utilizar de biomoléculas para obtenção de nanopartículas que apresentem funções que não sejam estritamente biológicas e podem-se utilizar nanopartículas que possam apresentar funções similares àquelas das biomoléculas, especialmente por meio da diversidade de funcionalização química disponível para as nanopartículas inorgânicas (HARTGERINK *et al.*, 2002; SAPSFORD *et al.*, 2013). O primeiro objetivo funcional em bionanotecnologia relaciona-se ao reconhecimento específico e às propriedades catalíticas das biomoléculas para a obtenção de nanomateriais. Como exemplo, temos a utilização de ácidos nucleicos para controlar a ordem e a posição de nanopartículas (NPs), criando,

desta forma, uma única “nanomolécula” ou nanoestruturas moleculares eletrônicas específicas em escala sublitográfica (WILLNER & WILLNER, 2010).

No segundo objetivo,, os nanomateriais seriam usados como mediadores ou monitores da interação entre fármaco/biomolécula funcional e biomoléculas alvas. (SAPSFORD *et al.*, 2013)

É cada vez mais comum a utilização de nanoestruturas híbridas, constituídas de partes orgânicas e de partes inorgânicas, usualmente metálicas, em bionanotecnologia. Uma das estruturas inorgânicas que atrai muito interesse é a nanopartícula formada a partir de óxidos coloidais, devido à versatilidade e à facilidade com que essas podem ser modificadas e conjugadas com materiais que apresentam atividades biológicas (NAKAMURA & ISHIMURA 2007; KNOPP *et al.*, 2009; EL HAMZAQUI *et al.*, 2010; SAPSFORD *et al.*, 2013). Entretanto, existe uma ampla literatura sobre materiais híbridos orgânico-inorgânicos baseados em sílica (HOFFMANN *et al.*, 2006), mas materiais derivados de alumina são menos estudados (LEARY SWAN *et al.*, 2005), o que abre novas perspectivas de investigação. Vale ressaltar que alumina é um material importante para a imobilização de enzimas, mas normalmente a imobilização é conduzida por adsorção (TRECCANI *et al.*, 2013). Considerando-se ainda a baixa atividade antimicrobiana da alumina nanoestruturada relatada até o momento (SADIQ *et al.*, 2009), esse óxido metálico (Al_2O_3) torna-se uma boa escolha para a síntese de materiais híbridos antimicrobianos.

O número de nanoestruturas inorgânicas conjugadas a biomoléculas é cada vez maior e alguns exemplos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 Aplicações e modificações de nanomateriais combinados a biomoléculas (modificado de SAPSFORD *et. al.*, 2013).

Material Nanoparticulado	Biomolécula	Aplicação
Ouro	Lipídeos/ DNA	Terapia gênica/ Entrega de DNA em células
Prata	Anticorpos	Detecção de superfícies celulares
Óxido de ferro	Proteínas/ peptídeos	Concentração de amostras/ terapia
Sílica	DNA/ fármacos	Entrega de fármacos e DNA
Dióxido de titânio	DNA	Marcação de organelas
Óxido de níquel	Proteínas	Biocatálise
Nanotubos de carbono	Proteínas/ enzimas	Entrega de fármacos

Sendo assim, pode-se, por exemplo, escolher um peptídeo antimicrobiano seletivo para bactérias, optar por um método de síntese de nanomateriais dentre os vários descritos em literatura e preparar uma nanoestrutura inorgânica derivatizada com a biomolécula seguindo a rota de modificação mais apropriada, o que dará origem a uma nanobioestrutura funcional diferente e repleta de novos questionamentos sobre sua estrutura, composição e comportamento em meios específicos. Conforme mencionado anteriormente, a preparação desse material pode ser conduzida por métodos mais simples e compatíveis com a química de peptídeos (LEARY SWAN *et al.*, 2005; SAPSFORD *et al.*, 2013)

Polímeros de peptídeos e proteínas são muito promissores já que estas biomoléculas podem organizar-se em suas estruturas nativas secundárias ou terciárias e apresentarem suas características de forma complementar umas as outras. Contudo, as limitações físicas destas biomoléculas, como a sensibilidade à temperatura, pH e solventes orgânicos pode reduzir sua atividade. Desta forma, é necessário que, quando conjugados a nanopartículas, estas sejam compatíveis e eficientes, por exemplo, em reduzir a interação entre as biomoléculas e o meio externo (DUNCAN, 2003; HARRIS; CHESS, 2003).

1.7. O peptídeo sintético HSP2

O peptídeo sintético HSP2 foi desenhado tendo como modelo o composto polipeptídico de 14 resíduos de aminoácidos, anfifílico e com estrutura em α -hélice denominado Hylaseptina P1 (HSP1). Este peptídeo foi extraído, purificado e caracterizado a partir de compostos encontrados em secreções da pele do anfíbio *Hypsiboas punctata*. Devido à sua versatilidade e à variedade de ambientes ao qual estão expostos, as peles de anfíbios anuros tem grande potencial antimicrobiano, e o HSP1 mostrou-se ativo contra culturas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e não apresentou nenhum efeito lítico contra hemácias ou linfócitos (PRATES *et. al.* 2004).

O desenho escolhido para o HSP2 parte do pressuposto de que a substituição do resíduo de ácido aspártico encontrado na sequência do HSP1 por um resíduo de ácido glutâmico traria maior eficiência para as reações de conjugação entre as nanopartículas e os peptídeos, a despeito da inserção somente de uma unidade de metileno como espaçador. Além disso, a alteração não traria grandes mudanças nas características do peptídeo já que ambos resíduos são polares e ácidos (PRATES *et. al.* 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Materiais nanoestruturados podem apresentar propriedades físico-químicas e aplicações especiais simplesmente devido às propriedades novas que surgem em escala nanométrica, tal como a relação superfície/volume elevada e a possibilidade do controle específico de relações intermoleculares. (BURDA *et al.*, 2005; KNOPP *et al.*, 2009). Devido à sua versatilidade, a prospecção e caracterização destas estruturas são fundamentais para a compreensão e desenvolvimento da nanobiotecnologia.

Peptídeos antimicrobianos são uma ferramenta da defesa de animais e plantas contra microrganismos e patógenos. Desta forma, aplicações variadas destas biomoléculas podem ser vislumbradas, tais como a produção de plantas transgênicas com ação antibacteriana e até mesmo antiviral (BHARGAVA *et al.*, 2007) ou mesmo a utilização de peptídeos antimicrobianos para o combate de doenças de plantas (MONTESINOS, 2007; ZEITLER *et al.*, 2013). Outra aplicação importante é a incorporação de peptídeos antimicrobianos a embalagens de alimentos com o objetivo de reduzir o risco de contaminação e, conseqüentemente, aumentar o tempo de prateleira desses produtos. (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Além disso, a síntese de alumina é um procedimento simples e relativamente barato e as etapas de modificações também são de fácil execução. Deste modo, aplicações do material híbrido em embalagens de alimentos e outros produtos biotecnológicos podem ser vislumbradas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Construir e caracterizar estruturalmente e funcionalmente quanto à atividade antimicrobiana nanoestruturas de alumina e peptídeo antimicrobiano.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar pelo método de fase sólida, purificar por cromatografia de fase reversa e caracterizar por espectrometria de massa o peptídeo antimicrobiano HSP2 amidado (H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH₂)
- Sintetizar partículas nanoestruturadas de alumina e derivatizá-las com um grupamento funcional amina.
- Ligar covalentemente o peptídeo amidado HSP2 à nanopartícula de alumina derivatizada com grupo amino por meio de formação de uma ligação amida com o grupamento carboxila da cadeia lateral do resíduo de ácido glutâmico.
- Caracterizar as nanoestruturas obtidas por técnicas físico-químicas como a difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho, adsorção e dessorção de nitrogênio e microscopia eletrônica de transmissão.
- Elaborar e conduzir ensaios de atividade antimicrobiana do peptídeo HSP2 amidado e das nanopartículas derivatizadas com o peptídeo antimicrobiano contra bactérias. O ensaio elaborado deverá ser específico para materiais nanoestruturados, que podem apresentar turbidez a despeito da escala nanométrica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Os derivados de aminoácidos (Fmoc-aminoácidos), resinas e o reagente tetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino)metilideno]-dimetilazanium (TBTU) utilizados para a síntese dos peptídeos eram produtos da Peptides International (Louisville, EUA). $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, (3-aminopropil)trióxissilano, KBr, 4-metilpiperidina, diisopropilcarbodiimida, *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA), triisopropilsilano eram produtos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). NaCO_3 e o etanol anidro eram produtos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os solventes ácido acético, metanol, 2-propanol e *N,N*-dimetilformamida (DMF) eram produtos de grau P.A. da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil), sendo que a DMF (ponto de ebulição, 146 °C) era destilada antes do uso. A acetonitrila (grau cromatográfico), a solução de peróxido de hidrogênio 30% (em volume) e o tolueno eram produtos da JT Baker (Phillipsburg, Estados Unidos). A água utilizada era do tipo 1, Milli-Q (Millipore-Waters, Billerica, EUA). 3-(etiliminometilidenoamino)-*N,N*-dimetilpropano-1-amino (EDC) era um produto da GE-Healthcare (Uppsala, Suécia).

4.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKAAG-NH₂.

4.2.1. Síntese de peptídeo em Fase Sólida

O peptídeo H-GILEAIKAIKAAG-NH₂ denominado de HSP2 foi desenhado a partir de uma modificação na sequência de aminoácidos do peptídeo H-GILDAIKAIKAAG-NH₂ (HSP1) – a substituição do resíduo de ácido aspártico por ácido glutâmico, ambos polares e ácidos o que permitiu a manutenção da estrutura do peptídeo original, com atividade antimicrobiana já determinada (PRATES *et al.*, 2004). A síntese foi feita pelo método de fase sólida, com estratégia Fmoc (CHAN; WHITE, 2000; FIELDS; NOBLE 1990)

com a utilização da resina Fmoc-PAL-PEG-OS (NovaBiochem-Merck, Darmstadt, Alemanha). As reações de desproteção do grupamento *Fmoc* foram conduzidas com uma solução de 4-metilpiperidina em N,N-dimetilformamida (DMF) a 25% (em volume) durante 30 minutos. Os acoplamentos para formação das ligações peptídicas foram realizados com 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC)/1-hidroxibenzotriazola (HOBt) ou com hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU)/N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) em DMF durante 90 minutos. Ao final da síntese, a reação de desproteção final e desligamento entre o peptídeo e a resina foi conduzida em uma solução de ácido trifluoracético (90% em volume) triisopropilsilano (5% em volume) e água (5% em volume). O tempo de reação foi de 120 minutos a temperatura ambiente. Após lavagens com éter diisopropílico, o sobrenadante foi descartado e os peptídeos foram extraídos com mistura de água e acetonitrila (1:1, v:v) e liofilizados (figura 1).

Síntese do peptídeo em Fase Sólida
Estratégia Fmoc (CHAN; WHITE, 2000; FIELDS, NOBLE 1990)

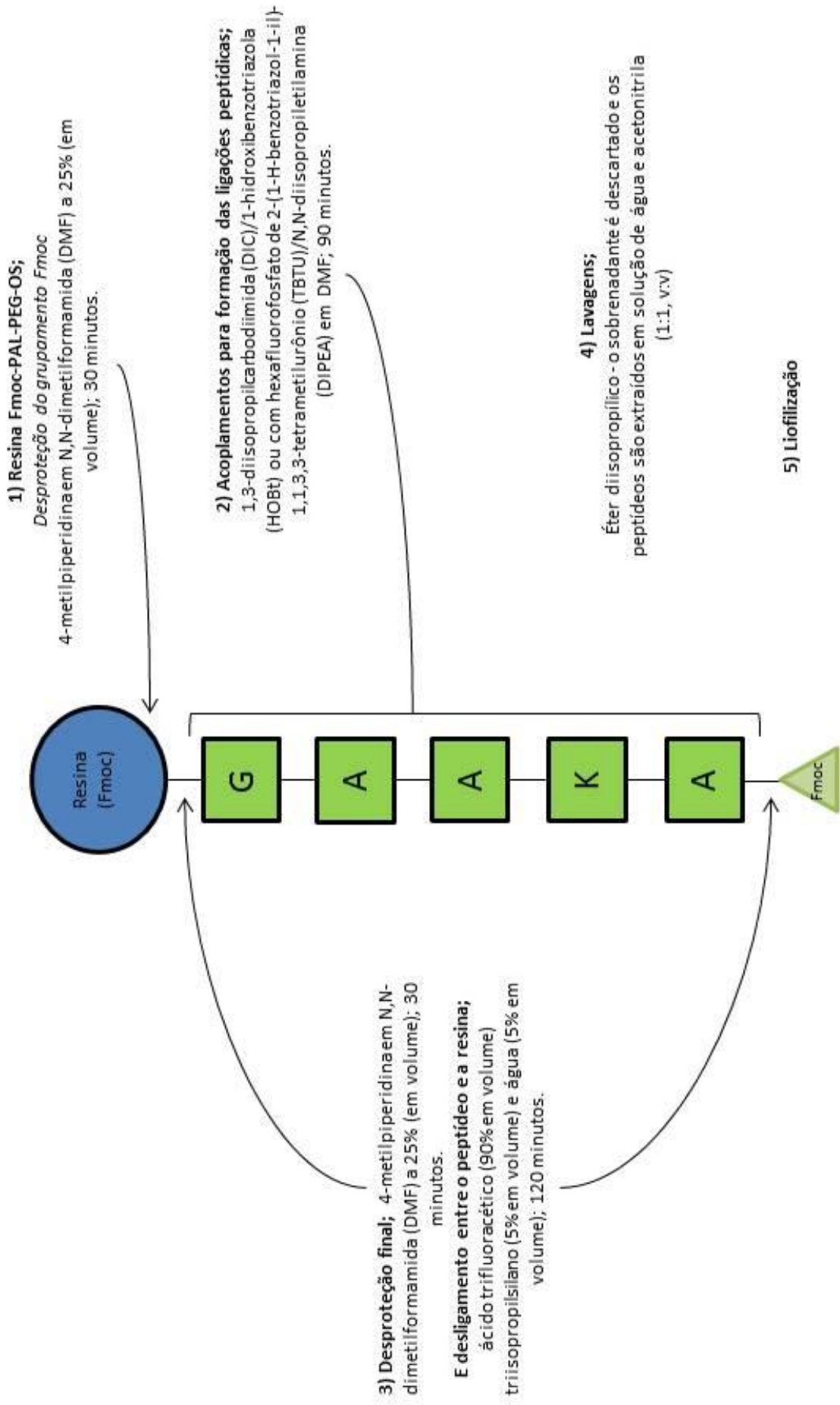


Figura 1 Esquema da rota de síntese do peptídeo em fase sólida

4.2.2. Purificação por Cromatografia Líquida de Fase Reversa

O peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo modelo LC8A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Após liofilizada, a amostra foi ressuspensa em água MILLI-Q na concentração de 1 mg.mL^{-1} e injetada no cromatógrafo em três etapas com volume de $400 \mu\text{L}$ cada injeção. Entre as injeções sucessivas, era dado um intervalo de dois minutos para permitir a passagem da amostra por um *loop* e reduzir a perda de material. A amostra percorreu parte do sistema do cromatógrafo e manteve-se retida em uma coluna Vydac C18, $10 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (Grace-Vydac, Deerfield, IL, EUA) e a sua detecção foi conduzida por absorção a 216 e 280 nm. O fluxo foi de $3,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e a corrida cromatográfica foi conduzida à temperatura ambiente. A condição de variação de solvente utilizada foi a seguinte: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{TFA}$ (95:5:0,1, v:v:v) durante 5 minutos, seguido de gradiente linear até $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{TFA}$ (30:70:0,1, v:v:v) durante 65 minutos.

4.2.3. Caracterização por Espectrometria de Massa

O peptídeo sintético HSP2 foi caracterizado em relação a sua massa molecular (mais especificamente a relação entre massa (m) e carga (z) da molécula), por espectrometria de massa na modalidade MALDI-ToF (TANAKA, 2003). O equipamento utilizado foi Ultraflex III ToF-ToF, (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA). Após a purificação da amostra, o material foi liofilizado e ressuspensa em água deionizada e adicionado a matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (1:3 v:v). A solução de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico foi preparada a 10 mg mL^{-1} (50 mmol.L^{-1}) em solução aquosa de acetonitrila (1:1, v:v), contendo ácido trifluoroacético a 0,3% em volume. A mistura de matriz e amostra foi aplicada em triplicata em uma placa de leitura de ácido inoxidável e cristalizada à temperatura ambiente. O produto esperado teve sua massa molecular determinada com calibração externa feita por meio de uma mistura de peptídeos padrão fornecida pelo fabricante do equipamento (Peptide Calibrant II, Bruker Daltonics, Bilerica, MA, EUA).

4.2.4. Quantificação do peptídeo HSP2 amidado

A quantificação do peptídeo HSP2 foi feita segundo o método descrito por MURPHY; KIES (1960), no qual a absorbância da solução em diluições diferentes é medida nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225nm e a concentração final é determinada pela seguinte equação obtida empiricamente:

$$X = (A_{215} - A_{225}). 144$$

$$Y = (A_{205}). 31$$

$$[Peptídeo] = [(X + Y)/2, \mu\text{g.mL}^{-1}]$$

4.2.5. Ensaio de atividade antimicrobiana do peptídeo sintético HSP2

Após a quantificação do HSP2, seguiu-se o ensaio antimicrobiano. Para o ensaio, utilizou-se a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 8739) obtida a partir das culturas estoque da Universidade Católica de Brasília. O bioensaio foi realizado na presença de sete concentrações (256, 128, 64, 48, 24, 12 e 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) do HSP2. As concentrações foram determinadas a partir da quantificação feita anteriormente. O ensaio foi conduzido em uma placa de cultura tecidos de 96 poços com fundo chato e estéril de fábrica (Techno Plastic Products Ag, Zollstr, Trasadingen, Suíça). Em cada poço foram adicionados 50 μL do inóculo de bactéria e 50 μL de meio de cultura com o HSP2 ou a nanopartícula nas diferentes concentrações testadas. O controle positivo de crescimento consistiu de 50 μL de inóculo e 50 μL de meio de cultura estéril. O controle negativo foi realizado com a adição de 50 μL de antibiótico (tetraciclina 20mg.mL⁻¹ ou cloranfenicol 10mg.mL⁻¹) sobre os 50 μL do inóculo. A placa foi então colocada em um leitor de microplacas sob agitação constante a 37°C para o crescimento das bactérias por 12-13 horas. As leituras foram conduzidas a 630 nm e 490 nm a cada 30 minutos.

4.3. Preparação da nanopartícula de alumina, derivatizações químicas e ligação do peptídeo H-GILEAIKAIKAIKAAG-NH₂.

Todos os solventes e reagentes utilizados nas etapas descritas nesta seção são de grau analítico e foram empregados sem purificação adicional.

Obtenção das partículas de alumina: A nanopartícula de alumina foi obtida pela mistura de nitrato de alumínio e carbonato de sódio. Inicialmente, uma solução de nitrato de alumínio a 0,041 mol.L⁻¹ foi preparada pela solubilização de 7,8 g de Al(NO₃)₃ (Sigma-Aldrich, USA) em 200 mL de água Milli-Q. A solução foi transferida para um funil de adição. Em outro funil de adição, foi adicionada uma solução de NaCO₃ (Merk, Darmstadt, Alemanha) a 0,075 mol.L⁻¹, preparada pela solubilização de 4,0 g de NaCO₃ em 200 mL de água Milli-Q. As duas soluções foram adicionadas, gota a gota, sobre um balão de fundo redondo contendo 100 mL de água Milli-Q, o qual foi mantido a 70 °C durante as adições de Al(NO₃)₃ e NaCO₃. Completada a reação, o sólido gelatinoso obtido (provavelmente boehmita ou AlOOH, POTDAR *et al.*, 2007) foi recolhido por filtração e lavado com água Milli-Q e acetona e seco à temperatura ambiente. A conversão de boehmita em alumina (Al₂O₃) foi conduzida por calcinação a 550 °C durante cinco horas em mufla modelo da Quimis (Diadema, Brasil) (figura 2).

Obtenção das Nanopartículas (POTDAR et al., 2007)

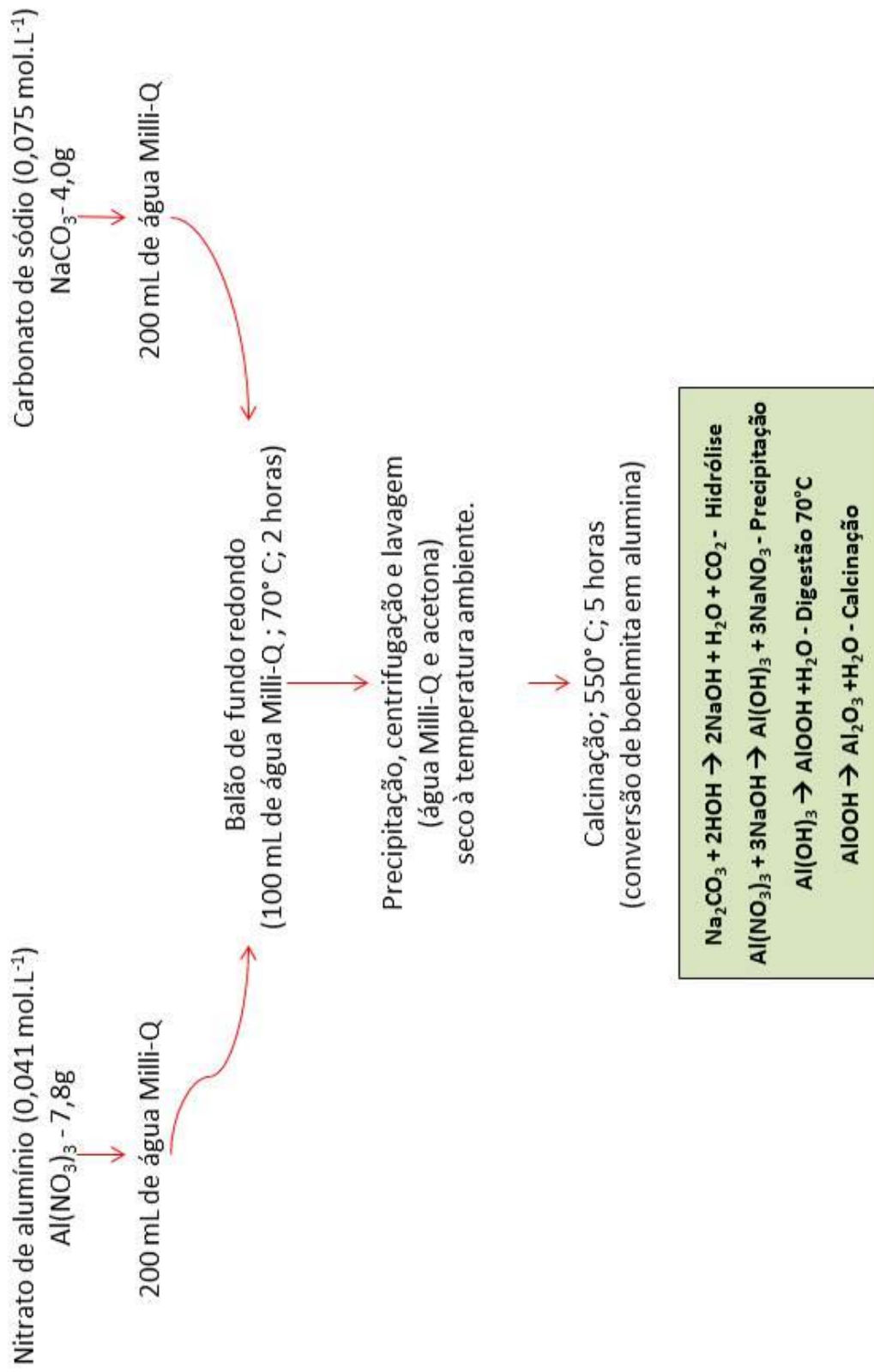


Figura 2 Obtenção das nanopartículas de alumina

Ativação da superfície da alumina com peróxido de hidrogênio:

Aproximadamente 1,0 g das nanopartículas de alumina foi suspenso em 100 mL de peróxido de hidrogênio 30% dentro de um balão de fundo redondo de 500 mL. Um sistema de refluxo foi montado e a suspensão foi mantida em agitação durante 15 minutos. A contagem do tempo para a oxidação da nanopartícula foi iniciada somente após a observação da condensação. Em seguida, o excesso de H₂O₂ foi removido por lavagens e seguido centrifugação a 1485 x g por seis minutos. Após a eliminação do sobrenadante, as nanoestruturas foram lavadas cinco vezes com água desionizada e cinco vezes com etanol anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo as lavagens recolhidas por centrifugação a 1485 g por quatro minutos. O solvente (EtOH) foi removido a 80°C por 40 minutos e o sólido foi resfriado à temperatura ambiente por 20 minutos.

Modificação da superfície da alumina com grupo amino: Em seguida, as nanoestruturas foram suspensas em 10 mL de tolueno (J.T. Barker, Center Valley, EUA) e transferidas para um balão de fundo redondo de 250 mL. Mais 20 mL de tolueno foram adicionados ao cadinho onde estava a nanopartícula para que o restante do material fosse transferido. Foram adicionados então mais 10 mL de tolueno e 2,5 mL de (3-aminopropil)trietoxissilano (Sigma, St Louis, EUA) já no balão volumétrico. O sistema foi mantido em refluxo por duas horas. Posteriormente o tolueno foi eliminado por centrifugação (1485 g, 5 minutos, 25°C) e foram conduzidas as seguintes etapas de lavagens em banho ultrassom por dois minutos:

- 1) Duas vezes com tolueno;
- 2) Duas vezes com 2-propanol ;
- 3) Duas vezes com N,N-dimetilformamida;
- 4) Três vezes com EtOH;
- 5) Três vezes com água deionizada.

Após a lavagem com água, o material foi colocado em um dessecador por 48 horas. É importante lembrar que após cada lavagem o material era centrifugado a 1485 g por três minutos.

Modificação da superfície da alumina aminada com o peptídeo antimicrobiano: A inserção do peptídeo à nanopartícula ocorreu com a ressuspensão de 100mg de nanopartículas aminadas e 10mg do HSP2 purificado em 3mL de água Milli-Q. Foram adicionados 1,5 mg de 1-hidroxibenzotriazola (HOBt) e 1,5 μ L de 1-Eetil-3-(3-dimetilamonopropil)carbodiimida (EDC). A reação ocorreu por 3 horas em um béquer sob agitação constante e aquecido à 45°C. Após o período de reação, a solução foi centrifugada (1485 g, 5 minutos, 25°C) e lavada com água Milli-Q e EtOH (figura 3).

Modificação das nanopartículas com o peptídeo HSP2

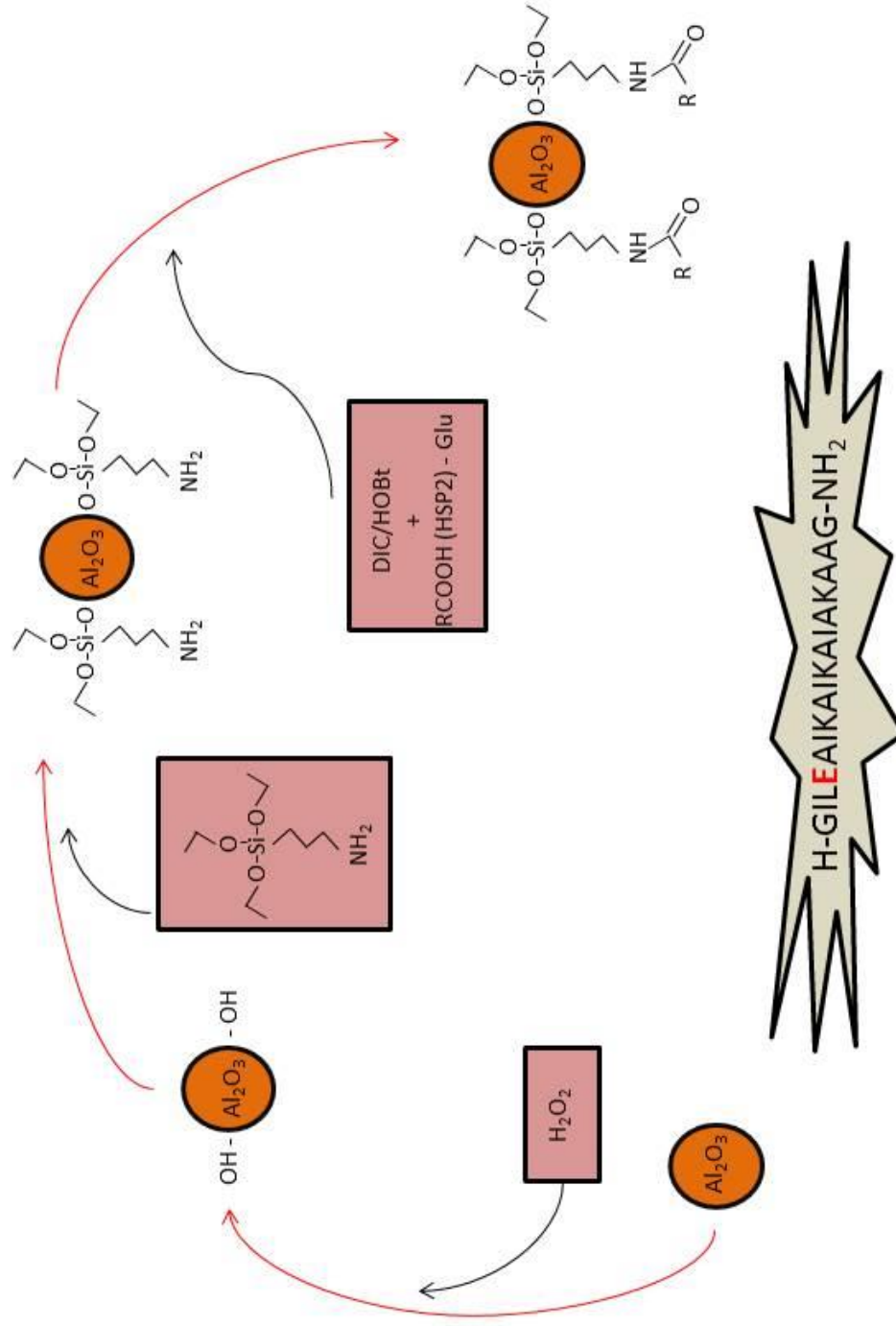


Figura 3 Processo de modificação das nanopartículas de alumina com o HSP2

4.4. Caracterização das nanopartículas de alumina, de alumina aminada e das nanoestruturas híbridas.

A caracterização das nanoestruturas foi conduzida utilizando-se de três métodos distintos: a microscopia eletrônica de transmissão, a análise de tamanho de partícula e de dimensão de poros e a espectroscopia de infravermelho.

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para observação no Microscópio eletrônico de transmissão (MET), a amostra ressuspensa em água desionizada a 1mg.mL^{-1} foi pipetada (3 μL) em um filme de Formvar colocado sobre a tela de cobre utilizada para inserir as amostras no microscópio. Após a secagem, cada um dos quatro lotes de preparações independentes de alumina foi analisado e suas imagens foram comparadas para verificar a semelhança morfológica dos agregados de nanopartículas. O microscópio utilizado foi modelo 10-11 da JEOL (Tokyo, Japão).

4.4.2. Adsorção e Dessorção de Nitrogênio

A adsorção de nitrogênio analisa a superficial e a porosidade das partículas por meio da adsorção e dessorção de nitrogênio nos poros das nanopartículas. É um processo isotérmico, com variações de pressão e volume apenas. Foi utilizado um analisador volumétrico de adsorção de gás, Quantachrome NovaWin version 10.01 manufaturado pela Quantachrome Instruments (Boynton Beach, EUA). As teorias de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Barrett-Joyner-Halend (BJH) foram utilizadas para calcular a área superficial e o tamanho do poro, respectivamente (KRUK *et al.*, 1997). A

análise foi conduzida pela Maria Betânia d'Henri Teixeira, analista química do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

4.4.3. Difração de Raio X de Pó

A medida de raio x do pó foi conduzida através da radiação de $\text{CuK}\alpha$, 40 kW de voltagem e 30 mA de corrente sobre a superfície do pó depositado no porta-amostra. A medida foi realizada utilizando o instrumento RigakuD/Max-B da Rigaku, Tokyo, Japão. Os espectros foram obtidos com incremento de $0,02^\circ$. O equipamento utilizado é encontrado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

4.4.4. Espectroscopia de Infravermelho

A análise de espectroscopia de infravermelho foi conduzida na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília. O brometo de potássio (KBr) foi seco a uma temperatura de 200°C durante doze horas. Para a análise foi preparada uma pastilha de KBr ao se misturar uma pequena alíquota da amostra com brometo de potássio que foram macerados vigorosamente com o auxílio de um almofariz com pistilo até a formação de um pó fino. Em seguida, o material macerado foi pressionado utilizando-se uma prensa manual, a fim de que fosse formada uma pastilha transparente para ser analisada. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro modelo 640-IR FT-IR da Varian-Agilent (Santa Clara, EUA).

4.4.5 Avaliação do Ensaio Colorimétrico como Teste de Viabilidade Celular.

Para avaliar a viabilidade de se utilizar o teste colorimétrico proposto por MOSMANN, 1983, foram conduzidos diferentes ensaios prévios variando-se a

quantidade do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Foram testados volumes de 40 μL ; 50 μL e 60 μL do reagente em 100 mL de solução tampão fosfato-salina estéril em culturas de *Escherichia coli* (ATCC 8739). Uma solução estoque de MTT foi preparada a 4% (p/v) em solução tampão fosfato-salino. Além disso, verificou-se se a nanopartícula por si não iria reagir com o MTT e mascarar os resultados, então se conduziu ensaio estéril contendo apenas a nanopartícula e o MTT. Outro fator importante a ser observado era se a faixa de absorvância após o crescimento bacteriano não seria alta o suficiente para extrapolar a faixa de leitura dos equipamentos utilizados e não fornecer informações úteis. Para isso, foi conduzido um ensaio colorimétrico de oito horas com análise amostral periódica a cada hora para verificar a escala de absorvância que a cultura de células apresentava durante o período de incubação e após reagir com o MTT. Foram realizadas três diluições da amostra de forma que, quando $t_{(i)} = 0$ horas, a concentração de células inicial do ensaio fosse igual a $1,5 \times 10^5$; $1,5 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^3$ bactérias/mL. Esta quantidade de células/mL é baseada na escala de McFarland, que consiste na medida periódica de absorvância a 600 e a 630nm do meio de cultura inoculado. A absorvância observada reflete a turbidez do meio causada pelo aumento de células bacterianas (ANVISA, 2006). Quando a absorvância é de 0,5 entende-se que a quantidade de bactérias é de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. A partir desta quantidade em suspensão, são feitas mais três diluições (1:10; 1:100 e 1:1000) para que a quantidade de bactérias utilizada no ensaio fosse de $1,5 \times 10^5$ bactérias/mL. Esta é a quantidade de bactérias determinada para iniciar o ensaio propriamente dito, permitindo a obtenção da curva de crescimento ideal para o ensaio de atividade antimicrobiana.

Como dito anteriormente, a cada hora era retirada uma alíquota de 500 μL da amostra que era colocada em tubos *ependorfs* de 2 mL e adicionado 40 μL de solução de MTT a 4% (p/v) em solução tampão fosfato-salino (5 mg/mL).. Em seguida o tubo contendo a amostra era incubado por 3 horas a 37 °C sendo adicionados 500 μL de 2-propanol:HCl a $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ (1:0,003; v:v) posteriormente para a diluição do formazan. As leituras de absorvância foram conduzidas em um espectrofotômetro a 595nm.

4.4.6. Teste de Atividade Antimicrobiana e de Viabilidade Celular na Presença de Nanopartículas

O crescimento bacteriano foi monitorado utilizando-se o ensaio tradicional (atividade antimicrobiana) e o método colorimétrico (viabilidade celular) proposto por MOSMANN, 1983 com algumas adaptações adequadas a utilização do método na presença de nanopartículas e de bactérias.

Após as análises prévias destacadas no tópico anterior, os testes de viabilidade celular e de atividade antimicrobiana foram feitos utilizando-se cultura estoque de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), cedidas pela Universidade Católica de Brasília. As quantidades em suspensão de nanopartículas de alumina livre (NPA), nanopartículas de alumina amidada (NPAA), obtidas após a reação de derivatização com (3-aminopropil)trióxissilano; e nanopartículas de alumina modificadas com o peptídeo sintético HSP-2 (NPP) testadas nos ensaios foram de 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 $mg.mL^{-1}$. A quantidade de MTT utilizada no ensaio foi de 40 μL (a uma concentração de 4% em solução tampão fosfato-salina) e as culturas foram diluídas em dez vezes após a incubação com o material nanoparticulado para realização do ensaio colorimétrico. Mais detalhes são descritos a seguir.

Inicialmente, as bactérias foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA, Mumbai, Índia) e incubadas por 12-24 horas. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em um tubo de polipropileno estéril de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura Mueller-Hinton estéril com auxílio de uma alça bacteriológica estéril. Os meios já inoculados foram incubados a 37°C sob agitação constante por 12-24 horas. Posteriormente, um mililitro da cultura de bactérias foi diluído em 100 mL de meio de cultura estéril e novamente incubado por quatro a seis horas. Nesta etapa, o crescimento das bactérias foi monitorado pelo método McFarland (ANVISA, 2006).

Em seguida, inocularam-se 400 microlitros da cultura de células a $1,5 \times 10^6$ bactérias/mL em 3,6 mL de meio de cultura estéril contendo as diferentes quantidades em suspensão de NPs. O ensaio foi feito em tubos estéreis de polipropileno de 15mL e o crescimento microbiano foi analisado por meio das variações de absorbância das amostras a 595 nm.

Após incubação das bactérias por 8-12 horas realizou-se o ensaio colorimétrico adaptado de MOSMANN (1983). O ensaio foi conduzido em tubos *ependorfs* de 2 mL contendo 450 μ L de meio de cultura Mueller-Hinton estéril nos quais foram adicionados 50 μ L das amostras. Esta diluição adicional foi necessária para que a absorbância não extrapolasse a faixa de leitura do equipamento espectrofotométrico utilizado. Em seguida, foram adicionados 40 μ L de solução de MTT e os tubos *ependorfs* foram novamente incubados a 37°C por três a quatro horas. Após o período de incubação, observou-se a formação de formazan, um sal insolúvel de coloração púrpura. Para a diluição do formazan, foram adicionados 500 μ L de 2-propanol em HCl a 0,4 mol.L⁻¹ (1:0,003; v:v) para dissolver os cristais formados. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas por cinco minutos. Foram retirados 200 μ L do conteúdo do *ependorf* e colocados em uma placa multipoços de acrílico para leitura da absorbância a 595 nm (figura 4).

Avaliação do potencial antimicrobiano

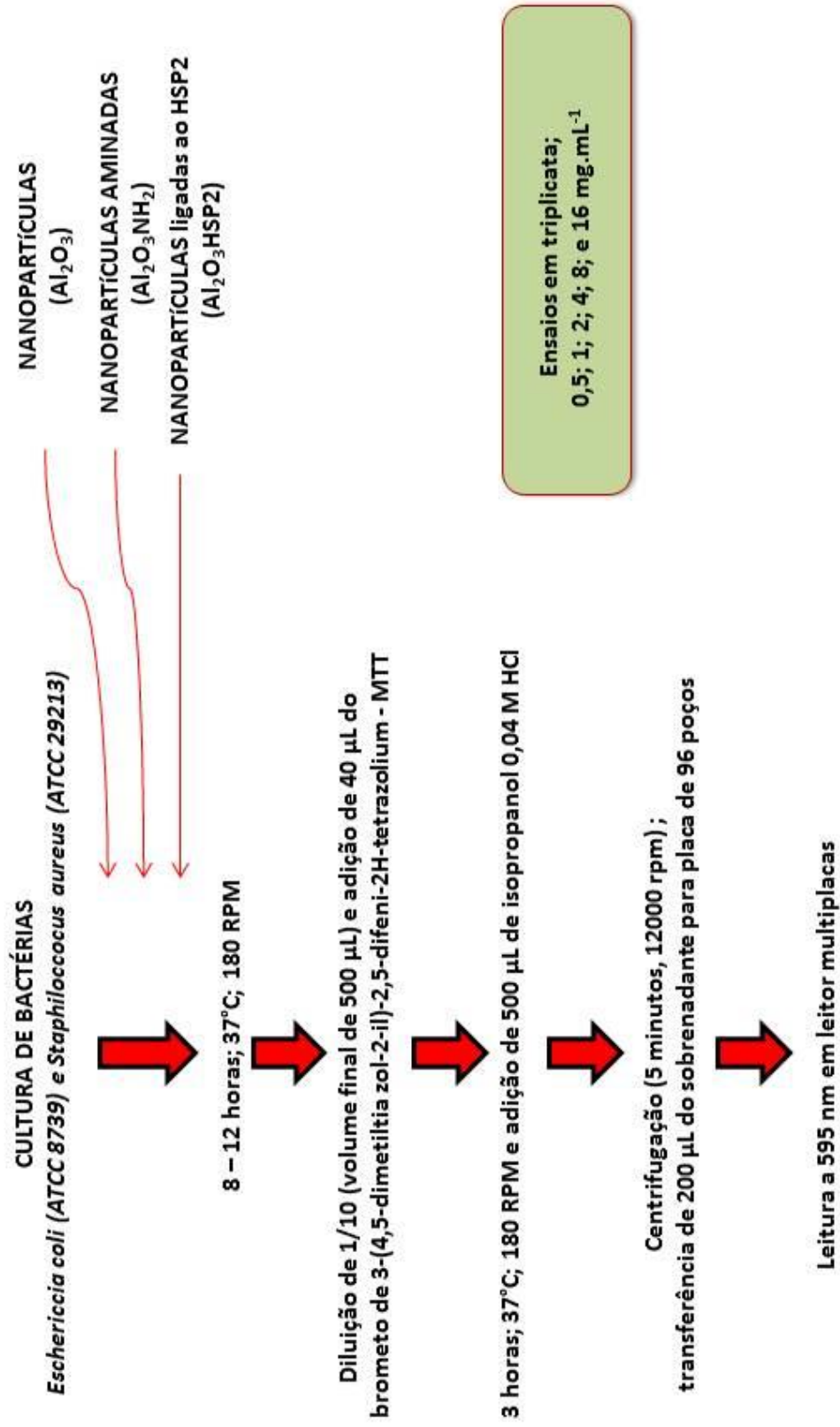


Figura 4 Esquema do ensaio de viabilidade celular e potencial antimicrobiano das nanoestruturas

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da alumina (Al_2O_3)

O caráter nanoestruturado do material obtido foi demonstrado inicialmente por análise de difração de raio-X (Figura 5). Utilizando-se o formalismo de Bragg foi possível identificar e indexar os picos de difração do difratograma da figura 5. A comparação das intensidades e posições dos picos mostra que, em comparação com o padrão ASTM, a amostra sintetizada tem como principal fase a γ -alumina (Al_2O_3). Além disso, o perfil do difratograma obtido é similar ao mostrado na literatura (POTDAR *et al.*, 2007), que trata de amostra de dimensão comparável e obtida pelo mesmo processo de síntese. A análise do pico de maior intensidade do difratograma em termos da equação de Scherrer (Equação 1) permitiu determinar o diâmetro médio das partículas (D). Para tal, o referido pico foi ajustado matematicamente a partir de uma função denominada de pseudo-voigth e os parâmetros obtidos foram inseridos na equação. Neste caso, β é a largura à meia altura do pico centrado em $45,89^\circ$ (em 2θ), cujo valor da largura intrínseca do equipamento foi descontado. O diâmetro médio encontrado para as partículas foi de 7,1 nm.

Equação 1:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

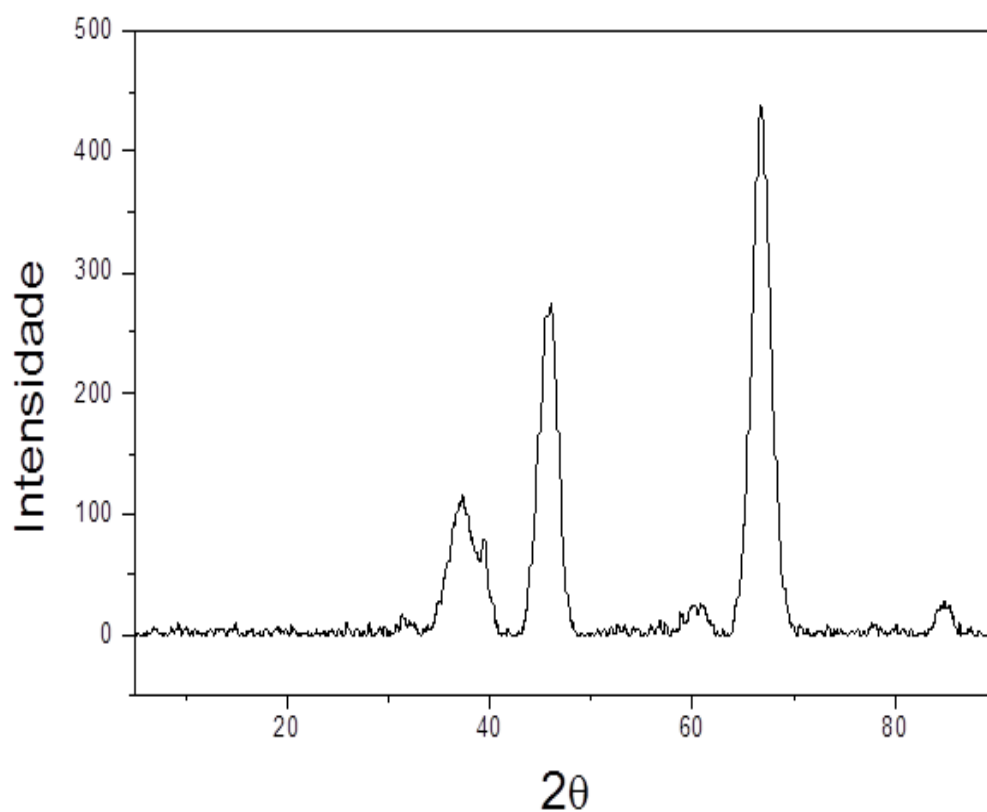


Figura 5. Espectro de difração de raio-X da partícula de γ -alumina (Al_2O_3).

A isoterma de adsorção de dessorção de nitrogênio da alumina está apresentada na Figura 6. Pela classificação IUPAC, o perfil da isoterma está de acordo com o do tipo II. Nesse perfil não está presente na isoterma um ponto de inflexão e quase não se verifica histerese. Esse tipo de isoterma é característico de material não poroso com área superficial elevada (Barton *et al.*, 1999). A área superficial foi calculada pela metodologia do BET como sendo de $412 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Como esperado, não foi possível determinar tamanhos de poros através da metodologia BJH, indicando que as partículas não são porosas ou são microporosas.

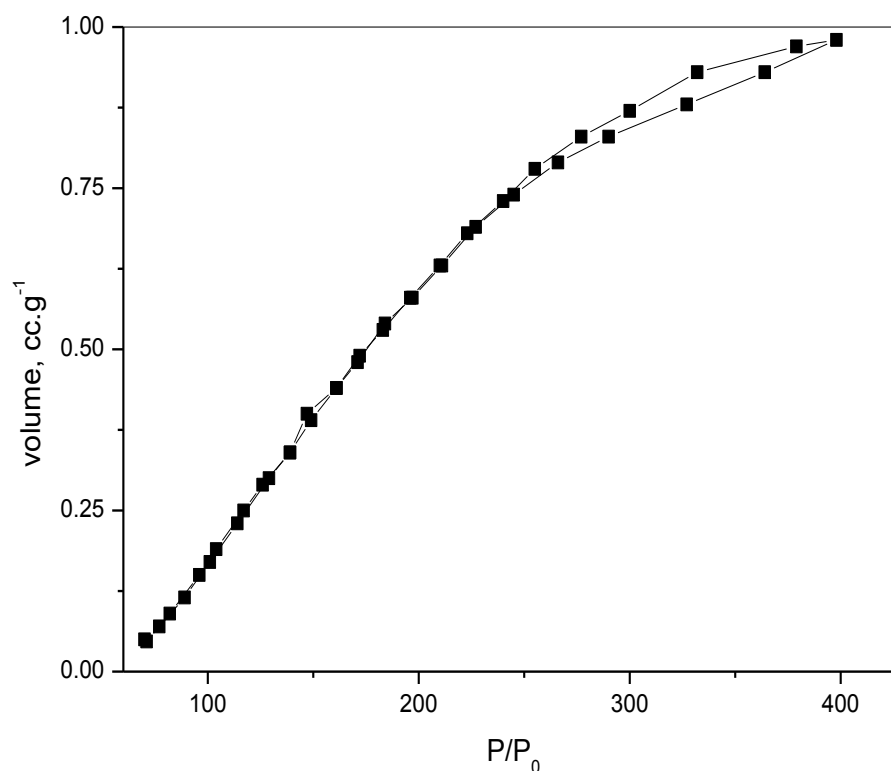


Figura 6. Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio da Alumina Al₂O₃.

5.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKAAG-NH₂.

O peptídeo foi sintetizado com sucesso por meio da síntese em fase sólida. O cromatograma analítico do peptídeo bruto obtido é apresentado na figura 7. A separação foi conduzida por cromatografia de fase reversa utilizando-se de uma Coluna semipreparativa Grace-Vydac (10 x 250 mm, 5 µm), fluxo a 3,0 mL min⁻¹ e detecção a 216 nm ou 280 nm. A fração majoritária (tempo de retenção de 46,6 minutos) corresponde ao produto esperado como se pode observar pelo espectro de massa obtido (figura 8) O produto esperado (M+H⁺ = 1324,8) corresponde ao pico mais intenso com seus respectivos adutos de Na⁺ e de K⁺. Esse dado é confirmado pela figura 9 que apresenta o espectro da fragmentação do produto (M+H⁺ = 1324,8) foi obtido e a sequência obtida corresponde ao peptídeo H-GILEAIKAIKAAG-NH₂

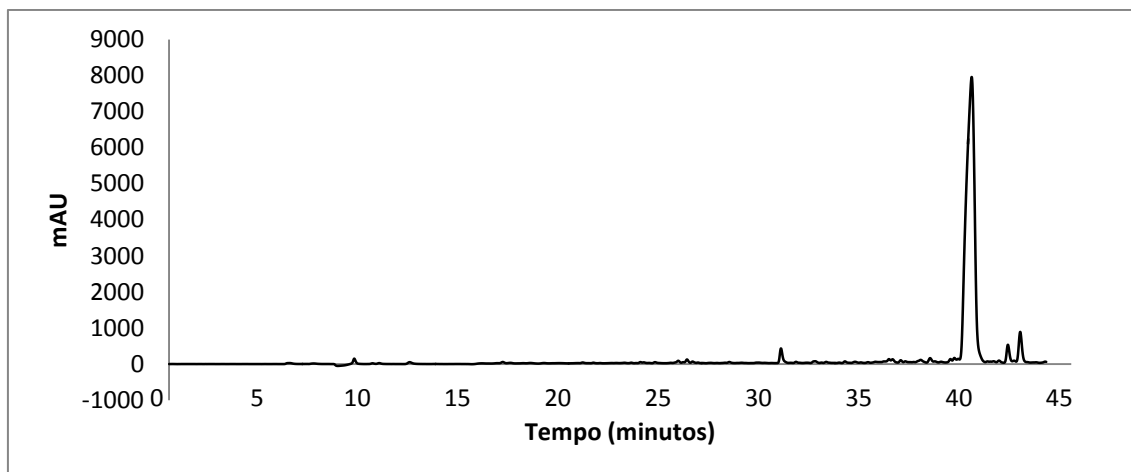


Figura 7 Cromatograma do peptídeo sintético bruto H-GILEAIKAIKAAG-NH₂. O produto de tempo de retenção próximo a 40 minutos corresponde ao peptídeo esperado. Condições analíticas: (10 x 250 mm, 5 μm). Fluxo a 3,0 mL.min⁻¹, detecção a 216 e 280 nm, temperatura ambiente. H₂O:ACN:TFA (95:5:0,1, v:v:v) durante 5 minutos, seguido de gradiente linear até H₂O:ACN:TFA (30:70:0,1, v:v:v) durante 65 minutos.

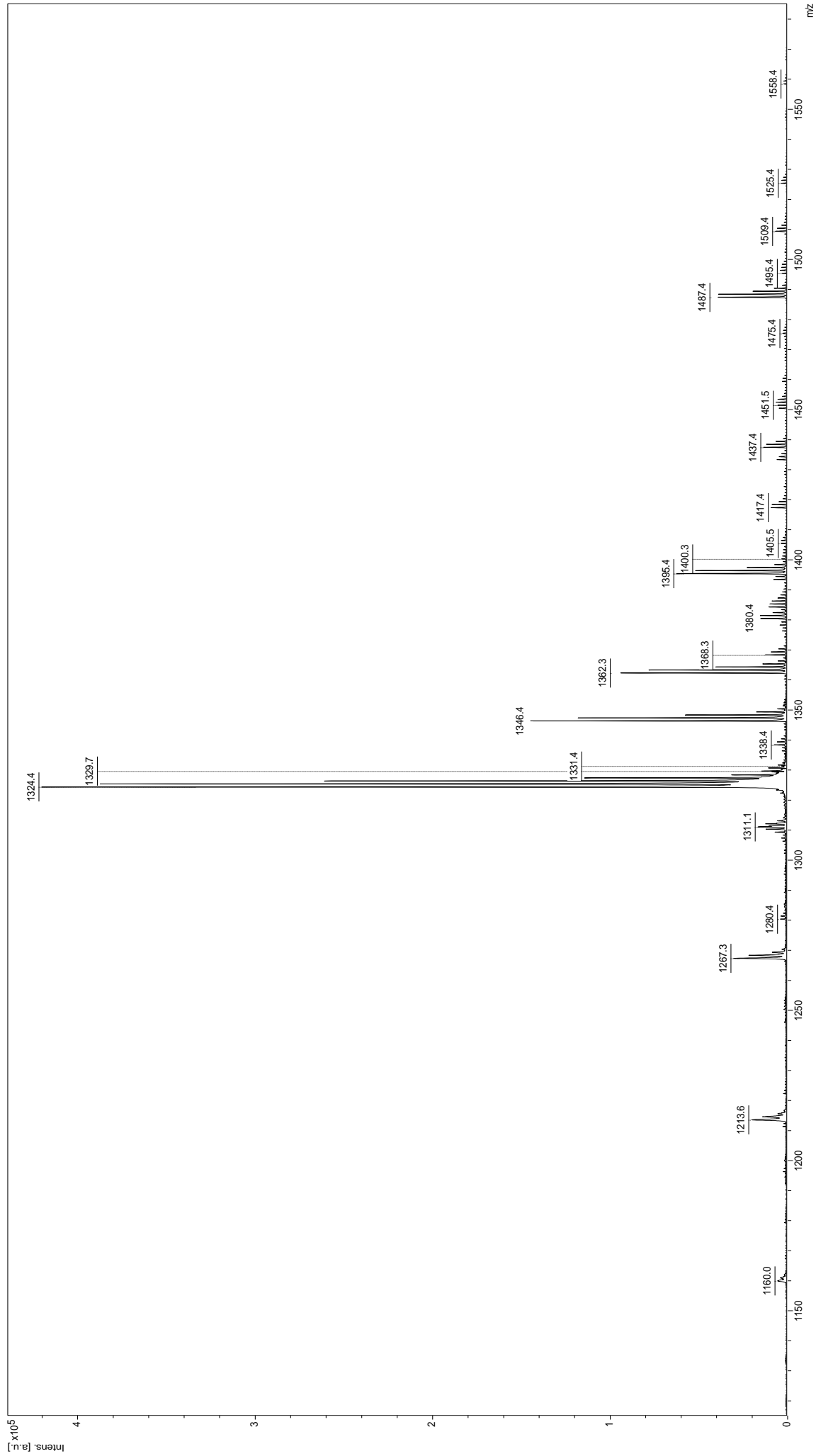


Figura 8 Espectro de massa (MALDI-ToF) do produto bruto H-GILEAIKAIKAAG-NH₂. O produto esperado (M+H⁺ = 1324,8) corresponde ao pico mais intenso; seus respectivos adutos e impurezas comuns na síntese de peptídeos em fase sólida correspondem aos picos de menor intensidade. Equipamento: Ultraflex (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA). Matriz: ácido a-ciano-4-hidroxicinâmico.

5.3. Quantificação do peptídeo HSP2 amidado

Os valores de absorvância obtidos após a diluição 1/20 do estoque estão discriminados abaixo:

λ	Absorbância
205	1,14
215	0,37
225	0,14

Desta forma, a solução estoque do peptídeo para os ensaios de atividade antimicrobiana foi determinada em $690 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($5,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)

5.4. Preparação da nanopartícula de alumina, derivatizações químicas e ligação do peptídeo H-GILEAIKAIKAIAKAAG-NH₂.

5.4.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a síntese das nanopartícula de alumina, uma amostra do material foi levada ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) modelo 10-11 da JEOL na Universidade de Brasília onde foi possível verificar suas dimensões e o tipo de organização (figuras 10 e 11).

Após as modificações das nanopartículas, novas imagens foram adquiridas utilizando o MET. As amostras de Al_2O_3 +APTES apresentaram um grau de agregação um pouco maior, dificultando a aquisição das imagens. As amostras de Al_2O_3 HSP2 apresentaram um grau de agregação tão intenso que as nanopartículas isoladas não foram observadas

Sabemos que pelo menos a reação de incorporação do APTES ocorre de maneira eficiente pois observamos que a partícula aminada reage com ninhidrina e liga-se a Fmoc-Ala-OH; desta forma, o aumento da agregação com o aumento da carga da partícula, após incorporação de amina e de peptídeo, não é esperado (figuras 12, 13, 14 e 15)

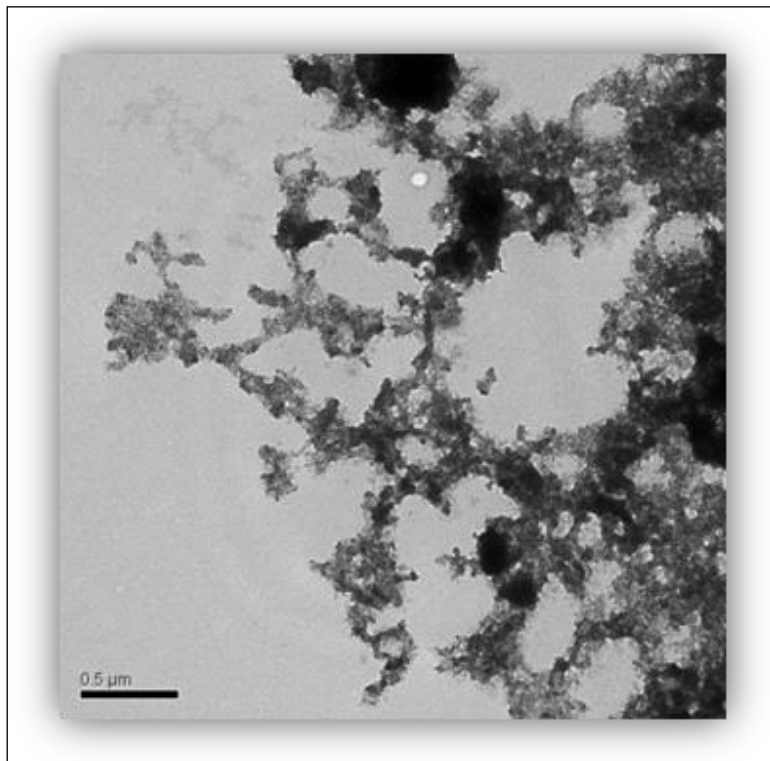


Figura 10 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de alumina. Arranjo micrométrico de nanopartículas de alumina. Aumento de 40.000 vezes.

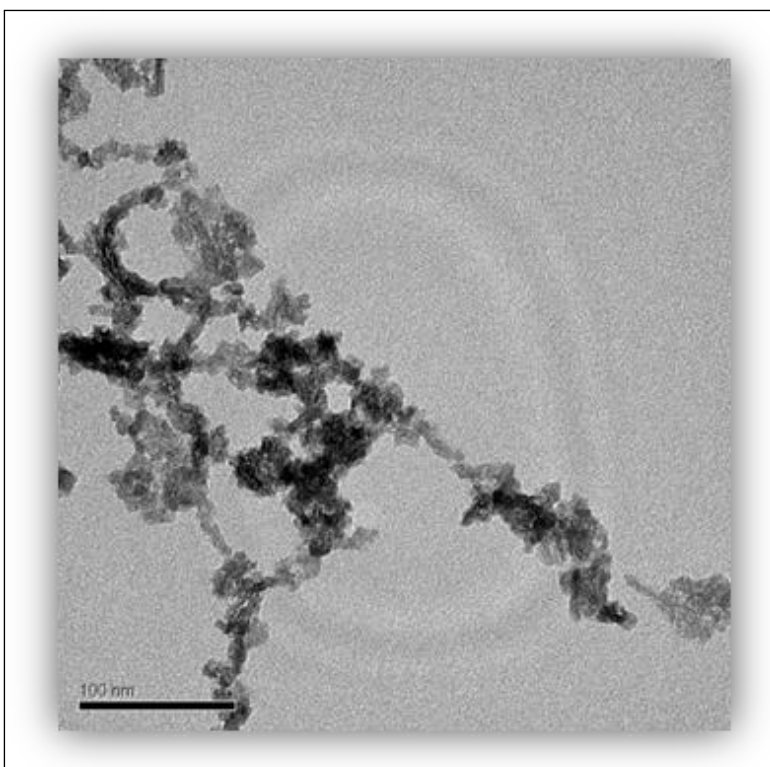


Figura 11 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de alumina. Arranjo nanométrico de nanopartículas de alumina. Organização em "cachos". Aumento de 300.000 vezes.

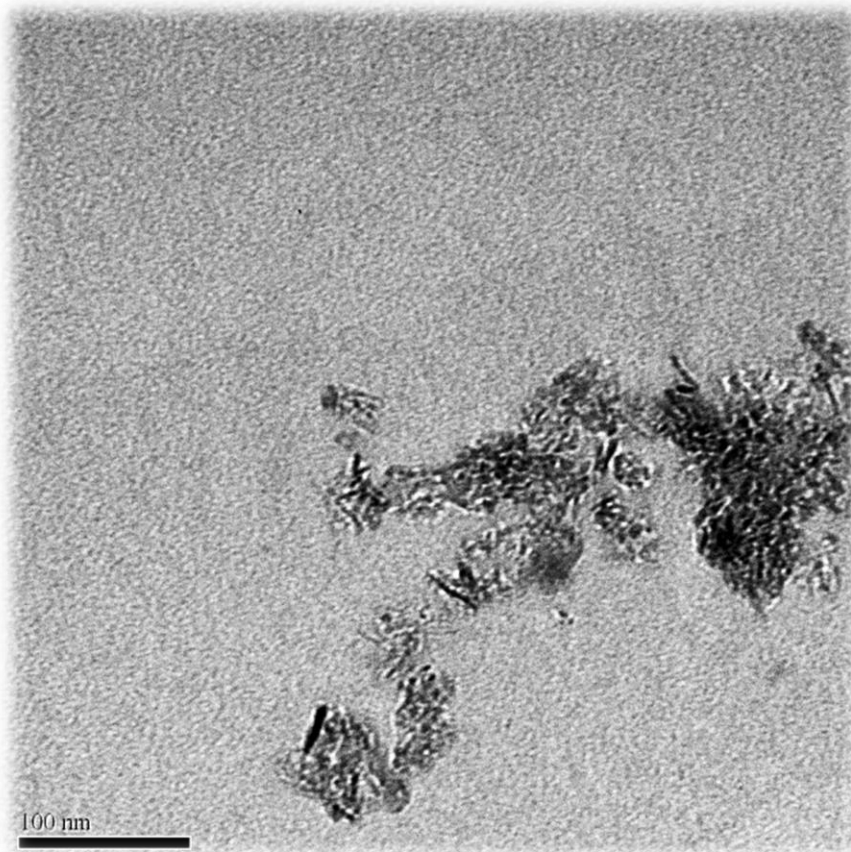


Figura 12 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de alumina modificada com APTES. Arranjo micrométrico em aumento de 250.000 vezes.

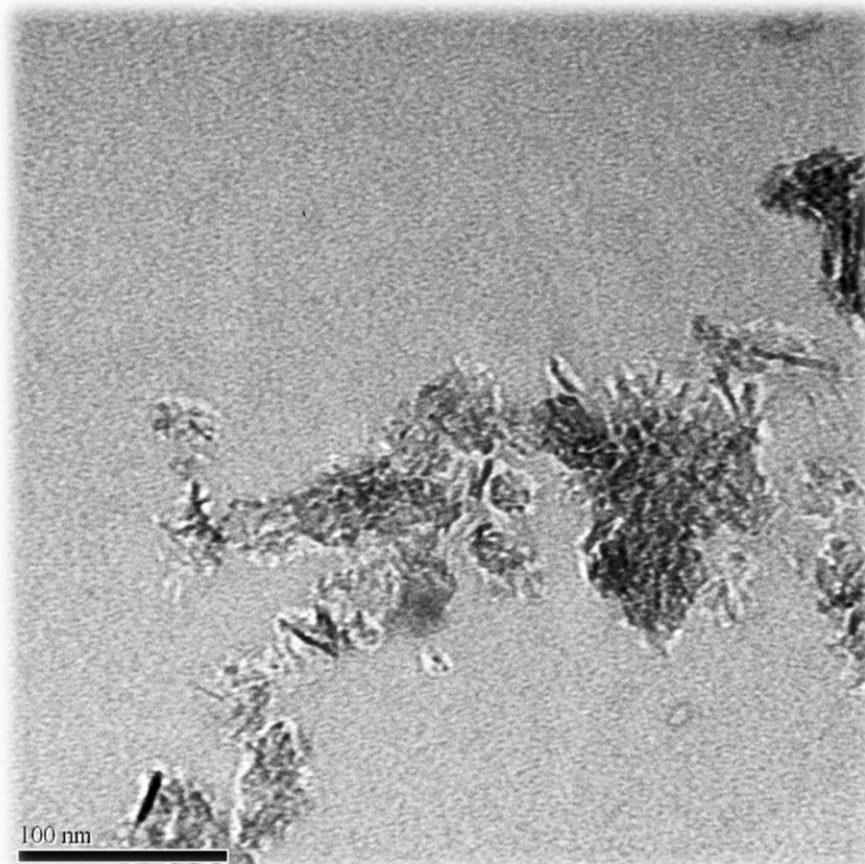


Figura 13 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de alumina modificada com APTES. Arranjo micrométrico em aumento de 300.000 vezes.

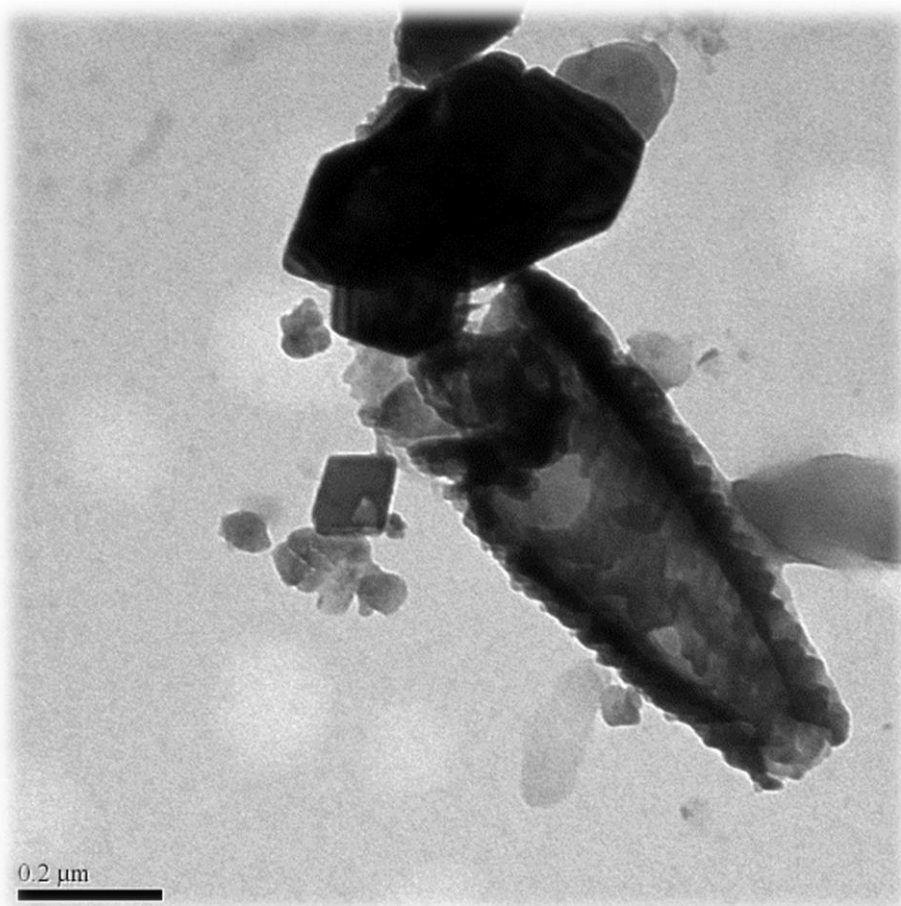


Figura 14 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de alumina modificadas e conjugadas ao HSP2. Arranjo nanométrico é indistinguível e a formação de aglomerados micrométricos é predominante. Aumento de 150.000 vezes.

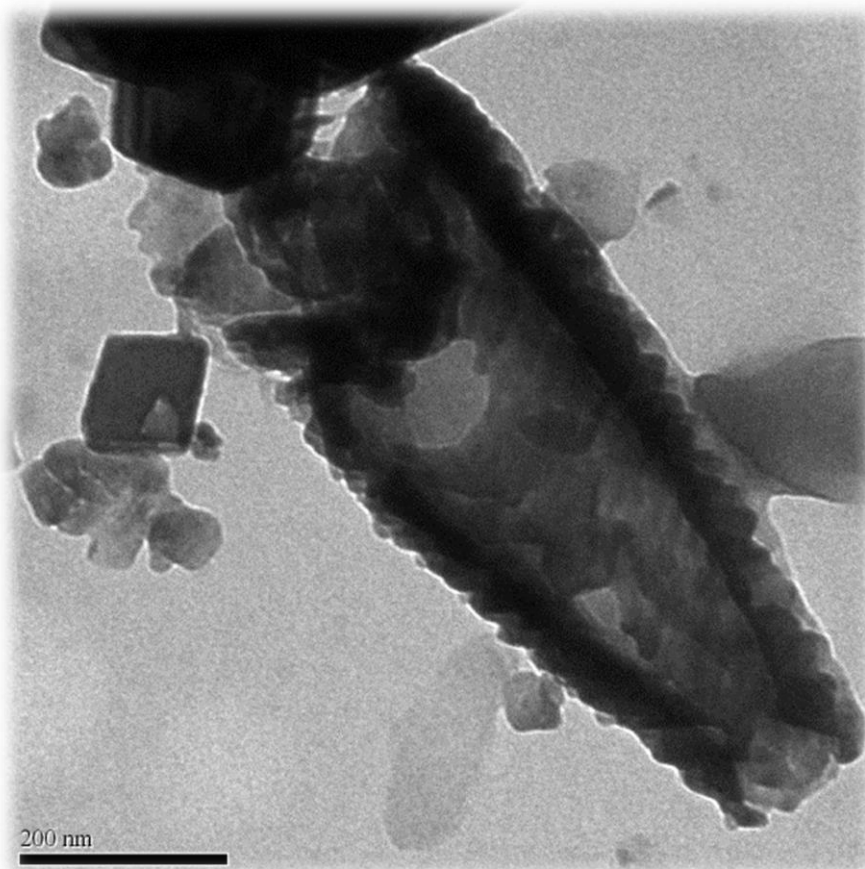


Figura 15 Micrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{HSP2}$. A formação de agregados devido às reações de acoplamento. Aumento de 300.000

5.4.2. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho

A análise por espectroscopia de infravermelho das amostras de nanopartícula de alumina mostrou com clareza a presença dos picos indicadores das diferentes coordenações do elemento Al da alumina (figura 16^a e 16b). A coordenação octaédrica é caracterizada por dois picos entre 500 e 750 cm^{-1} ; e a conformação tetraédrica é apresentada por um “ombro” próximo a 800 cm^{-1} e uma linha seguindo até 890 cm^{-1} . Os picos em 3458 e 1632 indicam as distorções sofridas pela ligação O-H (estiramento e torção) presente nas moléculas de água que estavam adsorvidas na amostra (POTDAR et al., 2007).

Os resultados apresentados na análise por espectroscopia de infravermelho da amostra de alumina, das amostras de nanopartículas após as reações de modificação superficial com APTES e após a ligação com o peptídeo sintético HSP2, não apresentaram as bandas características da presença de ligação peptídica (Figuras 17 e 18). Esse comportamento pode ser justificado pela alta absorção das bandas da alumina. As moléculas de peptídeos ligadas na superfície estão presente em uma relação muito menor que as regiões inorgânicas de alumina e absorbância do peptídeo pode estar sendo mascarada pela da alumina. Técnicas mais sofisticadas, como a espectroscopia de infravermelho com reflexão totalmente atenuada ou análises de aminoácidos poderiam resolver esse problema. Essas metodologias deverão ser testadas futuramente.

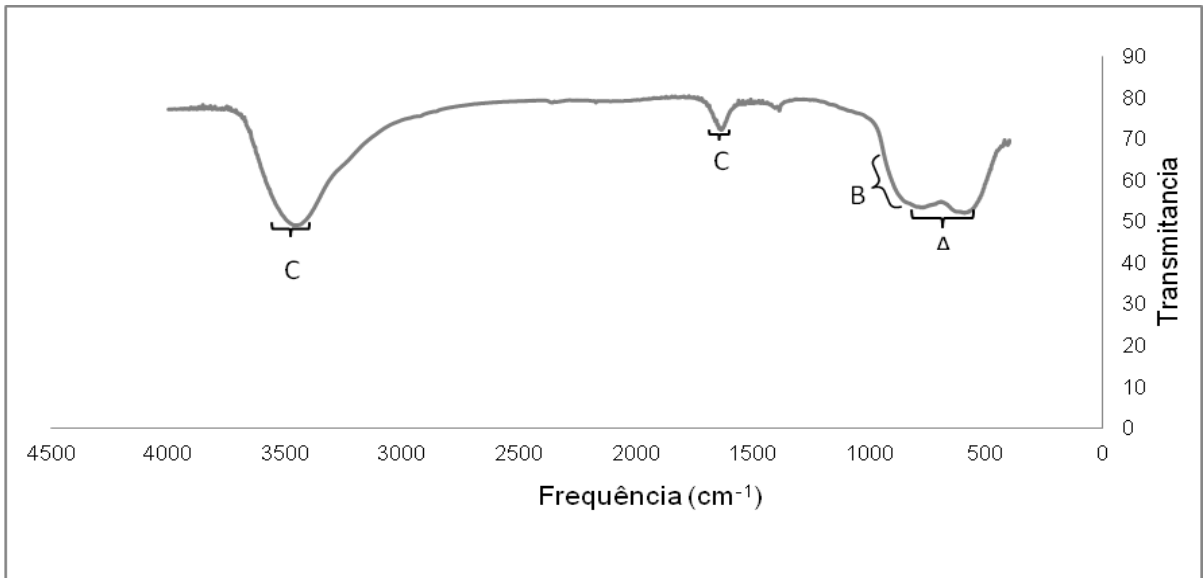


Figura 16a. Espectro de Infravermelho - Al₂O₃. (A) 590 – 750 cm⁻¹; (B) 800-890 cm⁻¹ e (C) 1632 cm⁻¹ e 3458 cm⁻¹. Espectrômetro modelo 640-IR (FT-IR) da Varian.

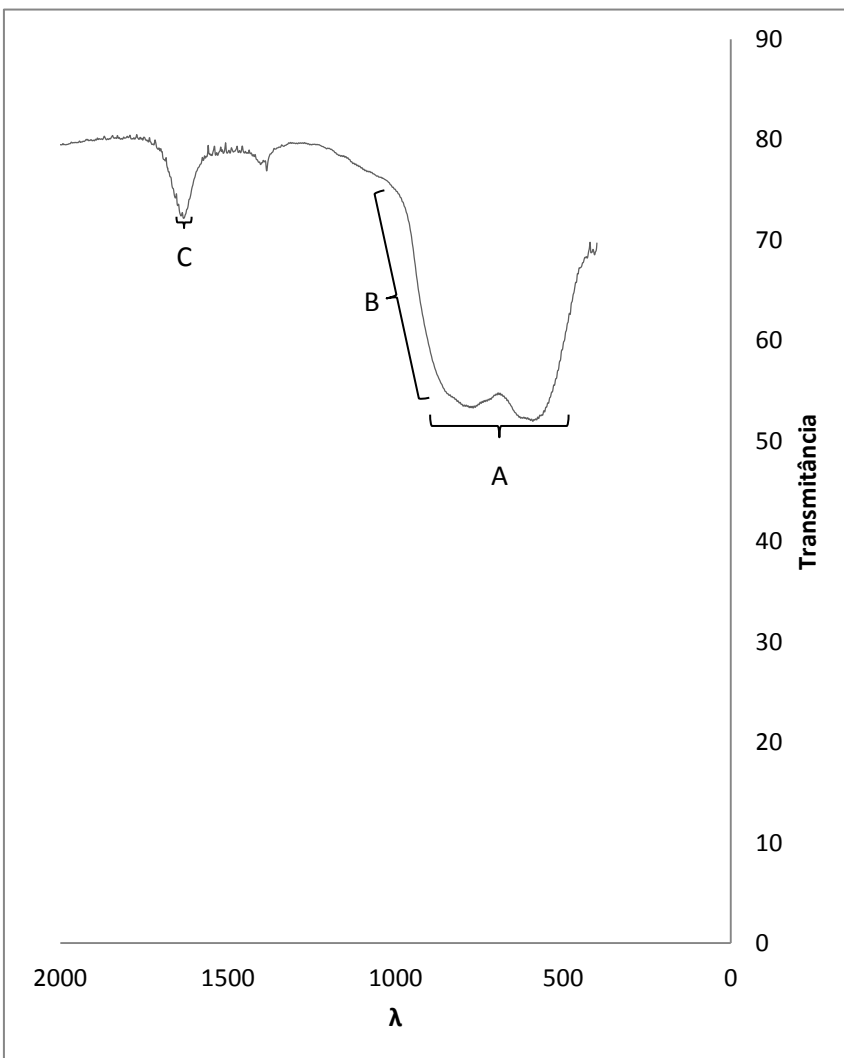


Figura 16b. Em detalhe, a inflexão no ponto marcado com B. Espectro de Infravermelho - Al₂O₃. (A) 590 – 750 cm⁻¹; (B) 800-890 cm⁻¹ e (C) 1632 cm⁻¹

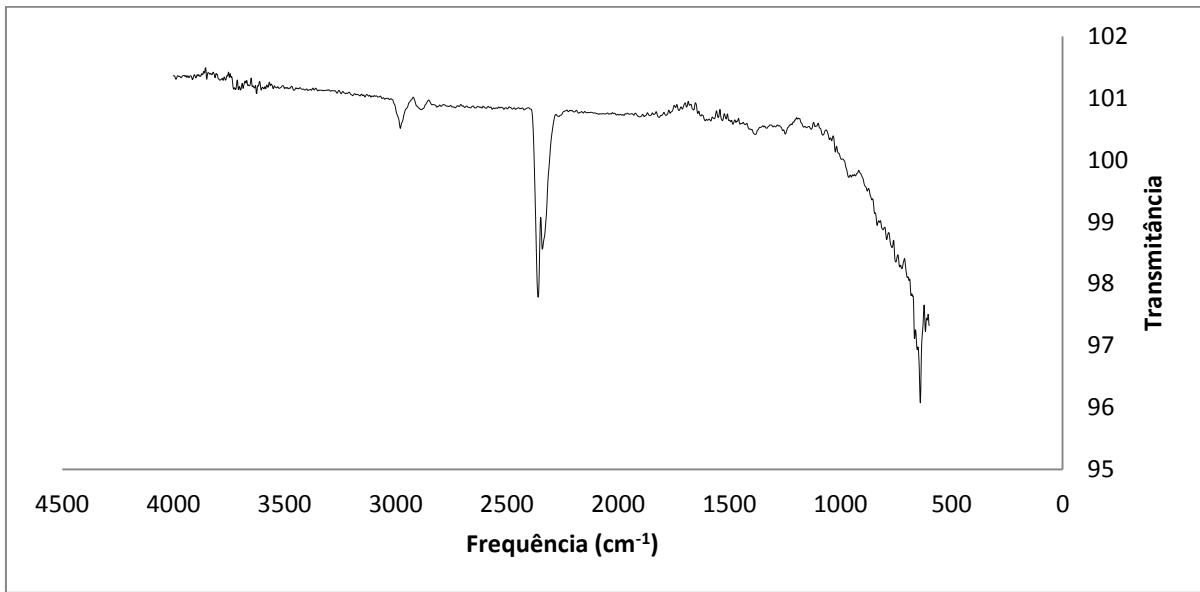


Figura 17 Espectro de Infravermelho - Al₂O₃+APTES. Espectrômetro modelo 640-IR (FT-IR) da Varian.

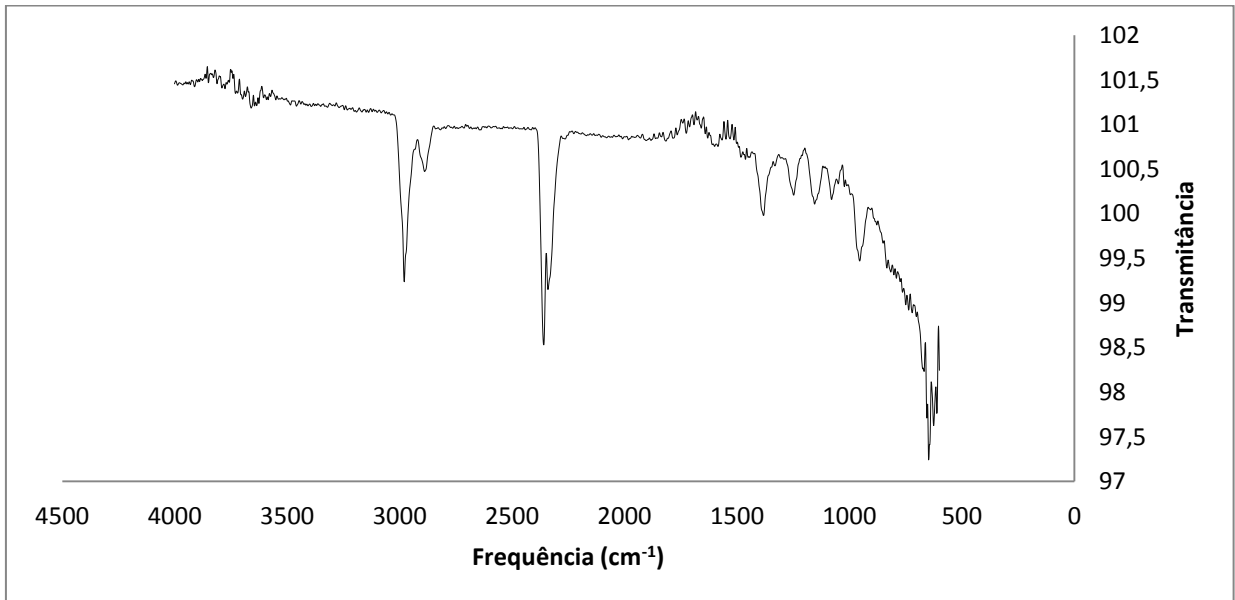


Figura 18 Espectro de Infravermelho - Al₂O₃HSP2. Espectrômetro modelo 640-IR (FT-IR) da Varian.

5.5. Ensaios de atividade antimicrobiana do peptídeo HSP2 amidado, da nanopartícula de alumina e da nanopartícula de alumina aminada.

O ensaio tradicional de crescimento microbiano baseado em turbidimetria por leitura da absorvância em 595-600 nm não é eficaz para analisar nanoestruturas contendo alumina já que as nanopartículas interferem na transmissão da radiação eletromagnética através da amostra causando espalhamento de luz e dificultando a interpretação dos dados. As figuras 19 e 20 comparam os resultados do ensaio por turbidimetria conduzido para o peptídeo sintético HSP2 e para a nanopartícula de alumina (i.e. antes da reação de derivatização com (3-aminopropil)-trietoxissilano). As leituras realizadas na presença de alumina foram erráticas e não forneceram informações claras sobre a viabilidade celular dos microorganismos na presença das nanopartículas. Já o ensaio antimicrobiano do peptídeo sintético HSP2 resultou na determinação da concentração mínima inibitória (MIC) do peptídeo. Pela análise dos dados, o MIC ficou estabelecido em $68 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Prates *et al.* (2004) encontraram MIC de $24,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o peptídeo sintético análogo ao HSP2, o HSP1, extraído e purificado a partir da secreção da pele do anfíbio *Hypsiboas punctata*.

É importante salientar que o crescimento celular ocorreu a uma taxa anormalmente baixa em ambos os ensaios (a absorvância final ficou abaixo do esperado), mas isso não impediu a observação do efeito da concentração do peptídeo HSP2 sobre a cultura de bactérias.

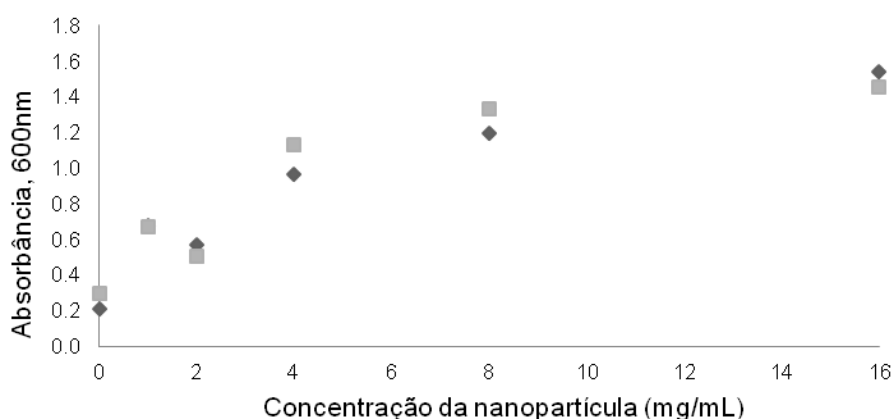


Figura 19 Curva de crescimento apresentada em cultura de *E. coli* na presença de diferentes concentrações de nanopartículas de alumina após 13 horas de incubação.

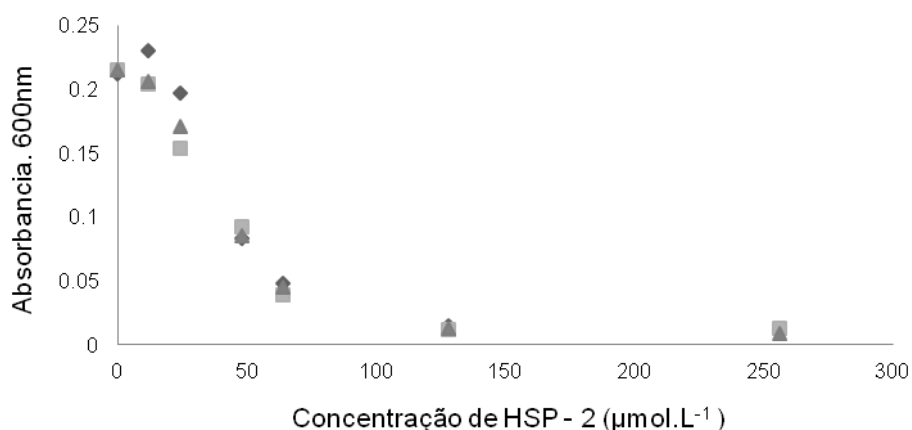


Figura 20 Curva de crescimento apresentada em cultura de *Escherichia coli* na presença de diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano HSP 2 após 13 horas de incubação.

Após a realização do teste de viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico, percebeu-se que os resultados obtidos tanto no ensaio de crescimento microbiano com o HSP2 como a leitura do ensaio colorimétrico eram equivalentes em todos os pontos (figura 21) enquanto as leituras referentes aos ensaios com nanopartícula apresentaram resultados destoantes (figura 22). Enquanto no ensaio de crescimento microbiano o aumento da quantidade de nanopartícula em suspensão levava ao aumento da absorbância, o ensaio colorimétrico mostrou o oposto: o aumento na concentração de nanopartícula inviabiliza a divisão celular da cultura de *Escherichia coli* e reduz a geração do formazan que é indicador de metabolismo celular (MOSSMAN, 1983, KUHN *et al*, 2003).

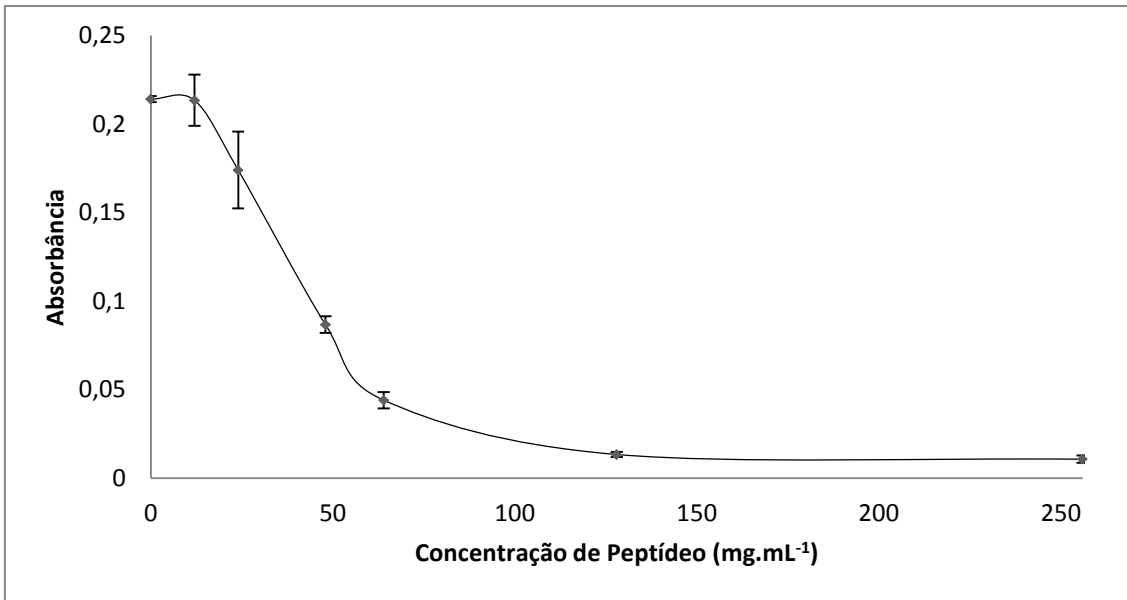


Figura 21 Ensaio de crescimento microbiano por turbidimetria do HSP2 em meio de cultura Mueller-Hinton na presença da bactéria gram negativa *Escherichia coli*. A concentração mínima inibitória (MIC) de crescimento é de aproximadamente 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

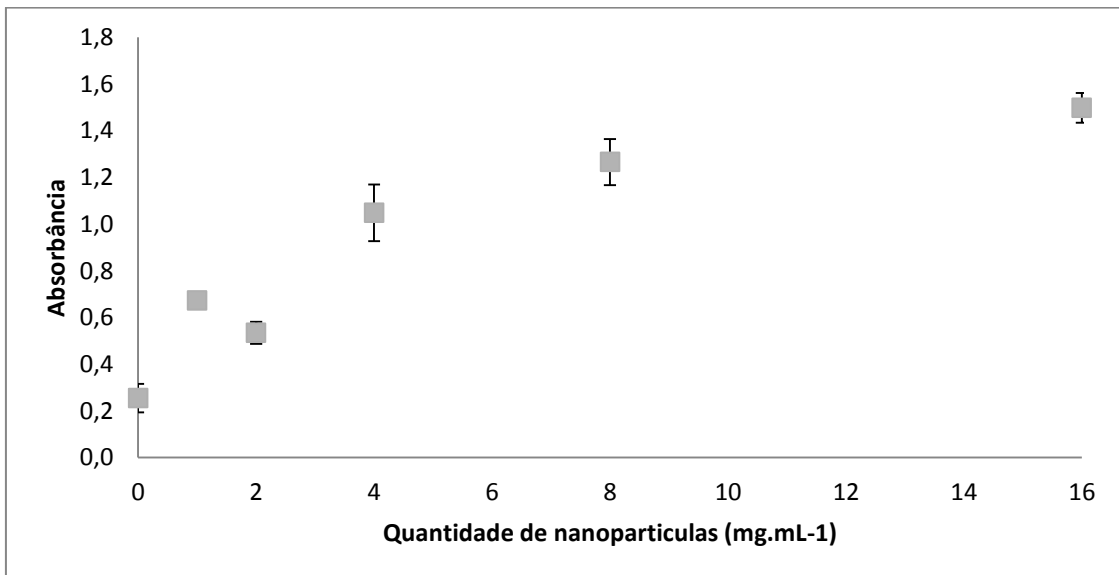


Figura 22 Leitura de absorbância do ensaio por turbidimetria para as nanopartículas de alumina em suspensão em meio de cultura Mueller-Hinton

5.6. Avaliação do potencial do ensaio colorimétrico como teste de viabilidade celular na presença de nanopartículas

O ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico pode sanar alguns problemas apresentados quando se utiliza somente o ensaio por turbidimetria, entretanto, devido à alta taxa de divisão celular que a bactéria *E. coli* apresenta, sua atividade metabólica, ao final do ensaio colorimétrico, acaba extrapolando a capacidade de leitura do espectrofotômetro e impede a correlação entre a produção de formazan e a viabilidade celular. Sendo assim, realizou-se uma curva de crescimento bacteriano de oito horas em condições favoráveis para que se pudesse estabelecer qual é a quantidade de bactérias em suspensão necessária para efetuar a leitura do ensaio de maneira eficaz. Os resultados destas leituras são vistos no gráfico abaixo:

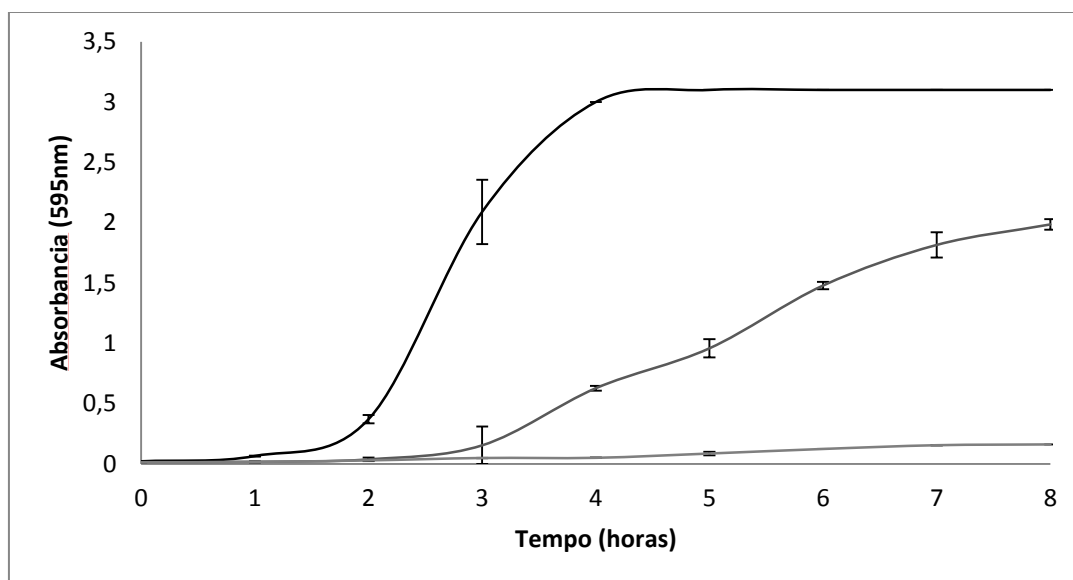


Figura 23 Crescimento bacteriano de *Escherichia coli* após incubação de oito horas a partir de quantidades diferentes de células/mL iniciais - $1,5 \times 10^5$, (em preto) $1,5 \times 10^4$ (em cinza) e $1,5 \times 10^3$ (em cinza claro). As curvas são referentes à produção de formazan após a interação das células com MTT por três horas. Foram coletadas amostras a intervalos de um hora.

Baseando-se nos resultados obtidos, os ensaios colorimétricos passaram a ser conduzidos após a diluição da suspensão bacteriana a $1,5 \times$

10⁵ em dez vezes para que as leituras de absorvância estivessem em uma escala interpretável, já que, em meio de cultura Mueller-Hinton, a partir de quatro horas de incubação não era mais possível determinar se havia ou não divisão celular, pois a atividade metabólica celular era suficiente para extrapolar a capacidade de leitura do método de absorção de luz.

5.7. Ensaio de atividade antimicrobiana e ensaio de viabilidade celular na presença de nanopartículas de alumina (Al₂O₃), nanopartículas de alumina aminada (Al₂O₃NH₂) e nanopartículas de alumina modificadas com o HSP2

O MTT é reduzido em formazan em células funcionais e metabolicamente ativas, nas quais a redução do NADH e do NADPH (o NADH e o NADPH já são as formas reduzidas dos cofatores de desidrogenases) é catalisada por enzimas óxido-redutoras que transferem elétron para o MTT levando a produção de formazan (N'-anilino-N[4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il]imino]benzenocarboxiimidamida), um composto lilás e insolúvel. Em casos em que não há a produção de formazan, simplesmente não há fluxo de energia ou metabolismo (BERRIDGE *et al.*, 2005).

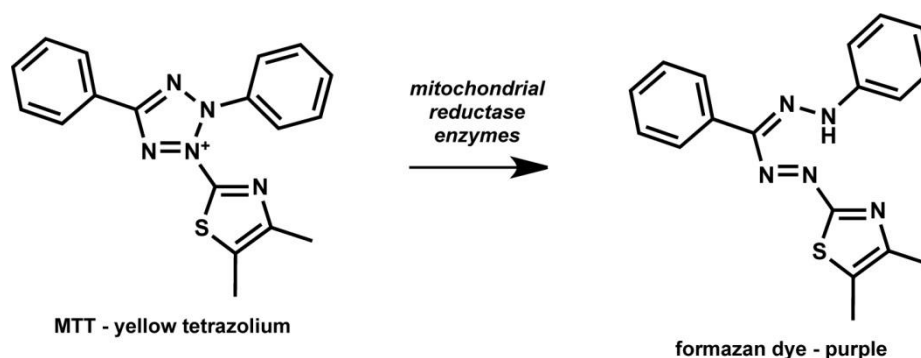


Figura 24 Esquema básico de atuação do MTT 2-(3,5-difeniltetrazolium-2-il)-4,5-dimetil-1,3-tiazola) em contato com células animais metabolicamente ativas.

Após definida a forma metodológica que seria seguida, os ensaios antimicrobianos para averiguar o potencial das nanopartículas foram realizados

com os três tipos de nanoestruturas obtidas: nanopartículas de alumina, as nanopartículas de alumina aminada com (3-aminopropil)triétoxissilano e as nanopartículas ligadas covalentemente ao HSP2. Os resultados referentes ao crescimento bacteriano na presença destas estruturas estão representados nas figuras 25a, 25b, 26a e 26b.

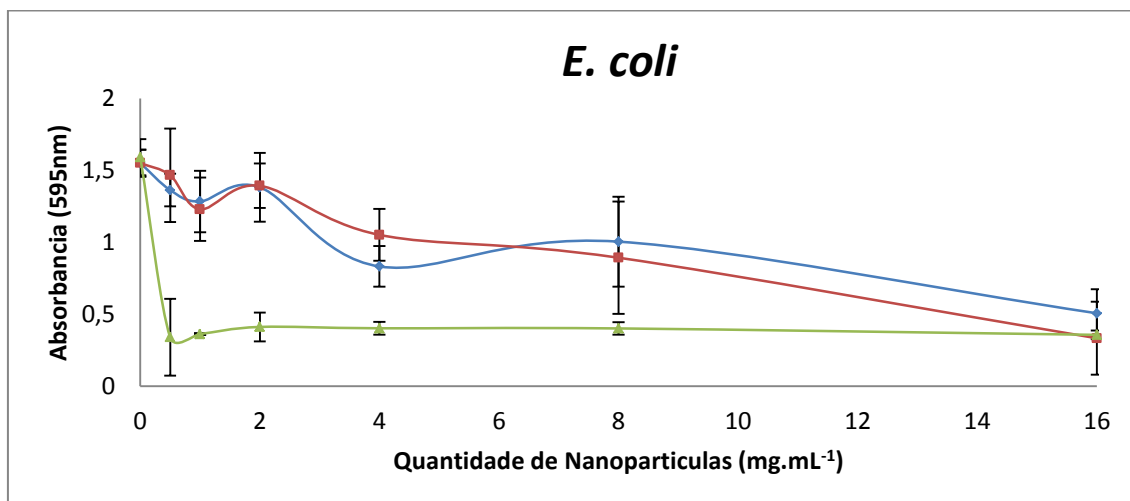


Figura 25a Resultado do teste de viabilidade celular por meio de monitoramento de redução de MTT. Variações referentes às leituras de absorbância em cultura de *E. coli* na presença de nanopartículas de alumina e nanopartículas de alumina aminada (Al_2O_3 em azul e $Al_2O_3NH_2$ em vermelho e Al_2O_3HSP2 em verde).

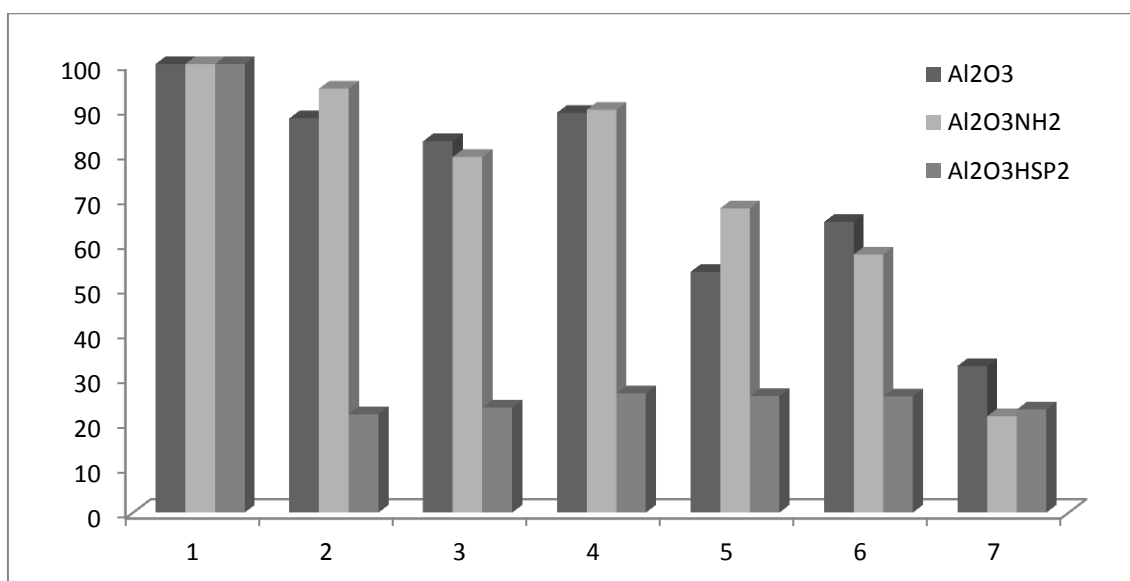


Figura 25b Variações referentes às leituras de absorbância em cultura de *Escherichia coli* na presença de nanopartículas de alumina, nanopartículas de alumina aminada e nanopartículas

modificadas com o HSP2. Os valores representados no eixo Y correspondem a absorbância máxima em porcentagem ao final dos ensaios e os valores no eixo X representam o aumento da quantidade de nanopartículas em suspensão nos ensaios (1=0 mg.mL⁻¹; 2=0,50 mg.mL⁻¹; 3=10 mg.mL⁻¹; 4=20 mg.mL⁻¹; 5=40 mg.mL⁻¹; 6=80 mg.mL⁻¹ e 7=160 mg.mL⁻¹)

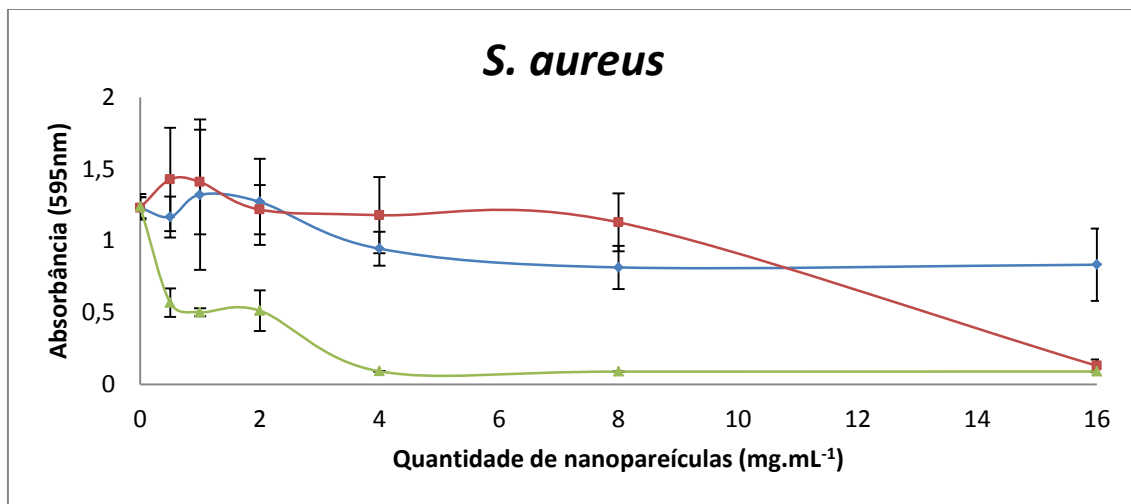


Figura 26a Resultado do teste de viabilidade celular por meio de monitoramento de redução de MTT. Variações referentes às leituras de absorbância em cultura de *S. aureus* na presença de nanopartículas de alumina e nanopartículas de alumina aminada (Al_2O_3 em azul e $Al_2O_3NH_2$ em vermelho e Al_2O_3HSP2 em verde).

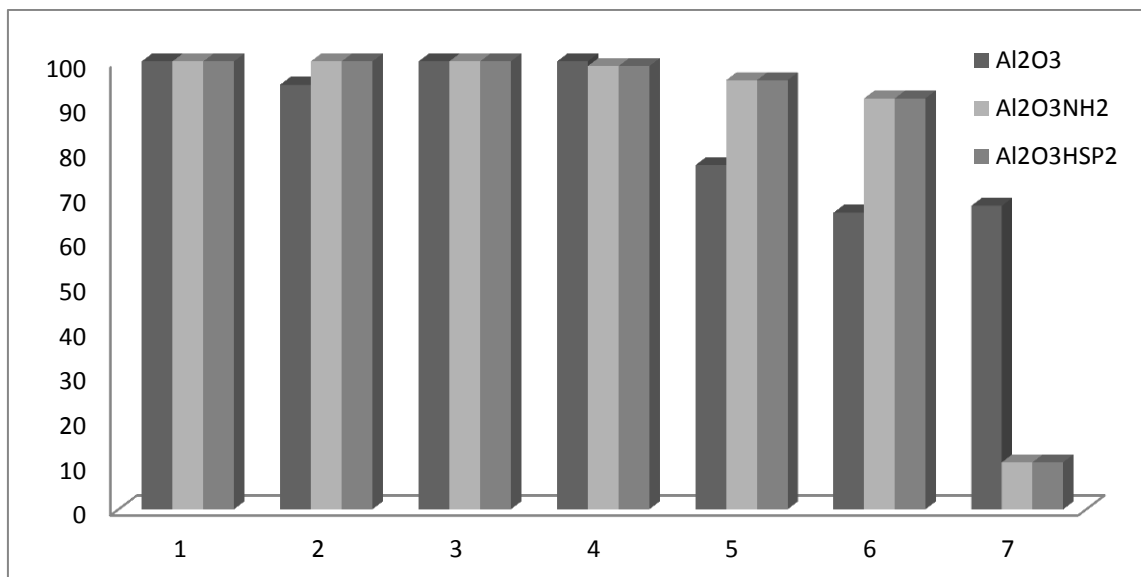


Figura 26b Variações referentes às leituras de absorbância em cultura de *Staphylococcus aureus* na presença de nanopartículas de alumina, nanopartículas de alumina aminada e nanopartículas modificadas com o HSP2. Os valores representados no eixo Y correspondem a absorbância máxima em porcentagem ao final dos ensaios e os valores no eixo X representam o aumento da quantidade de nanopartículas em suspensão nos ensaios (1=0 mg.mL⁻¹; 2=0,50 mg.mL⁻¹; 3=10 mg.mL⁻¹; 4=20 mg.mL⁻¹; 5=40 mg.mL⁻¹; 6=80 mg.mL⁻¹ e 7=160 mg.mL⁻¹)

A faixa de ação da nanopartícula foi restrita às quantidades em suspensão de 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg.mL⁻¹. Em estudos preliminares tinha-se observado que somente a nanopartícula aminada a 2mg.mL⁻¹ apresentava por si só ação antimicrobiana, mas conforme os ensaios eram replicados, esse resultado não foi confirmado. O resultado final mostra que as nanopartículas aminadas em culturas de *Staphylococcus aureus* em quantidade de 16mg.mL⁻¹ apresentaram atividade antimicrobiana, mas em outras concentrações e nos ensaios realizados com *Escherichia coli* não houve efeito semelhante.

Quando o peptídeo HSP2 foi ligado covalentemente a nanopartícula de alumina o que foi observado foi uma redução drástica na concentração das células bacterianas, indicando um potencial antimicrobiano não observado até então para a nanoestrutura híbrida.

6. CONCLUSÕES

A síntese da nanopartículas pelo método proposto por POTDAR *et. al* (2007) é eficiente e permite a produção de nanomaterial em tamanho semelhante e organizados na forma de pequenos cachos com nanopartículas em formato de elipses.

A síntese de peptídeo em fase sólida foi realizada com sucesso e o ensaio de avaliação do potencial antimicrobiano do HSP2 confirmou seu potencial antimicrobiano.

Não foi possível caracterizar com clareza as nanoestruturas após as modificações realizadas para a conjugação das nanopartículas com o peptídeo apesar de, durante os ensaios de viabilidade celular, estas nanoestruturas apresentarem resultados relativamente significativos de atividade antibacteriana.

O ensaio colorimétrico utilizado como forma de determinação da atividade celular na presença de nanopartículas foi satisfatório e permite a identificação e diferenciação de culturas metabolicamente ativas daquelas não ativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, Wataru; UEDA, Mitsuyoshi. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 8, p. 1055-1081, agosto 2013.
- APPENDINI, Paola; HOTCHKISS, Joseph H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 3 n. 2 p. 113-126, junho 2002.
- ARAUJO, Emiliane A., **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese**. Viçosa, MG, 2010.
- BADOSA, Esther; FERRE, Rafael; PLANAS, Marta; BESALÚ, Emili; CABREFIGA, Jordi; BARDAJI, Eduard; MONTESINOS, Emilio. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. **Peptides**, Amsterdam, v. 28, n. 12, p. 2276-2285, dezembro 2007.
- BARTON, Thomas J.; BULL, Lucy M.; KLEMPERER, Walter G.; LOY, Douglas A.; MCENANEY, Brian; MISOSNO, Makoto; MONSON, Peter A.; PEZ, Guido; SCHERER, George W.; VARTULI, James C.; YAGHI, Omar M. Tailored porous materials. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 11, n. 10, p. 2633-2656, outubro 1999.
- BELLANTONE, Maria.; WILLIAMS, Huw D.; HENCH, Larry L. Broad-spectrum bacterial activity of Ag₂O-doped bioactive glass. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 46, p. 1940-1945, junho 2002.
- BECHINGER, Burkhard. Rationalizing the membrane interactions of cationic amphipathic antimicrobial peptides by their molecular shape. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 349-355, outubro 2009.
- BECHINGER, Burkhard; LOHNER, Karl. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, v. 9, p. 1529-1539, setembro 2006.
- BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patricia M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, Amsterdam, v. 11, p. 127-152, setembro 2005.
- BHARGAVA, Apurva; OSUSKY, Milan; HANCOCK, Robert E. W.; FORWARD, Benjamin S.; KAY, William W.; MISRA, Santosh. Antiviral Indolicidin variant peptides: Evaluation for broad spectrum disease resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, n. 3, p. 515-523, março 2007.

- BRANDELLI, Adriano. Nanostructures as promising tools for delievery of antimicrobial peptides. **Mini Reviews in Medicinal Chemistrty**, Sharjah, v. 12, n. 8, p. 731-741, julho 2012.
- BURDA, Clemens; CHEN, Xiaobo; NARAYANAN, Radha; EL-SAYED, Mostafa A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 4 p. 1025-1102, março 2005.
- BYRNE, J. M.; ELLING, N. D. T.; COKER, V. S.; PATTRICK, R. A. D.; LAAN, G. V. D.; ARENHOLZ, G. E; TUNA, G.; LLOYD, J. R. Control of nanoparticle size, reactivity and magnetic properties during the bioproduction of magnetite by *Geobacter sulfurreducens*. **Nanotechnology**, Filadelfia, v. 22, n. 45, novembro 2011.
- CAMPBELL, Fallyn W., COMPTON, Richard G., The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v. 396, n. 1, p. 241-259, janeiro 2010.
- CHAN Weng C.; WHITE, Peter D. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, 2000.
- CHAUBE, V. D.; SHYLESH, Sankaranarayanapillai P.; SINGH, Anand P Synthesis, characterization and catalytic activity of Mn(III)- and Co(II)-salen complexes immobilized mesoporous alumina. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 241, n. 1-2, p. 79-87, novembro 2005.
- DOMINGUES, Tatiana M.; MATTEI, Bruno; SEELIG, Joachim; PEREZ, Katia R.; MIRANDA, Antônio; RISKE, Karin A. Interaction of the antimicrobial peptide Gomesin with model membranes: A calorimetric study. **Langmuir**, Washington, v. 29, n. 27, p. 8609-8618, julho 2013.
- EL HAMZAOUI, Hicham; COURTHÉOUX, Laurence; NGUYEN, Vn; Berrier, Elise; Favre, A; Bigot, Laurent; BOUZAOUi, Mohamed; CAPOEN, Bruno. From porus silica to bulk optical glasses: The control of densification. **Materials Chemistry and Physics**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2 p. 83-88, maio 2010.
- FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, dezembro 2000.
- FIELDS, Gregg B.; NOBLE, Richard L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 35, n. 3, março 1990.

- GOPALAKRISHNAN, Jagannatha. Chemistry douce approaches to the synthesis of metastable oxide materials. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 7, n. 7, p. 1265-1275, julho 1995.
- HARTGERINK, Jeffrey D.; BENIASH, Elia; STUPP, Samuel I. Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 8, p. 5133-5138, abril 2002.
- HOFFMANN, Frank; CORNELIUS, Maximiliab; MORELL, Jürgen; FRÖBA, Michael. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie International Edition**, Chichester, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, maio 2006.
- HUGHES, Diarmaid; ANDERSSON, Dan I. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 555-560, outubro 2012.
- KIM, Jeonghwan; VAN DER BRUGGEN, Bart V. The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: Review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. **Environmental Pollution**, Leuven, v.158, n. 7, p. 2335-2349, Julho 2010.
- KNOPP, Dietmar, TANG Dianping; NIESSNER, Reinhard. Review: Bioanalyticam applications of biomoleculc-funcionalized nanometer-sized doped silica particles. **Analytica Chimia Acta**, Amsterdam, v. 647, n. 1 p. 14-30, agosto 2009.
- KRUK, Michal; JARONIEC, Mietek; SAYARI, Abdelhamíd. Application of large pore MCM-41 molecular sieves to improve pore size analysis using nitrogen adsorption measurements. **Langmuir**, Washington, v. 13, n. 23, p. 6267-6273, novembro 1997.
- KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 506-508, janeiro 2003.
- LEARY SWAN, Erin E.; POPAT, Ketul C.; DESAI, Tejal A. Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. **Biomaterials**, Amsteram, v. 26, n. 14, p. 1969-1976, maio 2005.
- LI, Quilin; MAHENDRA, Shaily LYON, Delin Y. BRUNET Lena; LIGA, Michael V.; LI, Dong, ALVAREZ, Pedro J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, Amsterdam. 42, n. 18, p. 459-4602, novembro 2008.
- LIU, Lihong; XU, Kaijin; WANG, Huaying; TAN, Jeremy; FAN, Weimin; VENKATRAMAN, Subbu S.; LI, Lanjuan; YANG, Yi-Yan. Self-assembled

cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. **Nature Nanotechnology**, London, v. 4, n. 7, p. 457-463, julho 2009.

MOHANTY, Soumitra; JENA, Prajna; MEHTA, Ranjit ; PATI, Rashmirekha; BANERJEE, Birendranath; PATIL, Satish; SONAWANE, Avinash. Cationic antimicrobial peptides and biogenic silver nanoparticles kill mycobacteria without eliciting DNA damage and cytotoxicity in mouse macrophages *Antimicrob. Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Washington, v. 50, n. 1, p. 475-512, maio 2013.

MONTESINOS, Emilio. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 270, n. 1 p. 1-11, maio 2007.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Palo Alto, v. 65, n. 1-2, pp. 55-63, dezembro 1983.

MURPHY, Joseph B.; KIES, Marian W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 45, C, p. 382-384, 1960.

NAKAMURA, Michihiro; ISHIMURA, Kazunori. Synthesis and characterization of organosilica nanoparticles prepared from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane as the single silica source. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 111, n. 51, p. 18892-18898, dezembro 2007.

PANYAM, Jayanth; LABHASETWAR Vinod. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue **Advanced Drug Delivery Reviews** Washington, v. 64, p. 61-71, dezembro 2012.

POTDAR Haru S.; JUN, Ki-Wo; BAE Jong Wook; KIM Seung-Moon; LEE Jo Lee. Synthesis of nano-sized porous γ -alumina powder via a precipitation/digestion route. **Applied Catalysis A: General**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 109-116, abril 2007.

PRATES, Maura V., SFORÇA, Mauricio L., REGIS, B. C. William, LEITE, José R. S. A., SILVA, Luciano P., PERTINHEZ, Thelma A., ARAÚJO, Antônio L. T., AZEVEDO, Ricardo B., SPISNI, Alberto, BLOCH, Carlos Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 279, n. 13, p. 13018 -13026, março 2004.

RAI, Mahendra; YADAV, Alka; GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 76-83, janeiro-fevereiro, 2009.

- SADIQ, Mohammed I.; CHOWDHURY, Basudey; CHANDRASEKARAN, Nataraian; MUKHERIEE, Amitava. Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and Medicine**, Amsterdam, v. 5 p. 282-286, setembro 2009.
- SAPSFORD, Kim E.; ALGAR, W. Russ; BERTI, Lorenzo; GEMMILL, Kelly B.; CASEY, Brendan J.; OH, Eunkeu; STEWART, Michael H.; MEDINTZ, Igor L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. **Chemical Reviews**, Washington, v. 13, n. 13, p. 1904-2074, março 2013
- SCHMITT, Johannes; DECHER, Gero; DRESSICK, Walter J.; BRANDOW, Susan L.; GEER, Robert E.; SHASHIDHAR, Raanganathan N.; Calvert, J. M. Metal nanoparticle/polymer superlattice films: Fabrication and control of layer surface. **Advanced Materials**, Chichester, v. 9, n. 1, p. 61-65, janeiro 1997.
- SEELIG, Joachim . Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1331, v. 1, p. 103-116, março 1997.
- SILVERTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton; MORRILL, Terence C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Terceira edição. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1987. Capítulo 3.
- SNYDER, Abigail B.; WOROBO, Randy W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 94. n. 1, p. 28-44, janeiro 2014.
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam v. 275 p. 177–182, março 2004.
- TANAKA, Koichi. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation. **Angewandte Chemie International Edition**, Chichester, v 42, n. 33, p 3861-3870, agosto 2003..
- TRECCANI, Laura; KLEIN, Tanja Y.; MEDER, Fabian; PARDUN, Karoline; REZWAN, Kuroschi. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 9, n. 7, p 7115-7150, julho 2013.
- VERLY, Rodrigo M.; RODRIGUES, Magali A.; DAGHASTANLI, Katia Regina P.; DENADAI, Angelo Marcio L.; CUCCOVIA, Iolanda M.; BLOCH Jr. Carlos; FRÉZARD Frédéric; SANTORO, Marcelo M.; PILÓ-VELOSO, Dorila; BEMQUERER, Marcelo P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p.15-24, janeiro 2008.

- VERLY, Rodrigo M.; MORAES, Cléria M.; RESENDE, Jarbas M.; AISENBREY, Christopher; BEMQUERER, Marcelo P.; PILÓ-VELOSO, Dorila; VALENTE, Ana Paula; ALMEIDA, Fábio C. L.; BECHINGER, Burkhard. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, Rockville, v. 94, n. 6., p. 2194-2203, março 2009.
- WILLIAMS, Richard J.; MATT, Robert J.; ULIJN, Rein V. Exploiting biocatalysis in peptide self-assembly. **Biopolymers Peptide Science**, Chichester, v. 94, n. 1, p. 107-117, janeiro 2010.
- WILNER, Itamar; WILNER, Bilha. Biomolecule-based nanomaterials and nanostructures. **Nano Letters**, Washington, v. 10, n. 10, p. 3805-3815, outubro 2010.
- ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v.415, n. 6870, p. 389-395, janeiro 2002.
- ZEITLER, Benjamin; DIAZ, Ana H.; DANGEL, Alexandra; THELLMANN, Martha; MEYER, Helge; SATTLER, Michael; LINDERMAYR, Christian. De-novo design of antimicrobial peptides for plant protection. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8., e71687, agosto 2013.