



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE CATETERES VENOSOS CENTRAIS
MODIFICADOS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA REDUÇÃO
DA INCIDÊNCIA DE BIOFILMES**

Recife

2016

KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE CATETERES VENOSOS CENTRAIS
MODIFICADOS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA REDUÇÃO
DA INCIDÊNCIA DE BIOFILMES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a obtenção
do Título de Mestre em Inovação
Terapêutica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima De oliveira.

Recife

2016

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Ribeiro, Kalline Lourenço

Desenvolvimento de cateteres venosos centrais modificados com peptídeos antimicrobianos para redução da incidência de biofilmes / Kalline Lourenço Ribeiro - Recife: O Autor, 2016.

133 folhas: il., fig., tab.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e apêndices

1. Nanotecnologia 2. Infecções nosocomiais 3. Biofilme I. Andrade, César Augusto Souza de (orient.) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 29 de fevereiro de 2016

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de fevereiro de 2016, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Érico Muniz de Arruda Falcão

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REITOR

Profº Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profª Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profª Maria Eduarda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profª Oliana Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profª Maira Galdino da Rocha Pitta

*Aos meus pais, Manoel e Francisca,
por todo esforço e dedicação, com amor
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo seu amor de Pai, por ter me concedido o dom da vida e me abençoado com saúde e forças para realizar este trabalho, protegendo-me sempre de todo o mal.

Aos meus pais Manoel e Francisca que doaram suas vidas à criação dos filhos. Ao Meu Pai, pelo esforço de trabalhar duro para que os filhos nunca precisassem abandonar os estudos para contribuir com a renda familiar. À Minha mãe, pela dedicação do dia-a-dia, pela preocupação e carinho sempre. Agradeço aos dois por tudo que sou hoje.

Aos meus familiares, por fazerem parte da minha história, cada um de sua maneira. Especialmente, à minha avó paterna Luiza “Tia” (*in memorian*), pelo apoio na minha criação e nos meus estudos. Na sua condição de não alfabetizada, entendia que estudar era o melhor futuro para os seus netos e muitas vezes retirava do seu pouco dinheiro uma contribuição para que eu fizesse um lanche ou tirasse cópias na universidade.

Ao meu orientador Professor Dr. César Augusto, inicialmente, pela oportunidade de poder fazer parte do grupo de Biodispositivos Nanoestruturados e por ter reaberto as portas da pesquisa, da qual eu estava afastada há algum tempo. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência, compreensão, apoio e principalmente, por estar sempre disponível para sanar dúvidas e direcionar da melhor forma o caminho para a realização deste objetivo.

À minha co-orientadora Professora Dra. Maria Danielly, pelas grandes contribuições no decorrer deste período. Por se manter sempre presente e prestativa, transmitindo conhecimentos e tranquilidade, através do seu jeito de ser.

Aos companheiros de laboratório Giselle, Maurília, Karen, Rafael, Felipe, Isaac, Thaynara, Gabriel, Gustavo, Elton, Estefani, Alberto, Raíza e Thays pela ótima convivência, sempre pacífica e engrandecedora.

Às minhas amigas Flávia e Juliana, por sempre poder compartilhar com vocês alegrias, tristezas, emoções e acontecimentos vividos. Agradeço por cada momento de consolo, aconselhamento e amizade que me proporcionam.

Às minhas companheiras de apartamento, Helena e Gisléa, por terem me acolhido em Recife de forma calorosa e receptiva. Agradeço pela convivência amiga, na qual dividimos momentos de descontração, companheirismo e cumplicidade.

Aos colaboradores Professor Octávio Franco e Amanda Saúde (Centro de Análise proteômicas e bioquímicas de Brasília-UCB), Andris Bakuzis (Instituto de Física-UFG), Professor Reginaldo Gonçalves (Departamento de Parasitologia-UFPE), Sandra (Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-UFPE) e Érico (Médico Cirurgião Vascular e Doutor em Inovação Terapêutica) pela rica contribuição que proporcionaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, em especial Paulo Germano (Secretário do PPGIT), por ser extremamente prestativo e competente, auxiliando em todos os momentos.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados, mas que indiretamente tiveram grande importância no desenvolvimento deste trabalho.

A todos, o meu muito Obrigado!

“Se as coisas são inatingíveis... ora! não é motivo para não querê-las... Que tristes os caminhos, se não fora a mágica presença das estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

Os cateteres venosos centrais (CVC) são utilizados em situações em que há necessidade de acesso prolongado ou definitivo ao sistema vascular. A infecção associada a esses tipos de cateteres constitui riscos e agravos adicionais a pacientes, devido a formação de biofilmes nesses dispositivos. A formação do biofilme em cateteres, após a sua implantação, está associada a formação de uma camada de proteínas que adere a superfície, a partir disso, ocorre a interação com microrganismos por forças fracas de atração, iniciando a colonização do dispositivo. O peptídeo antimicrobiano *Clavanina A* (Clav A) possui 23 resíduos de aminoácidos, sendo altamente eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O uso da nanotecnologia é promissor no controle e prevenção da formação de biofilme. Nanopartículas de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$) têm características de interesse para aplicação biomédica, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e superparamagnetismo. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo modificar a superfície de cateteres com PAMs nanoestruturados para obtenção de uma cobertura eficiente contra a formação de biofilmes bacterianos. Inicialmente, modificou-se a superfície do cateter com aminopropiltrietoxissilano (APTS). As $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ foram sintetizadas pelo método da coprecipitação de sais de metais e, posteriormente, as suas superfícies foram modificadas com ácido 3-tiofenoacético (3TA) ou meso-2,3 ácido dimercaptosuccínico (DMSA), para posterior ligação covalente dos peptídeos. Realizou-se a análise morfológica das amostras através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MEV), além da composição elementar através de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se o bioensaio *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp.* As análises morfológicas das NPsFe_3O_4 demonstraram a presença de partículas em formato de aglomerados, com tamanho homogêneo e diâmetro médio de 10nm. Micrografias de MEV em corte transversal do cateter demonstraram a formação de um revestimento homogêneo. O mapeamento por EDS confirmou a presença das NPsFe_3O_4 aderidas à superfície do cateter. Ambas as modificações químicas foram eficazes para modificar a superfície do cateter. Os sistemas ClavA(NPsFe_3O_4 -DMSA)-Cateter e ClavA(NPsFe_3O_4 -3TA)-Cateter apresentaram um bom desempenho contra as bactérias e leveduras testadas. A atividade antimicrobiana dos cateteres modificados com filmes nanoestruturados e o peptídeo *Clavanina A* pôde ser explicada baseando-se na interação deste com a parede celular e a membrana plasmática destes microrganismos de acordo com a organização e componentes estruturais. Logo, pode ser vislumbrado como uma nova alternativa para o controle de infecções nosocomiais associadas a cateteres intravenosos.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. *Clavanina A*. cateteres. Biofilme. nanopartículas

ABSTRACT

The central venous catheters (CVC) are used in situations requiring long-term or permanent access to the vascular system. The infection associated with these types of catheters is further risks and hazards for patients, due to the formation of biofilms on these devices. The formation of biofilms on catheters, after its implementation, is associated with the formation of a layer of proteins sticking to the surface, from that, there is interaction with microorganisms by weak forces of attraction, starting device colonization. The Clavanina A antimicrobial peptide (Clav A) has 23 amino acid residues and is highly effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The use of nanotechnology is promising in the control and prevention of biofilm formation. Magnetite nanoparticles (Fe₃O₄Nps) have features of interest for biomedical applications, biocompatibility, biodegradability and superparamagnetism. Thus, this study aimed to modify the surface of catheters with nanostructured AMPs to obtain an effective hedge against the formation of bacterial biofilms. Initially, the catheter surface is modified with aminopropyltriethoxysilane (APTS). The Fe₃O₄Nps were synthesized by coprecipitation method of metal salts and then their surfaces were modified with 3-thiopheneacetic acid (3TA) or meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) for subsequent covalent attachment of peptides. We held the morphological analysis of samples through the techniques of transmission electron microscopy and scanning (SEM), and the elemental composition by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS). Antimicrobial activity was evaluated using the bioassay in vitro against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. The SEM micrographs showed the presence of NPsFe₃O₄ particles in agglomerated form, with a homogeneous size and average diameter of 10nm. SEM micrographs in cross section of the catheter showed the formation of a homogeneous coating. The mapping by EDS confirmed the presence of NPsFe₃O₄ adhered to the surface of the catheter. Both chemical modifications were effective to modify the surface of the catheter. The club systems (NPsFe₃O₄-DMSA)-Catheter and mace (NPsFe₃O₄-3TA)-Catheter performed well against bacteria and yeast tested. The antimicrobial activity of catheters modified nanostructured films and Clavanina The peptide was explained based on the interaction of this with cell wall and plasma membrane of these microorganisms according to components and structural organization. Therefore, it can be envisioned as a new alternative for the control of nosocomial infections associated with intravenous catheters.

Keywords: antimicrobial peptides. Clavanin A. catheters. Biofilms. nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (A) Cateter Venoso Central duplo lúmen (B) CVC inserido em veia jugular.....	24
Figura 2: Etapas na formação de biofilmes	27
Figura 3: (A) Colônias típicas de <i>S. aureus</i> e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de <i>S. aureus</i>	28
Figura 4: (A) Colônias típicas de <i>K. pneumoniae</i> e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de <i>K. pneumoniae</i>	30
Figura 5: (A) Colônias típicas de <i>E. coli</i> e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de células de <i>E.coli</i>	31
Figura 6: (A) Colônias típicas de <i>P. aeruginosa</i> e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figura 7: (A) Colônias típicas de <i>Candida albicans</i> e (B) Análise morfológica por microscopia óptica de <i>Candida albicans</i>	34
Figura 8: Dobramentos estruturais dos peptídeos antimicrobianos.....	37
Figura 9: Mecanismos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana.....	40
Figura 10: <i>Styela clava</i> , tunicado do qual foi isolado o PAM Clavanina	41
Figura 11: Aplicações da nanotecnologia.....	44
Figura 12: Exemplos de nanomateriais	45
Figura 13: Nanopartículas de magnetita.....	47
Figura 14: Esquema da superfície de Fe ₃ O ₄ Nps revestida com PEG (Core-shell)	50
Figura 15: Fórmulas estruturais de ácido 3-tiofenoacético e ácido 2,3-meso-dimercaptossuccínico.....	51

Figura 16: Modelo de imobilização de peptídeos pelo método físico.....	53
Figura 17: Modelo de imobilização química de biomoléculas.....	54
Figura 18: Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.....	55
Figura 19: (A) Microscópio eletrônico de varredura e (B) Imagem de MEV da antena de um pernilongo.....	56
Figura 20: Detector de raio-x usado para EDS.....	57
Figura 21: (A)Microscópio eletrônico de transmissão e (B) esquema de funcionamento interno de MET.....	58
Figura 22: Imagem do Cateter Venoso Central (CVC) duplo Lúmen.....	60
Figura 23: Esquema da síntese das NPsFe ₃ O ₄	61
Figura 24: Esquema representativo da modificação de superfície do cateter de silicone.....	63
Figura 25: Esquema do teste antimicrobiano bactérias X cateteres modificados.....	65
Figura 26: Esquema do teste antimicrobiano <i>Candida spp</i> X cateteres modificados.....	66
Figura 27: Micrografias de MET das Fe ₃ O ₄ Nps.....	67
Figura 28: Micrografias de MEV da superfície interna do cateter	69
Figura 29: Mapeamento de EDS. (A) Cateter original e (B) Cateter modificado.....	70
Figura 30: Gráficos demonstrativos (Absorbância X Tempo) da atividade antibacteriana dos cateteres modificados em relação ao cateter controle.....	71

Figura 31: Micrografias de MEV dos cateteres modificados e original após incubação com a levedura <i>C. tropicalis</i>	74
---	-----------

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Sequências primárias das clavaninas A-D	42
Tabela 2: Porcentagem atômica dos elementos presentes na superfície do caterer modificado.....	70
Tabela 3: Porcentagens de inibição para cada bactéria em relação aos dois tipos de modificação dos cateteres, demonstrando a melhor atuação inibitória de ClavA (NPsFe ₃ O ₄ -DMSA)-Cateter.....	72
Tabela 4: Porcentagens de inibição das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para cada levedura frente aos dois sistemas de modificação dos cateteres em relação ao cateter controle (original).....	73

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CVC	Cateter Venoso Central
ClaV	Clavanina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSA	Ácido 2,3-meso-dimercaptossuccínico
DI	Deionizada
EDC	1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida
g	Grama
HNP	Peptídeo de neutrófilos humano.
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
kDa	KiloDalton
LPS	Lipopolissacarídeo
mm	milímetros
MS	Ministério da Saúde
M	Molar
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
nm	Nanômetros
NPs	Nanopartículas
NPMs	Nanopartículas Magnéticas
NHS	N-hidroxisuccinimida
Fe ₃ O ₄ NPs	Nanopartículas de óxido de ferro
OMS	Organização Mundial de Saúde
Osm/L	Osmol por Litro
pH	Potencial Hidrogeniônico

PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PEG	Polietilenoglicol
PIB	Produto Interno Bruto
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
RNA	Ácido Ribonucleico
SEs	Enteroxinas estafilocócicas
3TA	Ácido 3- tiofenoacético
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ITU	Infecções do Trato Urinário
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Vancomicina
µm	micrômetro
µL	microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1.	Infecções nosocomiais.....	21
2.2.	Infecções nosocomiais associadas a dispositivos médicos.....	22
2.3.	Infecções associadas ao uso de CVC.....	23
2.4.	Biofilmes.....	25
2.4.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.4.2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
2.4.3.	<i>Escherichia coli</i>	31
2.4.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
2.4.5.	Leveduras do gênero <i>Candida</i>	34
2.5.	Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	36
2.6.	Mecanismos de ação dos PAMs.....	39
2.6.1.	<i>Clavaninas</i>	41
2.7.	Nanotecnologia.....	43
2.7.1.	<i>Nanopartículas magnéticas</i>	46
2.7.2.	<i>Síntese das NPs magnéticas</i>	48
2.7.3.	<i>Funcionalização das NPs magnéticas</i>	49
2.8.	Imobilização de PAMs em superfícies	51
2.9.	Técnicas de microscopia eletrônica para análise dos cateteres modificados.....	55
3.	OBJETIVOS.....	59
3.1.	Objetivo geral.....	59
3.2.	Objetivos específicos.....	59
4.	METODOLOGIA.....	60
4.1.	Materiais.....	60
4.2.	Síntese das Fe ₃ O ₄ NPs.....	61
4.3.	Modificação das superfícies das Fe ₃ O ₄ NPs.....	62
4.4.	Ligação química do peptídeo ClavA a superfície das Nps modificadas.....	62
4.5.	Modificação da superfície do cateter de silicone.....	62
4.6.	Análise Morfológica.....	63

4.7. Cultura dos Microrganismos.....	63
4.8. Teste antimicrobiano <i>in vitro</i>	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES.....	87
APÊNDICE A.....	87
APÊNDICE B.....	91
APÊNDICE C.....	110

1. INTRODUÇÃO

No século passado, apesar da introdução dos antibióticos ter gerado uma melhoria significativa no combate a determinados microrganismos, as infecções nosocomiais têm representado um sério problema para a população mundial, uma vez que comprometem a boa recuperação do indivíduo, podendo ser até fatal. Além disso, podem gerar aumento de gastos financeiros devido ao prolongamento do tratamento e permanência do paciente no ambiente hospitalar (Breathnach, 2013; Cerqueira, 2014).

O uso de dispositivos intravenosos, tais como, cateteres vasculares, vem sendo bastante explorado na clínica, principalmente para facilitar a administração de medicamentos e realizar nutrição parenteral em pacientes debilitados. Em contrapartida, a utilização desses dispositivos tem apresentado dificuldades relevantes, principalmente, em relação a grande incidência de formação de biofilmes microbianos em suas superfícies e consequente aumento do número de infecções (Pereira et al., 2005).

Na maioria dos casos, as infecções começam quando os microrganismos aderem à superfície do dispositivo ocorrendo proliferação e produção de uma matriz polimérica que contém água, polissacarídeos extracelulares e DNA, constituindo assim o biofilme. Finalmente ocorre o despreendimento de células que são responsáveis pela propagação da infecção (Costa et al., 2011; Ahmed et al., 2014). Os biofilmes têm elevada capacidade de resistência aos agentes antimicrobianos, o que significa um problema sério para a utilização de dispositivos intravasculares, incluindo cateteres venosos centrais (CVC) (Dolan, 2001).

Os biofilmes são produzidos por diversos microrganismos, entre eles estão: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp* (Breathnach, 2013). Os biofilmes são dificilmente removidos na superfície do dispositivo e, muitas vezes a única maneira de erradicar a infecção é a retirada do dispositivo (Costa et al., 2011).

Portanto, a busca de novas estratégias visando à prevenção da formação de biofilmes em cateteres é extremamente relevante, a fim de reduzir as infecções nosocomiais associados a esses dispositivos.

Diante disso, pesquisas comprovaram que determinadas moléculas de natureza proteica, resultantes do sistema imune inato de diversos tipos de organismos, apresentavam significativa atividade antimicrobiana. Portanto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs), acabaram se tornando alvo de estudos a fim de aplicação como novos antibióticos capazes de se contrapor aos mecanismos de resistência de inúmeros microrganismos de interesse, tais como o MRSA (*Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente), o qual está estreitamente associado à morbidade e mortalidade de pacientes acometidos por infecções nosocomiais (Brogden, 2005; Schmidtchen et al., 2014).

Em adição, o peptídeo antimicrobiano Clavanina A apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A referida capacidade antimicrobiana serviu de base para que se fossem criadas novas alternativas para diminuir infecções associadas a dispositivos intravenosos. Destacando-se que já foi demonstrado que determinados dispositivos biomédicos, tais como cateteres urinários e sondas, quando tiveram suas superfícies modificadas com PAMs, geraram resultados satisfatórios com relação ao controle da formação de biofilmes (Li, Chua, Saravanan, Basu, Mishra et al., 2013).

O presente estudo ainda acrescentou a nanobiotecnologia como uma forma de melhoria do sistema, gerando peptídeos associados à nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), para que fosse garantida uma área de superfície específica e boa biocompatibilidade, resultando em uma eficiente cobertura antibiofilme para cateteres venosos centrais. Visando assim, a obtenção de uma nova estratégia para a redução de infecções nosocomiais associadas ao uso de destes dispositivos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Infecções Nosocomiais

Também conhecidas como infecções hospitalares, as infecções nosocomiais, em um sentido mais amplo, podem ser também denominadas de “Infecções associadas a cuidados de saúde”, as quais são adquiridas através de cuidados de saúde em qualquer configuração, incluindo o uso de dispositivos médicos, procedimentos ou terapias (Breathnach, 2013).

Significam uma problemática que atinge milhões de pessoas ao redor do mundo. Dados da OMS mostram que todos os anos morrem mais de 100.000 pessoas no Brasil em função de infecções associadas aos serviços de saúde e que estas atingem cerca de 14% dos pacientes internados. Para se ter noção da dimensão do problema, 240 mil pessoas morreram em 2013, após terem seus quadros de infecção agravados (Cerqueira, 2014).

Uma subanálise do estudo *Extended Prevalence of Infection in Intensive Care II* (EPIC II), que avaliou apenas os pacientes incluídos no Brasil, verificou que, em 1.235 pacientes incluídos, cerca de 62% deles apresentavam quadro de infecção, prevalência esta significativamente mais elevada que aquela observada na mesma base de dados em outros locais, como Europa e América do Norte (Almeida & Farias, 2015).

De acordo com a portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, do MS, infecção nosocomial é aquela adquirida após admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Estas infecções aparecem depois de 48 horas ou mais, após a entrada do paciente no hospital ou no prazo de 30 dias a partir da alta e não estão relacionadas com as doenças que trouxeram o indivíduo ao ambiente hospitalar (Kayode et al., 2010).

A origem das Infecções Hospitalares na maioria das vezes é autógena, uma vez que o desenvolvimento se dá a partir da microbiota do paciente, podendo ter origem comunitária ou intra-hospitalar (Pereira et al., 2005). Entre os fatores mais comuns estão:

- **Fatores relacionados ao Hospital ou serviço de saúde:** superlotação; falta de higiene da equipe cuidadora (lavagem das mãos); saneamento inadequado, ausência de obediência aos protocolos de limpeza de uniformes, lavagem e esterilização de

equipamentos e medidas preventivas; terapêuticas depressoras do sistema Imunológico; uso indiscriminado de antibióticos, selecionando organismos resistentes; realização de procedimentos de diálise, ventilações cirúrgicas; entre outros (Kayode et al., 2010; Monteiro et al., 2003; Breathnach, 2013).

- **Fatores relacionados ao paciente:** Extremos de idade; múltiplas doenças subjacentes que causam imunodeficiência, como a AIDS, além de doenças neurológicas e de pele que permitem a entrada de microrganismos no tecido subcutâneo; imobilidade e desidratação favorecem infecções do trato urinário (UTIs) e a própria microbiota normal do paciente, que possui patógenos potenciais, tais como *Escherichia coli* no intestino e *S. aureus* no nariz (Breathnach, 2013).

Tais infecções podem variar de leves a graves, e até fatais. Estando intimamente associadas com a alteração da morbidade e da mortalidade de pacientes, gerando também implicações econômicas com o aumento dos custos com os cuidados de saúde e da repercussão em termos de sofrimento humano (Breathnach, 2013; Kayode et al., 2010).

Os Estados Unidos embora seja um país onde mais de 15% do seu PIB está voltado para os cuidados com a saúde, dados de 2009 demonstraram que cerca de 2 milhões de pacientes são acometidos de infecções hospitalares, gerando um gasto de mais de 4,5 bilhões de dólares para o governo americano (Reed and Kemmerly, 2009).

2.2. Infecções nosocomiais associadas a dispositivos médicos

O uso de dispositivos médicos e implantes de biomateriais, tais como, cateteres vasculares e urinários, válvulas cardíacas, próteses ortopédicas, stents, entre outros, está cada vez mais comum e sua introdução na prática médica tem como objetivos principais a melhoria da sobrevivência e da qualidade de vida do paciente (Costa et al., 2011; Alves et al., 2014). Em contrapartida, tal uso tem representado uma ameaça para os pacientes e um grande desafio para os clínicos por estar associado a infecções bacterianas que comprometem a segurança e a longevidade destes dispositivos (Gao et al., 2011).

Diferente de outros tipos de infecções nosocomiais, as infecções associadas ao uso de dispositivos se encontram diretamente ligadas ao atendimento médico (Reed and Kemmerly, 2009). Cerca de um quarto a um terço dos casos de infecções surgem através de dispositivos intravasculares, como cateteres venosos; e os demais estão associados ao trato urinário, ventilação pulmonar, aparelhos dentários, lentes de contato e válvulas cardíacas (Breachnatch, 2013; Gao et al., 2011).

As infecções bacterianas associadas a dispositivos e implantes significam para o meio hospitalar uma elevada morbimortalidade e maior tempo de internação com aumento dos custos. E ainda, de forma preocupante, tais infecções geram o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados (Mishra et al., 2014; Li et al., 2014).

A inserção de um cateter (urinário ou intravascular) aumenta o risco de infecções sanguíneas em pacientes debilitados. A patogênese dessas infecções está associada à relação das células do sistema imunológico do hospedeiro com fatores de virulência do microrganismo. Isso explica o fato de que um terço a quase dois terços dos casos de morte de pacientes em uso de cateteres permanentes corresponde a indivíduos imunocomprometidos (Olejnickova et al., 2014).

Embora o uso de dispositivos ortopédicos esteja muitas vezes ligado a infecções graves levando até a amputações de membros, a mortalidade na maioria dos casos é atribuída a colonização de implantes cardiovasculares, como cateteres venosos, válvulas cardíacas e próteses (Costa et al., 2011).

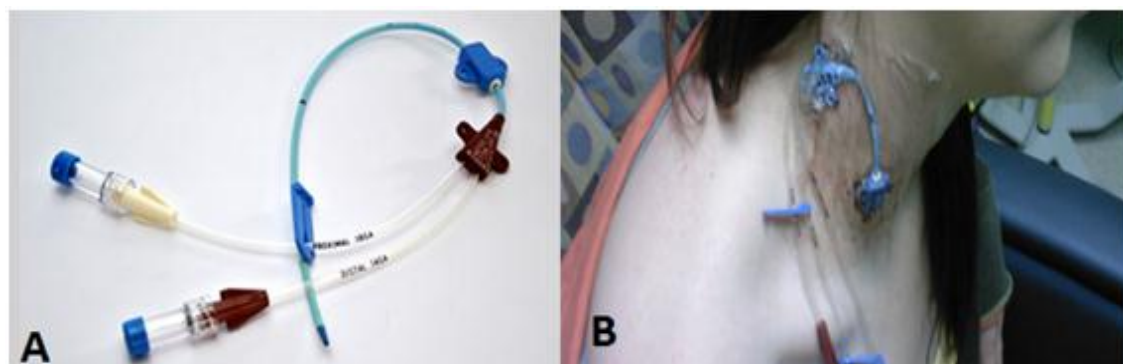
As infecções sanguíneas associadas a cateteres venosos são de extrema gravidade, principalmente quando se desenvolvem em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Na UTI é comum o uso de cateteres intravasculares, contudo, é frequente a ocorrência de infecções em virtude da manipulação muitas vezes inadequada e maior tempo de permanência do paciente, favorecendo a colonização do dispositivo com a microbiota hospitalar (Tardivo et al., 2008).

2.3. Infecções associadas ao uso de CVC

Os cateteres venosos surgiram em 1970 e cada vez mais têm sido utilizados na clínica médica como alternativa para o acesso vascular (Figura 1) (Tardivo et al., 2008). Segundo

Mesiano e Merchan-Hamann (2007), o número de cateteres puncionados nos Estados Unidos chega a 150 milhões, sendo mais de 5 milhões, cateteres venosos centrais (CVC).

Figura 1. (A) Cateter Venoso Central duplo lúmen (B) CVC inserido em veia jugular. Fonte: A (<http://www.trammit.com.br/cateter-venoso-central/817-cateter-venoso-central-duplo-lumen.html>)/ 2015 e B (<http://sapiensmedicus.org/blog/2015/01/19/coloca-un-cateter-venoso-central-en-7-sencillos-pasos/>)/ 2015.



Os acessos principais para uso de CVC são as veias jugular, subclávia e femoral. Os cateteres geralmente são constituídos de silicone ou poliuretano, podendo ser semi ou totalmente implantáveis, de único ou duplo lúmen, de curta e longa permanência (Tardivo et al., 2008; Junior et al., 2010).

Um CVC de longa duração se destina a permanecer em determinado acesso por um período prolongado, sendo encapsulado por via subcutânea e totalmente implantado, já o cateter de curta duração possui uso temporário, não é encapsulado subcutaneamente, nem totalmente implantado (Shah et al, 2013).

A utilização de cateteres venosos centrais é comum em pacientes críticos que geralmente estão submetidos aos cuidados em UTI. Dentre as finalidades de tal dispositivo estão: administração de soluções capazes de irritar a camada íntima vascular; fármacos quimioterápicos; hemodiálise; nutrição parenteral, a qual promove a infusão de soluções com alta osmolalidade (acima de 800 a 900m Osm/L) e monitoramento hemodinâmico de doentes graves (Vilela et al, 2010; Lorente et al, 2005).

Apesar de sua notável utilidade, o cateter venoso central está associado a sérias complicações por ser uma técnica incômoda e invasiva para o paciente que podem gerar consequências adversas tais como: trombose, estenose, pneumotórax ou hemotórax. Trata-se de uma técnica sujeita a um grande número de complicações mecânicas que durante a inserção do cateter aumentam a probabilidade de infecção (Polderman & Girbes, 2002).

A infecção em cateteres venosos centrais constitui riscos e agravos para pacientes que em virtude de doenças subjacentes já se encontram debilitados e com seu sistema imunológico enfraquecido. É o caso de pacientes que estão sendo submetidos à terapia do câncer e pacientes em hemodiálise, os quais ficam suscetíveis a reinternações e complicações que podem levar à morte (Junior et al, 2010). Geralmente cerca de 19% dos pacientes em uso de CVC apresentam sintomas de infecção, sendo 7% relacionado a infecções locais e 12% a casos de bacteremia (Junior et al., 2010). O risco de infecção em cateteres venosos centrais está associado a diversos fatores, incluindo o tempo de permanência do cateter no vaso, a forma como o mesmo é manipulado, o local de implante, a solução que é infundida e principalmente, a experiência do profissional que realiza a cateterização (Araújo, 2003; Mesiano et al., 2007; Tardivo, et al, 2008).

O fator determinante na patogênese de infecções relacionadas a cateteres é a formação de biofilmes bacterianos (Olejnickova et al, 2014). Neste caso, o tratamento comumente utilizado envolve a substituição dos dispositivos contaminados e em alguns casos prolongada antibioticoterapia, o que inevitavelmente gera custos adicionais ao sistema de saúde (Benerjee et al., 2011).

2.4. Biofilmes

Um biofilme pode ser definido como um conjunto de células irreversivelmente associadas que se desenvolve a partir da adesão de microrganismos a uma determinada superfície, seguida de uma alteração gênica que promove a expressão de fenótipos diferentes de sua forma planctônica (Donlan, 2002; Trautner & Darouiche, 2004), ou seja, quando incorporadas a um biofilme, as células microbianas são fisiologicamente distintas de suas correspondentes planctônicas e passam a agir de forma coordenada, como cooperativas, de certa forma imitando um organismo multicelular (Lindsay et al., 2006).

A formação de biofilme é uma forma natural de crescimento para a maioria das espécies microbianas em seus habitats naturais e constitui uma simples estratégia de sobrevivência que facilita a transmissão de patógenos, proporcionando um ambiente estável e de proteção para o microrganismo (Moscoso et al., 2006). Dentro de um biofilme as células são mantidas juntas através de uma matriz extracelular, produzida pelo próprio microrganismo, que consiste basicamente em polissacarídeos e proteínas e, também, DNA (Hayrapetyan et al., 2015). Esta matriz caracteriza-se por ser resistente a certas condições ambientais, como: radiação UV, variação de pH, choque osmótico e dessecação; além de prevenir a entrada de antibióticos e substâncias biocidas (Costa et al., 2011).

Quando um microrganismo é capaz de formar biofilme, este pode se desenvolver em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, tubulações de sistema de água potável, além de sistemas aquáticos naturais. Para que se constitua um ambiente favorável à fixação e o crescimento de microrganismos deve existir uma interface sólido-líquido entre a superfície e uma solução aquosa, como água ou sangue (Donlan, 2002).

Um exemplo conhecido de biofilme é a placa dentária da superfície dos dentes, porém mais recentemente, estudos sugeriram que grande parte das infecções estão associadas à formação de biofilmes, cerca de 60% dos casos (Douglas, 2003; Moscoso et al., 2006). O desenvolvimento dessas comunidades sésseis e a sua resistência inerente ao ataque de antibióticos e do sistema imunológico, servem de base para muitas infecções persistentes e crônicas (Whitchurch et al., 2002). Além disso, a estrutura do biofilme facilita a transferência horizontal de genes entre estirpes microbianas resistentes e não resistentes (Costa et al., 2011).

O estabelecimento de um biofilme ocorre em três etapas: (1) aderência microbiana, através de flagelos ou fímbrias presentes na superfície celular; (2) formação de microcolônias e produção da matriz extracelular; (3) maturação e desprendimento de células, promovendo assim, a propagação da infecção (Figura 2). As infecções podem ser causadas por uma única espécie microbiana ou por uma mistura de bactérias ou espécies fúngicas e geralmente estão relacionadas com a colonização de próteses, válvulas cardíacas e cateteres (Costa et al., 2011; Douglas, 2003).

Figura 2. Etapas na formação de biofilmes. Fonte: (<http://www.yourgenotype.com.br/search?updated-max=2014-06-14T10:30:00-07:00&max-results=50>) / 2015.



A implantação de um biomaterial, como por exemplo, os cateteres intravasculares, está associada a formação de uma camada de proteínas (fibrinogênio, imunoglobulinas, albumina) que adere à sua superfície. A partir disso ocorre a interação entre o microrganismo e tais proteínas através de forças fracas de atração que mais tarde são substituídas por interações mais específicas (Costa et al., 2011).

A forma mais comum de contaminação de um implante biomédico é a contaminação direta por microrganismos presentes no ambiente hospitalar e principalmente por bactérias ou fungos que colonizam a pele do paciente, que no momento da inserção do dispositivo são arrastadas, se depositando na superfície do mesmo. Apesar do desenvolvimento nos últimos tempos de novas técnicas cirúrgicas assépticas, microrganismos ainda são encontrados em cerca de 90% dos dispositivos. Os patógenos mais comuns encontrados, são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida sp.* (Alves et al., 2014).

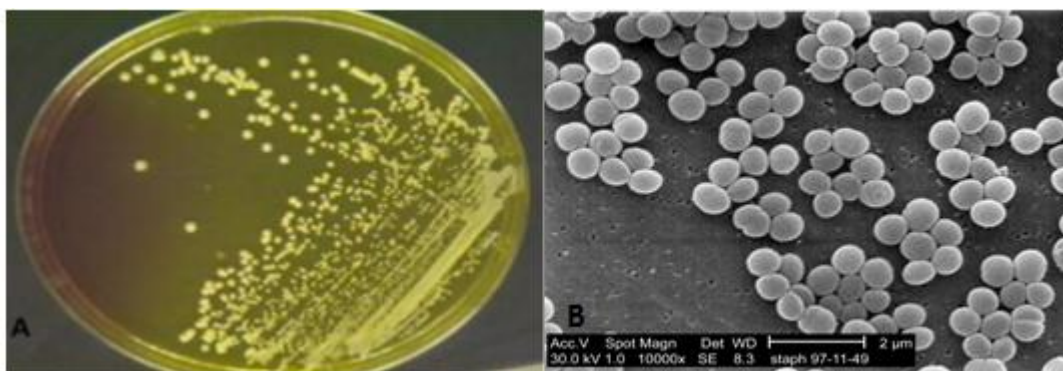
Dentre estes microrganismos, foram eleitos para este trabalho as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos do gênero

Candida, devido a serem reconhecidas como principais formadores de biofilme em dispositivos intravasculares, como cateteres venosos.

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um coco gram-positivo pertencente à família Staphylococcaceae/Micrococcaceae que apresenta, pelo menos, 200 estirpes diferentes (Durai et al., 2010). Estes microrganismos são não-esporulados e geralmente, não-encapsulados. Apresentam diâmetro de 0,5 a 1,0 μm , possuem formato esférico, podendo se apresentar como cocos únicos ou combinados e em forma de cachos irregulares (Figura 3). Trata-se de anaeróbios facultativos, imóveis, catalase e coagulase-positivos e oxidase-negativos (Le loir et al., 2003; Santos et al., 2007).

Figura 3: (A) Colônias típicas de *S. aureus* e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de *S. aureus* Fonte: Figura A (<http://biomedicinaemicro.blogspot.com.br/p/culturasbacterianas.htm>) / 2015 e Figura B (<https://annarenatav3.wordpress.com/page/2/>) / 2015.



S. aureus é um microrganismo versátil e adaptável, podendo existir sem causar danos, habitando como um comensal (Novick et al., 2003), como exemplo, pode ser encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Porém, pode provocar infecções de simples a graves, tais como: espinhas, furúnculos, pneumonia, meningite, endocardite e até septicemia, as quais estão suscetíveis, principalmente, indivíduos imunodeprimidos (Santos et al., 2007). Em adição, algumas estipes de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas (SEs), que comumente causam intoxicações alimentares e a toxina da síndrome do choque toxico (Le loir et al., 2003).

Existem 50 ou mais genes acessórios envolvidos na patogênese do *S. aureus*, estes são responsáveis pela codificação de proteínas que permitem a sua colonização no hospedeiro (Novick et al., 2003). Essa capacidade de colonização e patogenicidade estão intimamente ligadas aos seus fatores de virulência, incluindo a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno e da enzima coagulase, as quais estão relacionadas com a aderência do microrganismo as células do hospedeiro ou a matriz extracelular; assim como, a liberação das hemolisinas α , β , δ , γ e δ responsáveis pela a sua invasão na célula do hospedeiro, penetração nos tecidos e adesão a superfícies de cateteres e próteses (Santos et al., 2007).

É o agente mais isolado em cateteres semi-implantáveis utilizados em hemodiálise, assim como, é a bactéria prevalente em cerca de 50% dos casos de bacteremia relacionada a cateteres totalmente implantáveis (Neves junior et al., 2009).

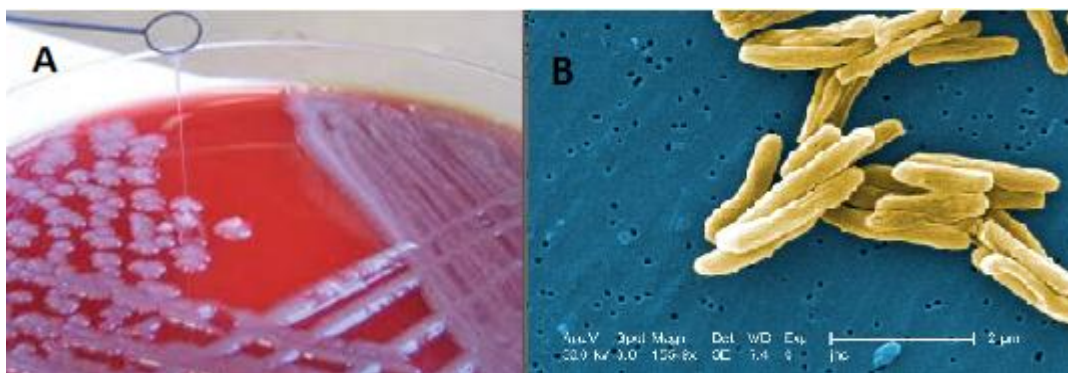
A infecção causada por *S. aureus* é a mesma causada pelo MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina), com a diferença de que o segundo apresenta resistência ao antibiótico Meticilina, por ser capaz de produzir uma proteína de membrana denominada proteína de ligação à penicilina-2a [PBP2a] que o torna resistente aos betalactâmicos (grupo de antibióticos que se define pela presença do anel beta-lactâmico e inibe a síntese de peptídeoglicano), dificultando assim, o tratamento contra as infecções causadas por tal microrganismos (Suarez & Gurdiol, 2009; Durai et al., 2010)

A resistência à metilicina levou a incorporação do uso da Vancomicina no tratamento de pacientes infectados por MRSA, porém a utilização deste último de forma abusiva desencadeou o surgimento do VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina), ratificando ainda mais a necessidade, já reconhecida pela OMS, da descoberta e síntese de novos antimicrobianos para o tratamento de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes (Santos et al., 2007).

2.4.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa, cujo tamanho varia de 0,3 a 1µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento. Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo e cresce em temperatura ótima de 37°C (Podschun and Ullmann, 1998). As colônias

formadas são grandes, de cor rósea, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide (Figura 4), em virtude da produção de uma cápsula polissacarídica que fornece auxílio na aderência do microrganismo na formação do biofilme, assim como, o protege contra fagocitose e outros fatores séricos via cascata mediada pelo complemento (Martínez et al., 2004; Gupta et al., 2003).



A *K. pneumoniae* está presente como saprófita na nasofaringe e no trato intestinal (Podschun & Ullmann, 1998), sendo fonte de infecções pulmonares em pacientes debilitados por alcoolismo, diabetes e portadores de doenças pulmonares crônicas. As infecções causadas pelo gênero *Klebsiella* geralmente acometem pessoas imunodeprimidas, sendo responsável por altas taxas de mortalidade. Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, artrites, enterites, meningites em crianças e seps (Madson et al 1994; Ingham, 2000).

5 antígenos somáticos ou O, adesinas fimbriais e não fimbriais que servem como fatores de virulência (Gupta et al., 2003).

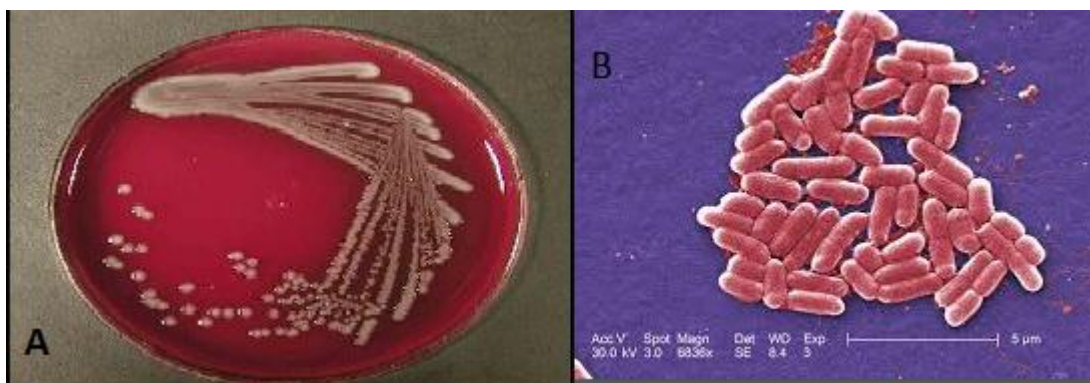
No final do século XX, o alto índice de infecções nosocomiais associadas às bactérias *Klebsiella spp*, sendo cerca de 32% relacionadas a *K. pneumoniae*, levou ao uso indiscriminado das cefalosporinas, o que desencadeou a seleção destes microrganismos e consequente desenvolvimento da resistência e necessidade de pesquisa por novas gerações de antibióticos (Colombo et al., 2009).

A carbapenemase é uma enzima produzida por bactérias gram-negativas (enterobactérias) que lhes confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar alguns agentes β -lactâmicos. Tal enzima foi encontrada inicialmente na *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) na Carolina do Norte, Costa Leste dos Estados Unidos, em 1996. Cepas produtoras de carbapenemase podem causar qualquer tipo de infecção sendo a evolução destas associadas a uma alta taxa de mortalidade. O paciente com infecção pela KPC pode apresentar febre ou hipotermia, taquicardia, piora do quadro respiratório e nos casos mais graves hipotensão, inchaço e até falência de múltiplos órgãos (Cotrim, Rocha & Ferreira, 2012).

2.4.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Caracteriza-se por apresentar a forma de bastonete móvel (flagelo peritríquo) com diâmetro médio de 0,5 μ m e comprimento de aproximadamente 1,5 μ m. Trata-se de um microrganismo não esporulado, anaeróbio facultativo que cresce em temperatura ótima de 39 °C. As colônias podem apresentar aspecto rugoso ou liso, assim como mucóides, nas quais as Unidades formadoras de colônias (UFC) possuem um diâmetro de 1 a 3 mm (Figura 5) (Neidhardt, Ingraham & Schaechter, 1990; Ferreira & Knobl, 2009).

Figura 5: (A) Colônias típicas de *E. coli* e (B) análise morfológica por microscopia eletrônica de células de *E. coli*. Fonte: Figura A (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia_coli_O157:H7_and_Hemolytic_uremic_syndrome/) 2015 e Figura B (http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/diseases/escherichia_coli.html)/2015.



A bactéria *E. coli* é um microrganismo Gram-negativo que coloniza a microbiota intestinal de seres humanos e animais de sangue quente, estabelecendo uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro, no entanto, 10% de suas cepas são patogênicas e estão associadas às infecções nosocomiais e infecções adquiridas na comunidade. É uma bactéria uropatogênica, porém comumente encontrada em isolados de meningite neonatal, enterites e bacteremias. Têm representado uma grande problemática por apresentar resistência a pelo menos duas classes de antibióticos utilizados na clínica, tais como, penicilinas e cefalosporinas (Von baum & Marre, 2005; Santos et al., 2009).

Estudos relataram a formação de biofilmes de linhagens de *E. coli* patogênicas em diversos tipos de superfícies, inclusive em dispositivos biomédicos. O estabelecimento desses biofilmes em certos dispositivos cirúrgicos pode levar a formação de hemolisina, a qual gera uma reação inflamatória e consequentemente dificulta o desenrolar do tratamento (soto et al., 2007).

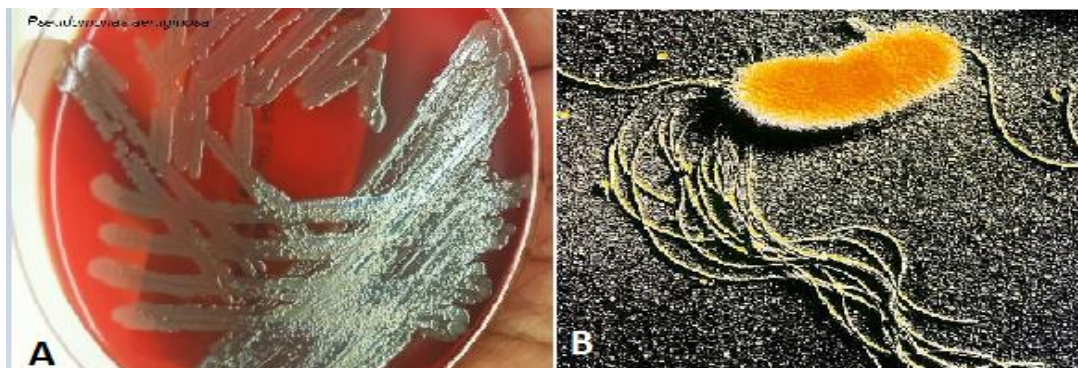
2.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa (Figura 6) que faz parte da microbiota humana e raramente causa infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. Contudo, trata-se de um agente infeccioso importante em ambientes hospitalares, sendo extremamente perigoso para pacientes imunodeprimidos. Como exemplo, podemos citar pacientes vítimas de queimaduras, cateterizados, com pneumonia hospitalar e em uso de respiradores. Além disso, é causa predominante de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística, devido à

colonização do epitélio das vias respiratórias por tal microrganismo, podendo levar a insuficiência pulmonar e morte (Stover et al., 2000; Paviani, Stadnik & Heinik, 2003).

O gênero *Pseudomonas* é constituído por bacilos com dimensões que variam entre 0,5 – 1,0µm de largura e 1,5 – 5,0µm de comprimento, aeróbios estritos, retos ou levemente curvados, não esporulados, não-fermentadores de glicose e apresentam motilidade por meio de um ou mais flagelos polares. Crescem a temperaturas de até 42°C, geralmente produzindo um pigmento azul-esverdeado (piocianina), denominado de bacilo piocianico. Podem ser isolados a partir da água, plantas, solo e tecidos de animais, onde são capazes de formar biofilmes resistentes (Murray, Drew, Kobayashi et al., 1992; Paviani et al., 2003).

Figura 6: (A) Colônias típicas de *P. aeruginosa* e (B) Análise morfológica por microscopia eletrônica de *P. aeruginosa*. Fonte: Figura A (<http://www.microregistrar.com/tag/pseudomonasaeruginosa/>) 2015 e Figura B (<http://www.microbiologia.ufrj.br/antigo/informativo/micromundo/360/>) 2015.



A espécie de maior importância clínica é a *P. aeruginosa* principalmente devido ao seu alto potencial de virulência. Este potencial pode ser associado produção de polissacarídeos (alginato), toxinas extracelulares, presença de lipopolissacarídeo (LPS) de parede celular (endotoxina), fatores estruturais que garantem a sua aderência a células hospedeiras e a formação de biofilmes (Murray et al., 1992; Arnow & Flaherty, 1996).

Grande parte dos materiais e equipamentos hospitalares pode servir de base para o desenvolvimento de biofilmes de *P. aeruginosa*, principalmente aqueles de superfície molhada, como equipamentos para ventilação e administração intravenosa (cateteres) (Paviani et al., 2003).

A *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, incluindo betalactâmicos, cloranfenicol e tetraciclinas. Geralmente as cepas hospitalares de *P. aeruginosa* são marcadas pela multirresistência às drogas de rotina, sendo grande parte dessa resistência desenvolvida em UTIs. Dentre os mecanismos de resistência envolvidos estão: a produção de β -lactamases; sistemas de bombas de efluxo; produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e baixa permeabilidade da membrana ou ausência de porinas de alta permeabilidade (Paviani et al., 2003; Ferreira & Lala, 2010).

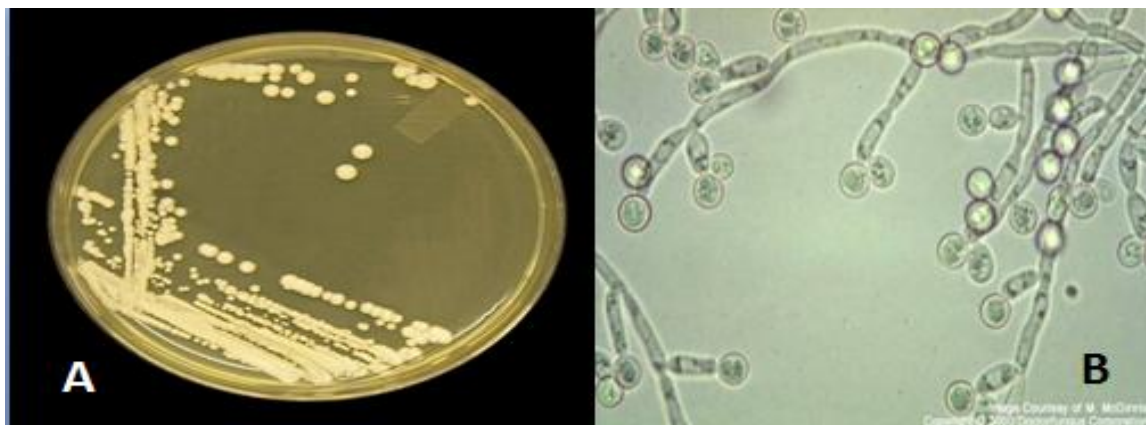
2.4.5. Leveduras do gênero *Candida*

Candida é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e animais, colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivo e urinário, bucal e vaginal (Hossain et al., 2003). Algumas espécies são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por esta levedura na vagina (Colombo & Guimarães, 2003).

Estes microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras podem desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose (Giolo & Svidzinski, 2010).

Microbiologicamente trata-se de uma levedura vegetal; desprovida de clorofila; Gram-positiva; dimórfica; saprófita e se desenvolve melhor em pH ácido (Rosa & Rumel, 2004). Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas conídios, entretanto algumas espécies se multiplicam sexuadamente (Figura 7) (Giolo & Svidzinski, 2010).

Figura 7: (A) Colônias típicas de *Candida albicans* e (B) Análise morfológica por microscopia óptica de *Candida albicans*. Fonte: Figura A (<https://museudinamicointerdisciplinar.wordpress.com/tag/candidiase/>) / 2015 e Figura B (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.br/2009/12/candida-albicans.html>) / 2015.



São microrganismos comensais, entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas. Essa transformação pode ser devida ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (extremos de idade, doença de base, imunossupressão) ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas. O gênero *Candida* spp. é responsável por 80% dos casos de infecção fúngica sistêmica (Giolo & Svidzinski, 2010).

A espécie de *Candida* mais isolada em humanos é a *C. albicans*, sendo, portanto, a levedura mais associada em processos infecciosos, incluindo a candidemia. Entretanto, outras espécies não-*albicans* têm sido consideradas quanto a sua patogenicidade. São elas: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, entre outras (Giolo & Svidzinski, 2010).

A candidemia é definida pela presença de fungos do gênero *Candida* na corrente sanguínea, que nunca deve ser considerada uma contaminante apenas, e tem indicação formal de tratamento. Infecções da corrente sanguínea por esse tipo de levedura correspondem a uma mortalidade de cerca de 35-75%. Representa aproximadamente 17% de todas as infecções adquiridas na UTI, sendo a quarta etiologia mais frequente de infecções nosocomiais (Kauffmann, 2014).

Existem vários fatores potenciais para o desenvolvimento de candidemia, dentre os quais estão: o uso de cateteres venosos centrais, que geralmente estão associados ao desenvolvimento de biofilmes; mãos de profissionais colonizadas por espécies de *Candida*; imunossupressão; infecção bacteriana concomitante; uso recente de antibióticos de amplo espectro; diabetes;

cirurgia abdominal recente; nutrição parenteral; hemodiálise, pancreatite e neutropenia, entre outros (Benjamin et al., 2009)

As manifestações clínicas são extremamente variáveis, podendo ser leves e oligossintomáticas, e em alguns casos apresenta uma rápida evolução com sepse grave ou choque séptico, além de candidemia invasiva, que é definida pela disseminação hematogênia da infecção em outros órgãos como olhos, rins, coração, cérebro entre outros (Kauffmann, 2014).

A candidemia deve ser tratada inicialmente com a remoção do cateter venoso central, mas não pode ser considerada como medida suficiente para tratamento. Os princípios de tratamento destes pacientes incluem a remoção e drenagem de quaisquer abscessos que por ventura apresentem. Em pacientes leve a moderadamente doentes, a recomendação inicial é de tratamento com azóis, como o fluconazol, em pacientes sem uso prévio. Por sua vez, em pacientes graves se recomenda o uso de equinocandinas ou polienos à base de lipídios como a anfotericina B (Leon et al., 2014).

Anfotericina B deve ser reservada para infecções de órgãos, como a meningite, a endocardite, ou a osteomielite ou para pacientes em que a co-infecção com outros fungos é documentada ou possível. Não há nenhuma vantagem significativa em combinar antifúngicos para o tratamento da candidemia (Benjamin et al., 2009).

2.5. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

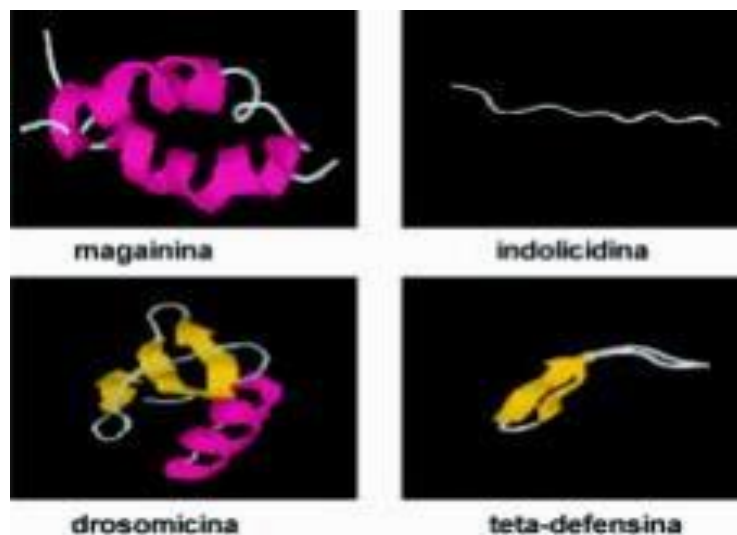
Nos últimos anos, com a intensa busca por agentes terapêuticos que superassem a resistência bacteriana, houve um aumento no interesse por abordagens terapêuticas alternativas que fossem mais eficazes no combate aos diversos tipos de patógenos, e entre elas estão os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Brogden, 2005; Hancock & Sahl, 2006; Schmidtchen et al., 2014).

Peptídeos antimicrobianos são componentes principais do sistema imune inato, formando uma primeira linha de defesa contra patógenos invasores (Schmidtchen et al., 2014). A maioria desses peptídeos é mobilizada logo após a infecção microbiana e atuam rapidamente para neutralizar uma ampla gama de microrganismos. Estes possuem ainda outras vantagens, tais como: propriedades antitumorais, agem em uma concentração muito baixa, e são menos

propensos a promover a resistência bacteriana. Portanto, estas propriedades tornam os PAMs candidatos promissores para drogas terapêuticas (Reddy et al., 2004).

Os PAMs compreendem uma família quimicamente e estruturalmente heterogênea. No entanto, existem algumas características que são compartilhadas por quase todos os PAMs já conhecidos, tais como: possuem sequências menores que 60 resíduos de aminoácidos (12-50 aminoácidos); pesos moleculares entre 1 e 5 kDa; carga líquida positiva, juntamente com domínios hidrofóbicos; características anfipáticas e uma variedade de conformações estruturais, incluindo α -hélices, folhas- β -pregueada, hélices estendidas e *loops* (Figura 8) (Kindrachuk, Nijnik & Hancock, 2010; Andreu & Rivas, 1998; Costa et al., 2011).

Figura 8: Dobramentos estruturais dos peptídeos antimicrobianos magainina (α -hélice), Indolicidina (hélice estendida), drosomicina (domínios α -hélice e folha β -pregueada) e teta-defensina (folha- β -pregueada). Fonte: (<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABbckAJ/>)2015.



Mais de 750 PAMs já foram identificados em vários organismos, que vão desde insetos, plantas até animais, incluindo os seres humanos. Muitos organismos utilizam estes peptídeos como mecanismo de defesa inata que os protege contra microrganismos invasores (Mendez et al., 1990; Schnapp, Reid & Harris, 1998).

As primeiras evidências que contribuíram para uma melhor compreensão dos peptídeos antimicrobianos foram baseadas em estudos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. Esta serviu de modelo para análise de mecanismos imunes inatos, sendo responsável pela produção de

uma linhagem de peptídeos, tais como: drosomicina, cecropinas e atacinas. Drosomicinas é um potente antifúngico, enquanto os outros apresentam propriedades antibacterianas (Hoffman et al., 1999; Reddy et al., 2004).

Os PAMs têm sido descritos como componentes do arsenal de defesa das plantas. A maioria das famílias de PAMs descritos para plantas são ricos em cisteína e possuem estruturas globulares estabilizadas por pontes dissulfeto. O sistema imunológico das plantas conta com a produção de várias classes de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas, tioninas e proteínas de transferência de lipídios (Maroti et al., 2011; Cândido et al., 2014).

Foram caracterizadas duas grandes famílias de PAMs em mamíferos: as defensinas e catelicidinas (Gallo et al., 2002). Cada uma destas exibe uma expressão específica e distinta. As defensinas são pequenos peptídeos antimicrobianos catiônicos expressos por granulócitos, isolados inicialmente a partir do coelho e porco da índia. Os seres humanos possuem seis α -defensinas, sendo quatro expressas por granulócitos e alguns linfócitos (HNP 1-4), enquanto as outras duas são expressas pelas células de Paneth intestinal. As β -defensinas presentes nos seres humanos são de quatro tipos (HBD 1-4) expressas por células epiteliais da pele e sua síntese é induzida por citocinas (TNF- α e IL-1 β) (Reddy et al., 2004).

As catelicidinas são armazenadas como pró-peptídeos inativos em grânulos de secreção de neutrófilos e liberados mediante estimulação celular por processo proteolítico (Zanetti et al., 1990; Reddy et al., 2004). Nos seres humanos, foram identificadas as catelicidinas CAP-18 e LL-37 nos testículos (Agerberth et al., 1995), epitélios escamosos, linfócitos e monócitos (Agerberth et al., 2000). Dentre as catelicidinas identificadas em mamíferos ainda estão a SMAP-29 (ovelha) e as bacterecinas Bac-5 e Bac-7 (bovinos), as quais possuem atividade antibacteriana (Reddy et al., 2004; Agerberth et al., 2000).

Adicionalmente, uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos tem tomado destaque no estudo para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos, os peptídeos isolados de invertebrados marinhos. Estes são isolados a partir dos filos artrópodes, cnidários, anelídeos, moluscos, cordatos e equinodermos. Apresentam estruturas baseadas em α -hélices, folhas- β ou mistas estabilizadas por pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína (otero-gonzalez *et al.*, 2010).

2.6. Mecanismos de ação dos PAMs

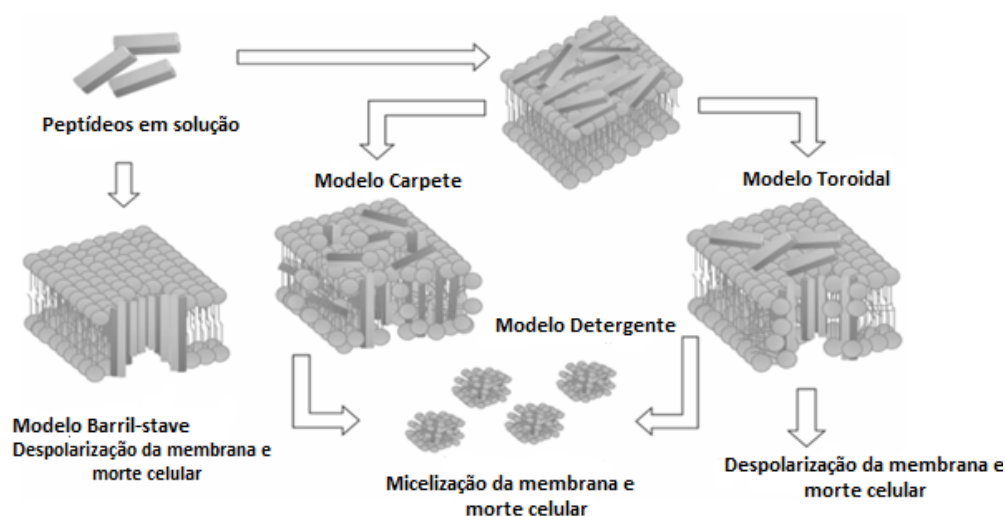
Devido a enorme variedade de sequências de aminoácidos e características estruturais, o mecanismo exato de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda é uma questão controversa. Contudo, até o momento existe o seguinte consenso: por serem catiônicos, isto é, possuírem carga positiva, os peptídeos são eletrostaticamente atraídos para a célula microbiana, cuja membrana possui elementos com carga negativa e ao interagir hidrofobicamente com os fosfolipídios da membrana, o PAM adota uma estrutura anfipática. Esta interação é a que se acredita permitir a permeabilização letal do peptídeo na membrana. A maioria dos peptídeos antimicrobianos só assume sua estrutura anfipática após a interação com a membrana bacteriana, uma vez que não é uma estrutura favorável em ambiente aquoso (Van't hof et al., 2001; Costa et al., 2011).

Muitos PAMs contêm uma fração substancial de resíduos hidrofóbicos que aparecem frequentemente a cada 3-4 unidades de aminoácidos. Consequentemente, formam α -hélices ao interagir com as membranas lipídicas. Portanto, embora esses peptídeos afetem as bactérias de muitas formas diferentes, incluindo a inibição da parede celular e da síntese de DNA, RNA e proteínas, considera-se a ruptura das membranas plasmáticas como o seu principal modo de ação (Brogden, 2005; Hancock & Sahl, 2006; Schmidtchen et al., 2014).

A maioria dos PAMs naturais mostra seletividade para as membranas procariotas. Isso pode ser atribuído a diferenças na composição da membrana e o potencial transmembrana que afeta, dessa forma, a interação inicial e a eficácia de permeabilização. Além disso, as interações peptídeo membrana ainda são dependentes da temperatura, do pH e da força iônica (Van Kan, Van der Bent, Demel et al., 2001).

Os mecanismos de ação dos PAMs baseiam-se nas conformações assumidas em ambientes hidrofóbicos. Desta forma, em um processo infeccioso pode haver a ação sinérgica entre as moléculas de peptídeos ou ainda um mesmo PAM pode apresentar uma variedade de mecanismos de ação, ampliando o efeito antimicrobiano (Toke, 2005; Nguyen et al., 2011; Carvalho & Machini, 2013).

Figura 9: Mecanismos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana. Adaptado de Silva et al. (2014).



A atividade antimicrobiana de PAMs está baseada basicamente no modelo de quatro mecanismos: Barril, Carpete, Toroidal e Detergente (Figura 9). No modelo de Barril, a parte hidrofóbica dos peptídeos interage com as caudas hidrocarbonadas dos lipídios da membrana e a sua parte hidrofílica expõe-se no lúmen, resultando na formação de um poro aquoso transmembranar. No modelo de Carpete ocorre a saturação da membrana bacteriana por moléculas de PAMs, resultando na sua permeabilização (Van't hof et al., 2001; Carvalho & Machini, 2011). O modelo toroidal propõe a formação de poros na membrana lipídica, cujos peptídeos são orientados a adotar uma orientação transmembranar (Brogden, 2005). Finalmente, no modelo detergente ocorre através da desestabilização da membrana pelos PAMs e a subsequente formação de micelas (Silva et al., 2014).

Os PAMs não só atuam sobre a membrana bacteriana, mas podem também executar as atividades dos componentes intracelulares, atuando sobre o metabolismo celular, inibindo as fases da divisão celular, a síntese de proteínas e da parede celular. Alguns peptídeos desempenham um papel imunomodulador, estimulando a resposta imunitária humoral do hospedeiro contra o patógeno, induzindo processos quimiotáticos com a liberação de citocinas e

quimiocinas, além de possuir uma atividade anti-inflamatória e anti-endotoxina (Kindrachuck et al., 2010).

Portanto, peptídeos como os citados anteriormente e outros diversos já isolados, vêm representando ferramentas em potencial no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e biotecnológicos, devido principalmente a sua potente atividade antimicrobiana.

2.6.1. Clavaninas

As clavaninas representam uma classe de peptídeos antimicrobianos isolados a partir de hemócitos de um invertebrado marinho denominado *Styela clava* (Figura 10) (Van kan et al., 2003). Este organismo é um tunicado simples que pertence ao filo cordata e habita principalmente regiões entre marés, a profundidades acima de 25m e com temperaturas que variam de -2°C a 23°C (Lee et al., 1997).

Figura 10: *Styela clava*, tunicado do qual foi isolado o PAM Clavanina.

*Fonte:(<http://pnwscuba.smugmug.com/Invasive-Tunicates/Styela-clava>) /2015.



A partir da *Styela clava* foram isoladas famílias de peptídeos antimicrobianos, dentre os quais estão as Clavaninas. Estas apresentam conformação α -hélice, terminal C amidado e algumas possuem um resíduo de tirosina metilado. As clavaninas formam uma família de peptídeos com estruturas homólogas constituídas por 23 resíduos de aminoácidos, ricas em histidinas, glicinas e fenilalaninas, o que as distingue de outros PAMs. As isoformas que compõem a família das Clavaninas são “A”, “B”, “C” e “D” (Tabela 1) (Van kan et al., 2003).

Tabela 1: Sequências primárias das clavaninas A-D. Fonte: Lee et al (1996).

Clavaninas	Sequências primárias
A	VFQFL GKIIH HVGNF VHGFS HVF-NH₂
B	VFQFL GRIIH HVGNF VHGFS HVF-NH₂
C	VFHLL GKIIH HVGNF VYGFS HVF-NH₂
D	AFKLL GRIIH HVGNF VYGFS HVF-NH₂

As Clavaninas atuam diferentemente de acordo com o pH do ambiente que estão inseridas, o qual interfere no mecanismo de permeabilização da membrana alvo. Em pH neutro, o peptídeo adquire carga ligeiramente positiva e as bicamadas da membrana são desestabilizadas de forma inespecífica. Em pH 5,5 as histidinas são protonadas potencializando a ação antimicrobiana das Clavaninas. Em pH mais elevado, as bicamadas lipídicas não são eficientemente permeabilizadas, sugerindo que neste grau de pH o peptídeo usa outro mecanismo de morte celular, como por exemplo, a interação com proteínas envolvidas na translocação de prótons (Van Kan, Demel, Bent & Kruijff, 2003).

Van Kan et al (2003) demonstraram que a atividade antimicrobiana da Clavanina A por permeabilização da membrana está intimamente ligada a resíduos de glicina presentes em sua sequência primária. As glicinas nas posições 6 e 13 facilitam a formação da α -hélice e permitem o caráter anfipático da molécula aumentando a afinidade com membranas fosfolipídicas (Van Kan et al., 2001).

Apesar da Clavanina A se destacar como um peptídeo que se apresenta eficaz atividade contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *Micrococcus flavus*), Gram-negativas (*E. coli*, *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae*) e desempenhar também um papel imunomodulador, esse peptídeo ainda se encontra carente de estudos que demonstrem sua eficácia *in vivo*, assim como de análises estruturais (Lee et al., 1997; Van Kan, Demel, Breukink et al., 2002; Otero-gonzalez et al., 2010).

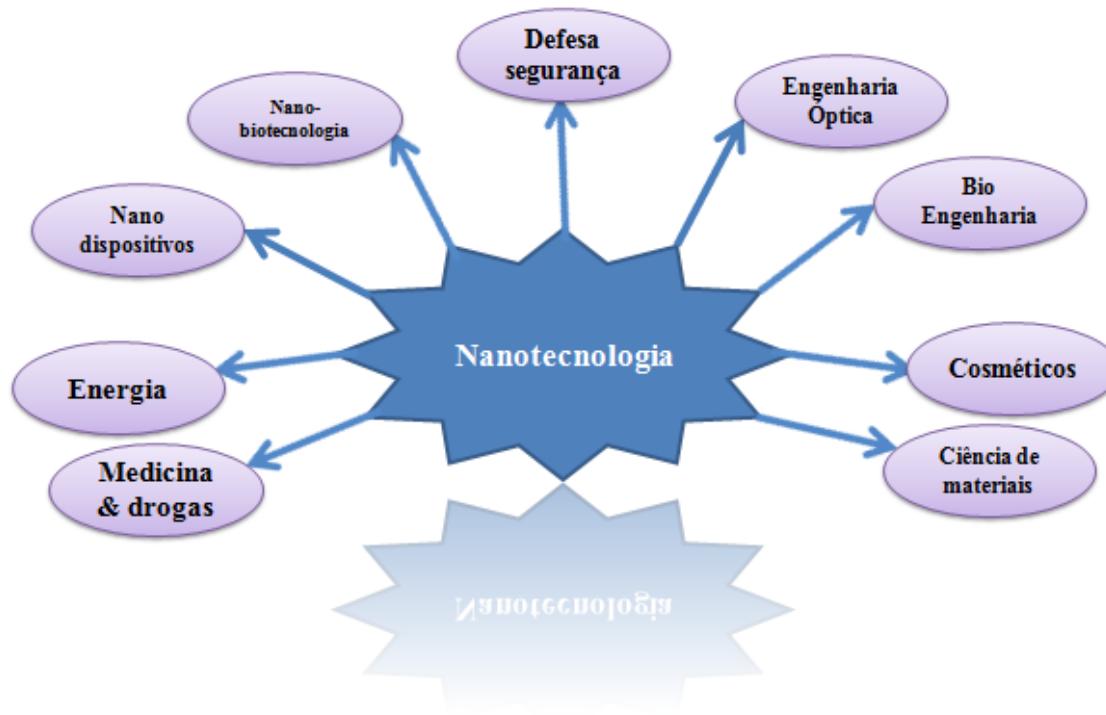
2.7. Nanobiotecnologia

Nanobiotecnologia é um termo que descreve a convergência de duas ciências um pouco distantes, a engenharia e a biologia molecular. Enquanto engenheiros vêm trabalhando nas últimas três décadas em busca do desenvolvimento de estruturas em escala nanométrica, tais como chips eletrônicos. Biólogos há muitos anos têm se dedicado ao domínio das dimensões moleculares e celulares. Logo, a combinação destas disciplinas tem grande relevância, uma vez que pode resultar em novas classes de dispositivos e sistemas multifuncionais para a área biológica e de análise química, melhorando a eficiência, sensibilidade e especificidade de tais sistemas (Fortina, Kricka, Surrey & Grodzinski, 2005).

Dessa forma, a nanotecnologia envolve a caracterização, fabricação e ou manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais que tenham pelo menos uma dimensão na faixa de 1-100nm (Duncan, 2011). Nesta escala, e principalmente abaixo de 5nm, as propriedades da matéria diferem significativamente, ou seja, os efeitos quânticos desempenham um papel mais importante do que em uma escala maior (Logothetidis, 2012).

Além dos vários usos industriais, a nanotecnologia vem trazendo grandes inovações com aplicações significativas na área da farmácia, cosmética, biotecnologia, alimentos processados, engenharia química, eletrônica, mecânica, ciências ambientais, entre outras (Figura 11) (Logothetidis, 2012).

Figura 11: Aplicações da nanotecnologia. Fonte: (<http://www.slideshare.net/vaibhavvit1/nanotechnology-42760017>.) 2015.

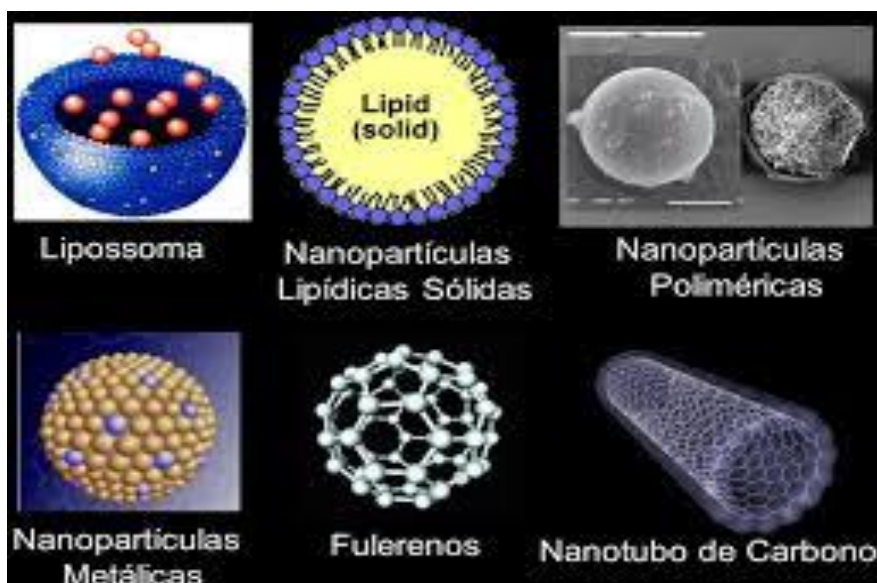


Nos últimos anos, o campo da nanotecnologia tem experimentado rápido crescimento em artigos científicos, publicações de patentes e áreas de aplicação, assim como, tem sido amplamente reconhecida como um indicador da competência tecnológica de uma nação. Desde 2001, os Estados Unidos vem aumentando seu financiamento público para pesquisas em nanotecnologia e desenvolvimento. Em 2001 os gastos foram de \$464.000.000 e em 2013, de quase \$1.550.000.000. Outros países como, China, Alemanha, Japão, Coréia e o Brasil, também estabeleceram programas para financiar o desenvolvimento da área nanotecnológica. O investimento global em nanotecnologia do setor público foi de cerca de \$7,9 bilhões em 2012, com um adicional de \$10,0 bilhões de financiamento corporativo (Liu, Jiang, Chen et al., 2014).

Embora com atuação em várias áreas, a nanotecnologia possui maior impacto na tecnologia médica. Muitas aplicações revolucionárias, tais como novas tecnologias de sensoriamento e modificação de superfície estão sendo amplamente desenvolvidas. Neste contexto, os nanomateriais passam a representar peças chaves no desenvolvimento dessas novas

tecnologias (Figura 12). Estes não se resumem apenas as nanopartículas, mas também aos materiais nanoestruturados, uma vez que as interações físicas na interface entre estruturas biológicas e materiais em nano escala têm sido cruciais para determinadas respostas biológicas (Roszek, Jong & Geertsma, 2005).

Figura 12: Exemplos de nanomateriais. Fonte: (<http://slideplayer.com.br/slide/361949/>) 2015.



Nanopartículas (NPs) são partículas com dimensão menor do que 1 micrón. Podem ter forma amorfa ou cristalina e suas superfícies podem atuar como agente de transporte para gotas de líquidos ou gases. A matéria nanoparticulada deve ser considerada um estado da matéria distinta que vai além do estado sólido, líquido, gasoso e de plasma, devido a suas propriedades que inclui grande área de superfície e efeitos quânticos (Buzea, Blandino & Robbie, 2007).

NPs estão sendo usadas para diversos fins, desde tratamentos médicos, utilização na indústria de produção de baterias solares, de combustíveis, até a ampla incorporação em diversos materiais para consumo, como cosméticos e roupas (Hasan, 2014). Uma das mais relevantes aplicações das nanopartículas na área médica está relacionada com a entrega de drogas, assim como com o diagnóstico de doenças. As nanopartículas também podem contribuir para o desenvolvimento de superfícies e sistemas “inteligentes”, com características importantes, como resistência, leveza e em alguns casos ação antimicrobiana (Abhilash, 2010).

Os nanomateriais são geralmente classificados quanto a: (buzea et al., 2007):

- a) Dimensionalidade: I) **1D**, refere-se a filmes tipicamente finos ou revestimentos de superfície que são cultivados de forma controlada para resultar na espessura de apenas um átomo, sendo assim chamado de monocamada. Ex: circuitos de chips de computador, revestimentos antirreflexo de óculos de grau. II) **2D**, são nanomateriais que possuem duas dimensões na escala nanométrica, incluem filmes nanoestruturados, cujas nanoestruturas estão firmemente ligadas a um substrato; assim como partículas livres de maior proporção também são consideradas nanomateriais 2D. III) **3D** corresponde a materiais que são nanométricos em todas as três dimensões. Ex: filmes finos depositados em escala atômica, colóides e nanopartículas livres com várias morfologias.
- b) Morfologia: são levadas em conta a planicidade, esfericidade, assim como o aspecto (esférico, oval, cúbico, prisma ou helicoidal). Neste caso, as partículas podem existir na forma de pós, suspensões ou coloides.
- c) Composição: NPs encontradas na natureza são compostas por vários materiais, já os materiais de composição única são obtidos por síntese que envolve uma variedade de métodos.
- d) Uniformidade e aglomeração: são características baseadas na química e nas propriedades eletromagnéticas das NPs. Estas podem existir dispersas em aerossóis, como suspensões ou coloides e em estado aglomerado. Neste último estado, as nanopartículas podem se comportar como partículas maiores, dependendo do tamanho do aglomerado. Logo, durante a aplicação das NPs devem ser considerados seu tamanho, aglomeração, forma e reatividade superficial, de acordo com a regulamentação ambiental e da saúde.

2.7.1. Nanopartículas magnéticas

Materiais nanoestruturados possuem propriedades únicas, tais como, magnéticas, elétricas, químicas e estruturais, que permitem o seu uso em uma grande variedade de aplicações, incluindo o armazenamento de informação, fluidos magnéticos, biosensoriamento e engenharia biomédica (Vatta, Sanderson & Koch, 2006).

NPs magnéticas (NPMs) possuem propriedades magnéticas únicas, como o superparagnetismo, alta coercitividade, baixa temperatura de Curie e susceptibilidade magnética (Figura 13). Tais propriedades podem proporcionar uma ligação seletiva de uma molécula funcional e o seu alvo, e permitem a manipulação e o transporte para o local desejado, através do controle do campo magnético produzido por um eletroímã ou ímã permanente (Vatta, Sanderson & Koch, 2006; Wu, He & Jiang, 2008).

Figura 13: Nanopartículas de magnetita. Fonte: (<http://www.imagens.usp.br/?p=5260>) 2015.



NPMs são utilizadas em bioaplicações importantes, incluindo biosseparação magnética e detecção de entidades biológicas (células, enzimas, proteínas, vírus, bactérias, etc.), no diagnóstico (contraste em RMN - Ressonância Magnética Nuclear) e terapêutica (HFM - Hipertermia do fluído magnética, direcionamento da entrega de drogas) (Wu et al., 2008).

HFM é uma promissora terapêutica utilizada para o combate do câncer, uma vez que o calor dissipado a partir de NPs superparamagnéticas, submetidas a um campo magnético alternado, é utilizado para incentivar danos ou morte celular em tecidos tumorais alvo. A terapia pode ser usada em conjunto com quimioterapia e radioterapia convencionais, promovendo assim, uma resposta mais efetiva (Khandhar, Ferguson, & Krishnan, 2011).

Nos últimos anos as nanopartículas magnéticas de maior interesse a serem investigadas têm sido as de óxido de ferro, incluindo a magnetita Fe_3O_4 e $\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}_2^{\text{III}} \text{O}_4$ (ferromagnéticos e superparamagnéticos), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematita, fracamente ferromagnético ou antiferromagnético), $\gamma\text{-}$

Fe_2O_3 (magnetita, ferromagnética), FeO (Wustita, antiferromagnética) e $\xi\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Wu et al, 2008). Estas representam uma família de candidatos mais adequados para a preparação de nanocompósitos magnéticos devido as suas propriedades de superparamagnetismo, além de biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e baixo custo (Prucek, tu cek, Kilianová et al., 2011).

A maioria dos outros materiais magnéticos, tais como o Cobalto (Co) tem uma magnetização de saturação bem superior em comparação ao óxido de ferro, mostrando assim, uma resposta magnética mais eficaz. Porém, estes materiais são tóxicos. A magnetita (Fe_3O_4) e magnetita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os únicos materiais magnéticos que podem ser utilizados por seres humanos sem causar nenhum dano à saúde, de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*). Nps de óxido de ferro são consideradas benignas para o corpo, principalmente porque o óxido de ferro é dissolvido sob condições ácidas. Além disso, os íons de Fe^{3+} resultantes podem ser armazenados no organismo, uma vez que a quantidade de ferro armazenada pode ser de 3-5 gramas para um adulto. Portanto, NPs de ferro são promissoras e vantajosas para a maioria das aplicações biomédicas (Khandhar et al., 2011; Amstad, Textor & Reimhult, 2011).

2.7.2. Síntese de NPs magnéticas

Os tipos de aplicações das NPs magnéticas são altamente dependentes da estabilidade das mesmas, o que está intimamente ligada ao método de síntese utilizado. Os métodos populares de síntese de NPMs incluem a co-precipitação, decomposição térmica, síntese de micelas, síntese hidrotérmica e as técnicas de pirólise a laser (An-hui lu, Salabas & Ferdi, 2007).

Neste trabalho iremos destacar a técnica de co-precipitação por ser a mais comumente utilizada, de simples e rápido manuseio. O método de co-precipitação é um método de síntese de Fe_3O_4 cuja taxa de sucesso é de 96-99,9% (Hariani, Faizal, Ridwan, Marsi, & Setiabudidaya, 2013). Neste método são misturadas soluções de sal de Fe^{2+} e Fe^{3+} seguida da adição de uma base inerte sob temperatura ambiente ou elevada. O tamanho, forma e composição das nanopartículas magnéticas depende muito do tipo de sais utilizados, da proporção de Fe^{2+} e Fe^{3+} ,

da temperatura de reação e do pH. Utilizando condições fixas é possível obter NPs Fe_3O_4 de qualidade e reprodutíveis (An-Hui lu et al., 2007).

Algumas partículas têm um melhor desempenho quando o tamanho destas fica abaixo de um valor crítico, o que depende do material, e corresponde a cerca de 10-20nm. No entanto, um problema associado com tais partículas pequenas está no fato de que estas tendem a formar aglomerados com o tempo, para reduzir a elevada energia associada à relação volume-área de superfície das nanopartículas. Além disso, nanopartículas metálicas são facilmente oxidadas pelo ar, o que resulta na perda de magnetismo e na sua capacidade de dispersão. Portanto, é importante o desenvolvimento de estratégias para proteção das NPs, prevenindo sua desestabilização e degradação pós-síntese (An-hui lu, Salabas & Ferdi, 2007).

Um grande desafio na produção de NPs magnéticas estáveis é a prevenção ou minimização da aglomeração das partículas. Para isso, já se sabe que alguns monômeros, polímeros e materiais orgânicos podem ser utilizados. Um exemplo, é o do ácido oleico (AO), um agente tensoativo utilizado para estabilizar NPMs sintetizadas por co-precipitação. A camada de AO dispersa as NPs impedindo a formação de grandes aglomerados, devido ao dipolo magnético (Nicolás, Salet, Troiani, Zysler, Iassalle & Ferreira, 2013).

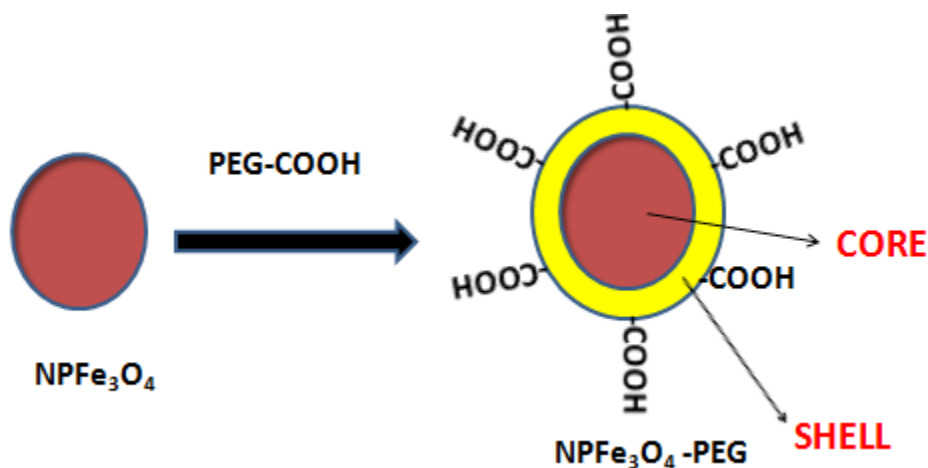
2.7.3. Funcionalização das Nanopartículas Magnéticas

O revestimento da superfície das NPMs com determinados materiais é importante na sua estabilização e funcionalização. Tal modificação pode tornar as partículas mais solúveis e estáveis sob condições fisiológicas. Para isso, as nanopartículas têm suas superfícies revestidas por grupos funcionais, tais como, amina, ácido carboxílico e tiol, o que as torna preparadas para aplicações biomédicas seguras, pois melhora sua estabilidade, carga de superfície, funcionalidade e capacidade de segmentação (Muthia, Park, Cho, 2013).

O polímero ideal para o revestimento das nanopartículas deve ter uma elevada afinidade pelo óxido de ferro, porém não pode ser capaz de estimular o sistema imunológico, ou seja, não pode apresentar antigenicidade, e deve ser biocompatível para que aplicações *in vivo* sejam possíveis (Muthia et al., 2013).

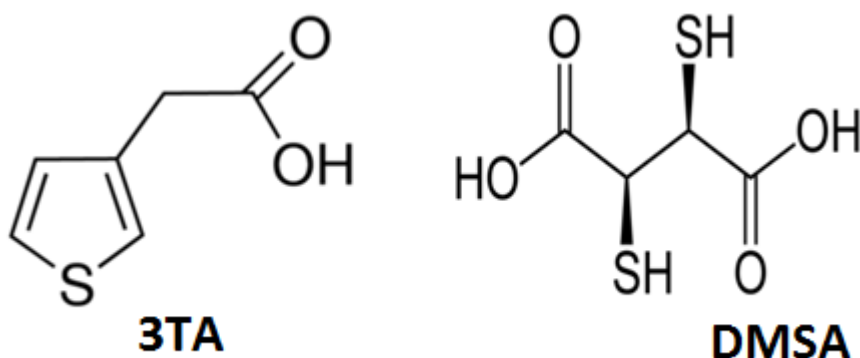
A criação de camadas de polímeros orgânicos ou inorgânicos na superfície das partículas gera condições para a adição de moléculas bioativas, logo ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos ficam ligados à magnetita por meio de um invólucro polimérico (tipo núcleo-casca) (Figura 14). Para criação deste invólucro, muitos pesquisadores vêm utilizando o ácido 3- tiofenoacético (3TA), polietilenoglicol (PEG) ou ácido 2,3-meso-dimercaptossuccínico (DMSA) (Lee, Choa, Kim & Hyeon Kim, 2011).

Figura 14: Esquema da superfície de uma NP de magnetita revestida com PEG (núcleo-casca).



A superfície modificada com 3TA e DMSA (Figura 15) torna-se hidrofílica devido à grande quantidade de grupos -COOH e, portanto, se dispersa melhor em solução aquosa. O PEG possui resíduos hidrofílicos não carregados e elevada mobilidade superficial, o que melhora a biocompatibilidade das nanopartículas (Lee et al., 2011).

Figura 15: Fórmulas estruturais do ácido 3- tiofenoacético e ácido 2,3-meso-dimercaptossuccínico.



2.8. Imobilização de peptídeos antimicrobianos em superfícies.

Embora apresente uma eficaz atuação antimicrobiana, o uso sistêmico dos peptídeos antimicrobianos ainda é limitado. Tal limitação está intimamente ligada à toxicidade dos PAMs, geralmente relacionada com as concentrações elevadas utilizadas para compensar a semivida relativamente curta dos PAMs, devido à rápida digestão por proteases e a agregação peptídica. Dessa forma, a adesão de peptídeos antimicrobianos a determinadas superfícies com o intuito de formar filmes antimicrobianos vem sendo uma aplicação viável e bastante explorada no desenvolvimento de biodispositivos (Haynie, Crum & Doelee, 1995; Willcox, Hume, Aliwarga, Kumar & Cole, 2008; Costa et al., 2011).

Os peptídeos antimicrobianos se tornaram bastante atraentes em relação aos antibióticos convencionais devido ao seu largo espectro de atividade, seletividade e resistência bacteriana mínima (Cleophas, Sjollem & Busscher et al., 2014). Logo, a imobilização de PAMs em superfícies representa uma alternativa importante no combate contra bactérias resistentes (Bagheri, Beyermann & Dathe, 2009; Rapsch, Bier, Tadros & Nickisch-Rosenegk, 2014).

Já foi relatada a imobilização de peptídeos antimicrobianos em vários tipos de superfícies sólidas, tais como, resinas, vidro, silicone, aço inoxidável e titânio (Hancock & Sahl, 2006; Alves & Pereira, 2014). As resinas, no momento, têm sido utilizadas apenas para o estudo do mecanismo de ação de peptídeos ativos, não sendo utilizadas para aplicações clínicas (Appendini

& Hotchkiss, 2001; Bagheri et al., 2009). Existem poucos estudos sobre imobilização de PAMs em vidro. Em um deles, o peptídeo catiônico modificado melamina foi imobilizado covalentemente em uma superfície de vidro através dos ligantes como ácido 4-azidobenzóico (ABA) e ácido 4-fluoro-3-nitrofenil (Chen, Cole, Willcox et al., 2009).

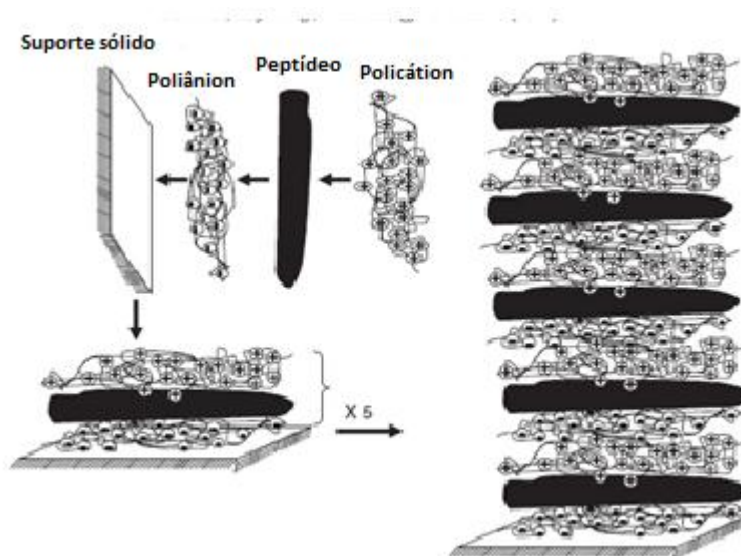
O titânio é um dos materiais mais utilizados para implantes em aplicações dentárias e ortopédicas (Bencharit et al., 2014; Vanderleyden et al., 2014). Gallardo-Godoy et. al. (2014) determinou a atividade antibacteriana *in vitro* do peptídeo derivado da Lactoferrina humana hLf1-11 ancorado a superfícies de titânio. O trabalho demonstrou uma redução notável na adesão bacteriana e nas fases iniciais da formação do biofilme de *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus salivarius* (Godoy-Gallardo, Mas-Moruno, Fernández-Calderón, 2014).

O silicone é um polímero sintético aplicado na fabricação de dispositivos médicos e próteses (ex. cateteres, stents e outros) quem vem sendo muito utilizado para imobilização de peptídeos e destinado aos campos biomédicos e farmacêuticos (Ashar, Ward & Turcotte, 1981; Briganti, Losi, Raffi, Scoccianti, Munao & Soldani, 2006). CW11, RK1 e RK2 são peptídeos sintéticos que foram imobilizados em superfícies de silicone. CW11 é rico em triptofano e arginina, ligando-se melhor a superfície das bactérias; possui baixa toxicidade e demonstrou excelente atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. RK1 e RK2 (derivados da β -defensina-28 variante humana) são constituídos por arginina, lisina, resíduos de triptofano e apresentam amplo espectro antimicrobiano e tolerância a condições salinas. Estes quando imobilizados em superfícies de cateteres urinários de silicone mostraram atividade antibiótica contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* (Li, Saravanan, Basu, Mishra et al., 2014).

A imobilização de PAMs em superfícies pode ser realizada por métodos físicos, via adsorção ou montagem camada por camada (layer-by-layer, LbL) ou métodos químicos, através da formação de ligações covalentes (Onaizi & leong, 2011).

O método LbL é simples e muito utilizado no revestimento de várias superfícies. Este método se baseia na deposição alternada de policações e poliânions em substratos sólidos (Figura 16). Uma grande variedade de filmes funcionais já foi preparada utilizando a incorporação de camadas múltiplas de vários compostos, incluindo proteínas e peptídeos (GODDARD & HOTCHKISS, 2008).

Figura 16: Modelo de imobilização de peptídeos pelo método físico. Fonte: Adaptado de Onaizi et al.(2011).



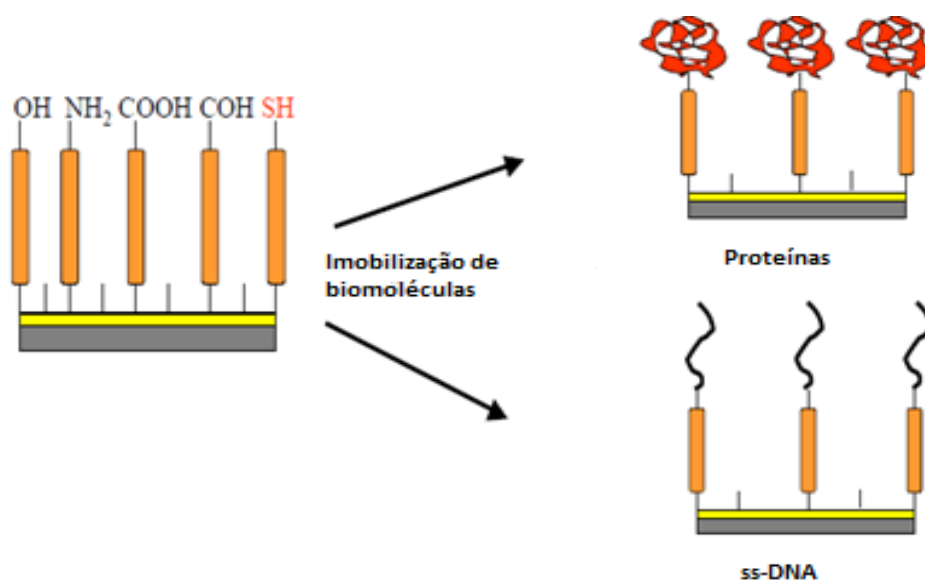
Os métodos físicos são baseados em ligações de hidrogênio, dipolos permanentes, interações dipolos induzidos (forças de Van der Waals ou forças de dispersão de London), interações hidrofóbicas e interações iônicas entre os PAMs e as superfícies (Stendahl, Rao, Guler & Stupp, 2006). Não causam alterações químicas no peptídeo funcional mantendo a sua estabilidade conformacional retendo moléculas de água entre as matrizes (Shukla, Fleming, Chuang, Chau et al, 2010).

No entanto, uma das principais desvantagens dos métodos físicos é que o processo de difusão dos PAMs através das camadas para atingir a interface, torna-se bastante complexo, devido a fatores como: tortuosidade, espessura da camada e interações peptídeo-polímero. Tais fatores podem produzir um impacto significativo sobre o processo de difusão e consequentemente a atividade do peptídeo (Onaizi & Leong, 2011).

Por outro lado, a imobilização química de PAMs é uma estratégia alternativa para o revestimento de superfícies, uma vez que uma melhoria da estabilidade peptídeo sobre as superfícies. Como resultado, a duração da eficácia antimicrobiana é aumentada, além de reduzir os riscos de toxicidade, pois impede a lixiviação dos peptídeos (Bagheri et al., 2009).

A imobilização química envolve a formação de pelo menos uma ligação covalente entre a superfície e a biomolécula, responsável por fornecer estabilidade ao filme antimicrobiano (Costa et al., 2011; Rapsh et al., 2014). Para isso, são necessários grupos químicos funcionais nas biomoléculas assim como, nas estruturas de superfície (Figura 17) (Karam, Jama, Dhulster & Chihib, 2013; Appendini & Hotchkiss, 2002).

Figura 17: Modelo de imobilização química de biomoléculas. Fonte: (<http://www.esson.fr/>)/2015.



Existem vários métodos de acoplamento químico que podem ser utilizados na imobilização de PAMs em superfícies. De acordo com Onaizi e leong (2011), podemos citar:

- Superfícies funcionalizadas com aldeído: ligam covalentemente PAMs através da formação da ligação imina entre as superfícies funcionalizadas e as moléculas peptídicas. O cianoboro-hidreto de sódio (NaBH₃CN) estabiliza a ligação, convertendo-a em ligação amina;
- Superfícies funcionalizadas com ácido carboxílico: Estes grupos são em primeiro lugar ativados com 1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) e, em seguida, com N-hidroxisuccinimida (NHS), antes da introdução do peptídeo. A ligação ocorre entre o grupo -COOH da superfície com o grupo -NH₂ do peptídeo;

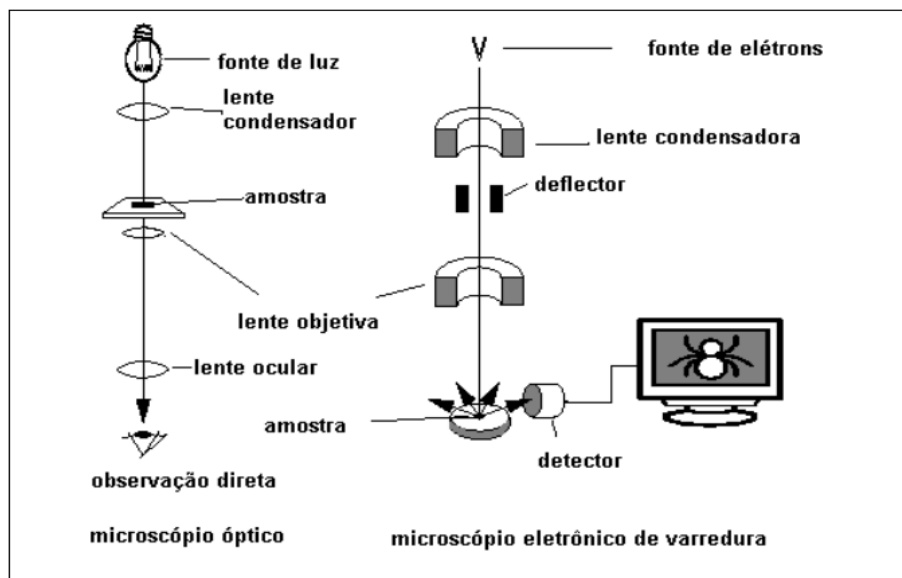
- Superfícies funcionalizadas com grupos amina: Neste método os grupos carboxílicos do peptídeo são ativados utilizando EDC e NHS que irão formar a ligação peptídica com os grupos amina do peptídeo a ser imobilizado.

2.9. Técnicas de microscopia eletrônica utilizadas para a análise dos cateteres modificados

2.9.1. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Um microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (Figura 18) (Dedavid et al, 2007).

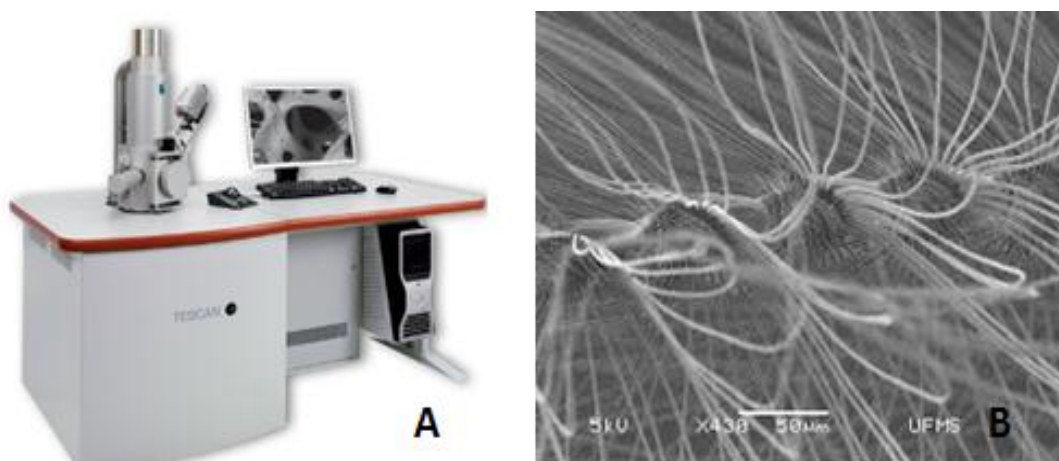
Figura 18: Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Fonte: (<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAC8cAD/>) /2015.



É um dos mais versáteis instrumentos (Figura 19) disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm. Além disso, outra

característica importante é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (Dedavid et al, 2007).

Figura 19: (A) Microscópio eletrônico de varredura e (B) Imagem de MEV da antena de um pernilongo. Fonte: Figura A (<http://estudoobjetos2007.pbworks.com/2015>) e Figura B (<http://ufms.br/research/view/id/22>)/2015.



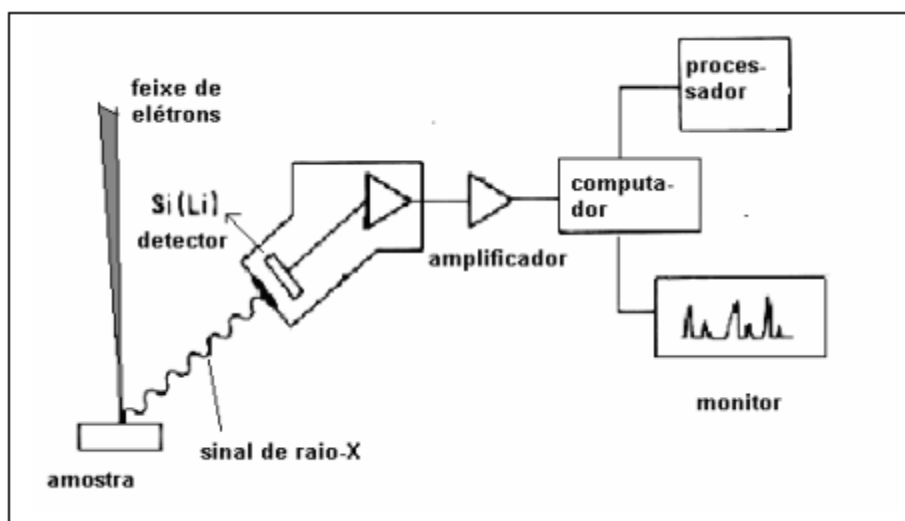
O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons (fonte: filamento de tungstênio-W) de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação (Dedavid, Gomes & Machado, 2007).

Em adição, o microscópio eletrônico de varredura com microanálise permite não só a identificação do material, como o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados, através da emissão de raios x característicos (Duarte et al, 2003).

Na espectroscopia de energia dispersiva (EDS), quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando

os níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, a qual é emitida em forma de comprimento de onda no espectro do raio-x. A energia associada a esse elétron é medida por um detector presente na câmara de vácuo do MEV (Figura 20). Como os elétrons de cada átomo emitem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar os elementos químicos presentes na amostra (Duarte et al, 2003; Dedavid et al., 2007).

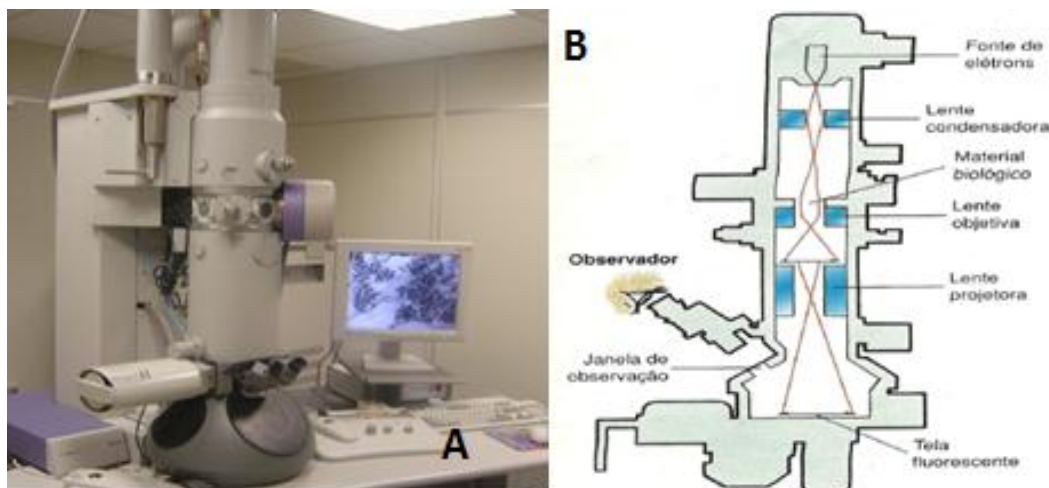
Figura 20: Detector de raio-x usado para EDS. Fonte: Dedavid et al., 2007(Adaptado de Kestenbach, 1994).



2.9.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10⁻⁵ mm Hg (Figura 21) (Reimer,1997).

Figura 21: (A) Microscópio eletrônico de transmissão e (B) Esquema do funcionamento interno de MET. Fonte: Figura A (<http://deolhomicro.blogspot.com.br/2012/10/>) 2015 e Figura B (<http://micro-esalq.blogspot.com.br/2012/03/>) 2015.



Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes servem apenas para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica. Na prática, o intervalo de aumentos do MET varia de 1.000 a cerca de 200.000X. (Reimer, 1997; Galleti, 2003).

O emprego do MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois ele permite definição de imagens intracelulares, permitindo estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação de parasitas com as células, fornecendo informações sobre alterações e efeitos citopáticos ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias e outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia de luz (Galleti, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Modificar a superfície de cateteres com nanopartículas magnéticas e peptídeos antimicrobianos, a fim de obter uma cobertura eficiente que previna a formação de biofilmes em cateteres venosos centrais.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar NPsFe_3O_4 e modificação de suas superfícies;
- Ligar PAMs às nanopartículas modificadas;
- Acoplar dos peptídeos nanoparticulados ao cateter;
- Analisar morfológicamente e estruturalmente das NPsFe_3O_4 e da superfície do cateter através de técnicas de microscopia;
- Avaliar a colonização bacteriana e fúngica na cobertura acoplada ao peptídeo Clavanina A nanoestruturado *in vitro*;
- Desenvolver pelo menos uma cobertura eficiente contendo peptídeos antimicrobianos nanoestruturados com alta eficiência protetora contra a colonização microbiana.

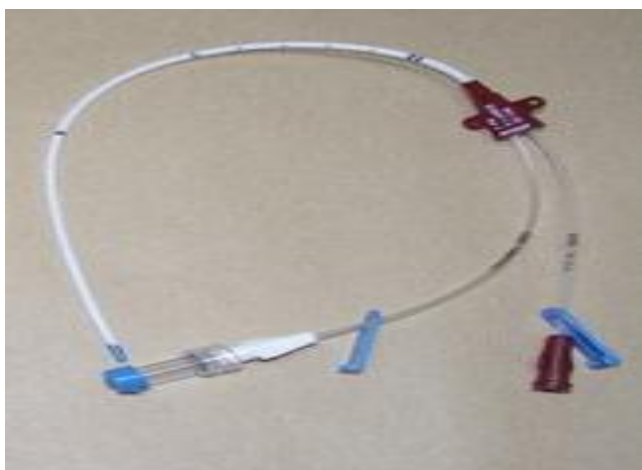
4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Utilizou-se um CVC, duplo lúmen, da Arrow (Figura 22). Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Para tratamento da superfície do cateter foi utilizado: Álcool etílico absoluto, aminopropiltietoxissilano (APTS) e glutaraldeído. A síntese das NPsFe_3O_4 envolveu: Cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Hidróxido de Amônio (NH_4OH). Ácido 2,3-mercaptopuccínico (DMSA), Ácido 3-tiofenoacético (3TA), Acetonitrila e Permanganato de Potássio (KMnO_4) foram utilizados na funcionalização das NPsFe_3O_4 .

A atividade antimicrobiana dos cateteres modificados foi investigada contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Estes foram cultivadas de acordo com métodos microbiológicos padrão, utilizando materiais, soluções e meio de cultura esterilizados. A Clavanina A foi obtida com grau de pureza superior a 95% pela Peptídeos 2.0 (EUA), utilizando o N-9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) e purificado em Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

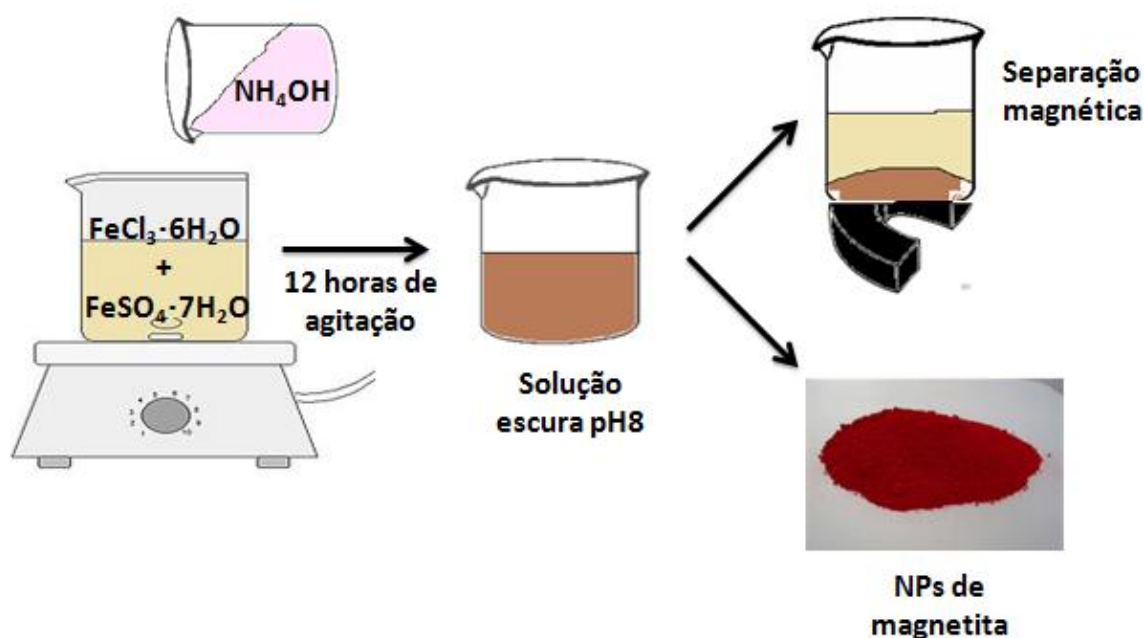
Figura 22: Ilustração do CVC duplo Lúmen. Fonte: (<http://www.centraldeprodutos.com.br/arrow01.html>) / 2015.



4.2. Síntese das NPsFe₃O₄

As NPsFe₃O₄ foram preparadas de acordo com o método de Oliveira et al. (2008). Adicionou-se pequenas quantidades de 1,5M de NH₄OH a 200mL uma solução prévia composta por 0,1 M FeCl₃·6H₂O e 0,5M FeSO₄·7H₂O, sob agitação em agitador magnético, até a obtenção de uma solução escura com pH igual a 8. Após 12 horas de agitação, as partículas foram separadas da solução magneticamente (Figura 23).

Figura 23: Esquema de síntese das NPsFe₃O₄.



4.3. Modificação da superfície das NpsFe₃O₄

As superfícies das nanopartículas foram modificadas usando dois métodos diferentes com base em ácido 3TA e DMSA, como segue (Kim et al., 2010):

a) Modificação da superfície usando 3TA

Inicialmente, foi preparada uma solução de 2mM de 3TA em 10mL acetronitrila. Adicionou-se, em seguida, 0,01g de NPsFe₃O₄ e 2mM de KMnO₄ à solução prévia. A mistura foi

agitada em agitador magnético por 30 minutos a 80°C. Por fim, a solução foi lavada com etanol, por 5 vezes, e as partículas funcionalizadas foram obtidas por separação magnética e secas em estufa.

b) Modificação da superfície usando DMSA

0,01g de NPsFe_3O_4 foram adicionadas a uma solução previamente preparada com 0,3M DMSA e dimetilsulfóxido, sendo agitadas por 24 horas a temperatura ambiente. A mistura então foi lavada por 5 vezes com etanol e as partículas obtidas por separação magnética foram secas em estufa.

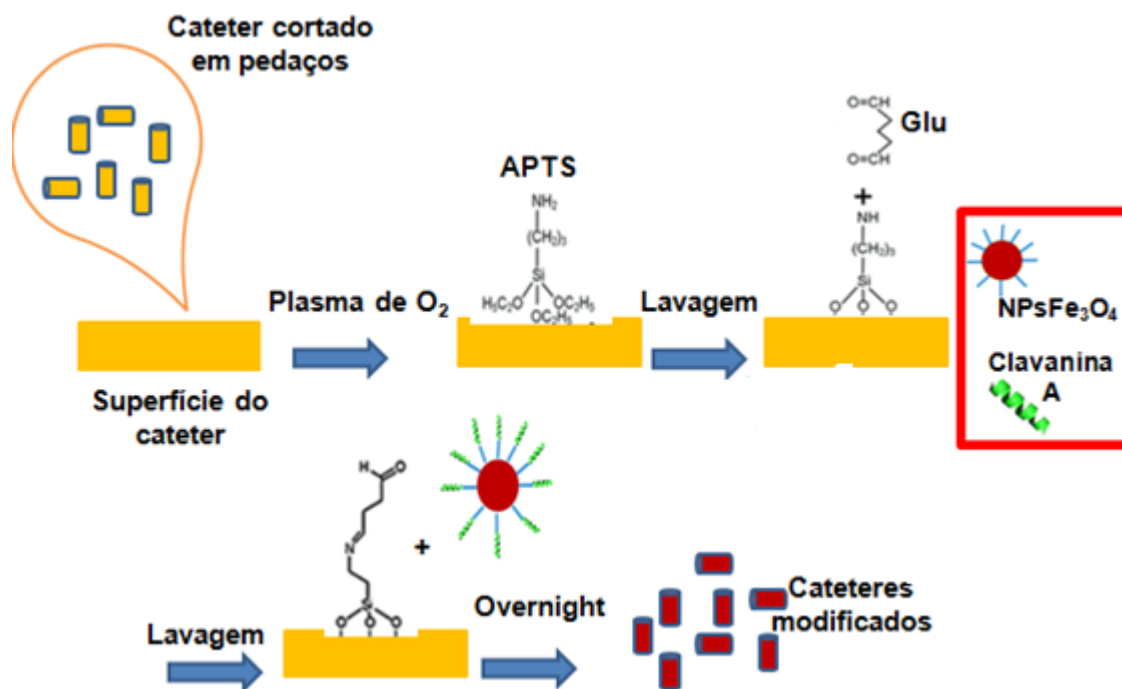
4.4. Ligação química do peptídeo Clavanina A à superfície das NPs modificadas

Inicialmente preparou-se uma solução mista composta por 4mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1mM de N-Hidroxisuccinimida (NHS). Em seguida incubou-se, separadamente, 10mg de NPsFe_3O_4 -3TA e 10mg de NPsFe_3O_4 -DMSA com a solução prévia de EDC:NHS, por 1 hora, para ativação dos grupos carboxílicos (Kim et al., 2010). Logo após, as suspensões foram lavadas com solução tampão fosfato pH 7,4 e finalmente foi adicionado 2mL de uma solução contendo 0,01mg do peptídeo Clavanina A à cada uma das suspensões, as quais foram agitadas em temperatura ambiente por 1 hora.

4.5. Modificação da superfície do cateter de silicone

A modificação da superfície do cateter foi realizada de acordo com o método de Tang et al. (2006) modificado. O cateter foi cortado em pequenos pedaços de 0,5 a 1 cm e submetidos à limpeza com álcool etílico absoluto em banho ultrassônico por 5 min e seco com nitrogênio. Em seguida, as superfícies dos cateteres receberam um tratamento com plasma de oxigênio (Harrick Plasma®) por 5 minutos e logo após, foram incubadas com APTS por 1 minuto. Após a secagem, as amostras foram lavadas com água deionizada (DI) por duas vezes. Por fim, as superfícies foram tratadas com uma solução de 2,5% de glutaraldeído e após lavagem com água DI, foram incubadas overnight com o sistema ClavA-NPs (Figura 24).

Figura 24: Esquema representativo da modificação da superfície do cateter de silicone.



4.6. Análise morfológica

Para a análise morfológica das NPsFe_3O_4 foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão – TEM (FEI, Morgagni 268D, Japão) com o sistema de difração de elétrons. A análise morfológica da superfície do cateter foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura JSM5900 (SEM - JEOL, Japão). Todas as amostras analisadas foram cobertas com uma fina camada de ouro, utilizando um evaporador de metal (BALTEC-DSS-050).

4.7. Cultura dos microrganismos

A atividade antimicrobiana do cateter modificado foi investigada contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Estas foram cultivadas de acordo com métodos microbiológicos padronizados, utilizando materiais, soluções e culturas estéreis.

Todas as bactérias foram cultivadas sob as mesmas condições de tempo e temperatura. As bactérias foram crescidas em meio BHI durante 24 horas a 37°C. A suspensão bacteriana foi

preparada em 5 mL de solução salina a 0,9% até se obter $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, de acordo com a escala de Mac Farland.

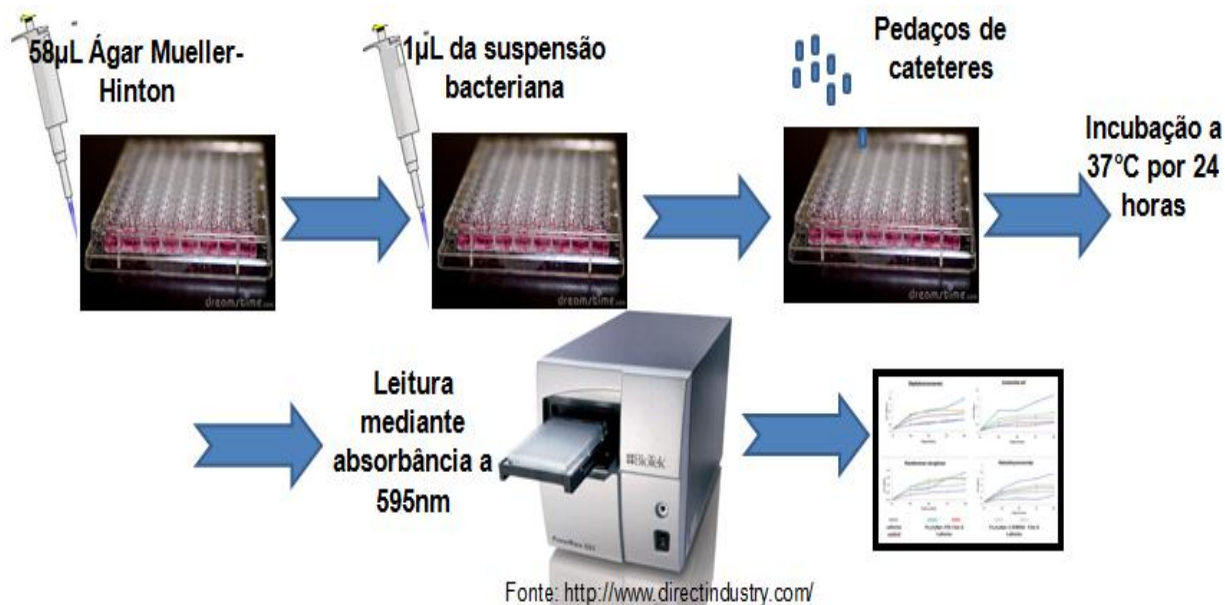
Os isolados de *C. tropicalis*, *C. Krusei* e *C. albicans* obtidos de amostras clínicas de pacientes provenientes de hospitais terciários de Pernambuco com candidemia, classificados através da identificação clássica e confirmados com a técnica de MALDI-TOF (*Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of flight*) (Qian et al., 2008), foram semeados no meio ágar Sabouraud adicionado de 0,5% extrato de levedura e mantidos a temperatura de 37°C durante 24h. Células de levedura foram suspensas em salina a 0,9%, centrifugadas para obtenção do inóculo. Por fim, as células foram lavadas com solução salina 0,9% por três vezes.

4.8. Teste antimicrobiano in vitro

4.8.1. Bactérias X cateteres modificados

.Para avaliar a atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi realizado um ensaio modificado de inibição de crescimento por microdiluição em caldo, segundo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Foi adicionado 58 µL de meio Ágar Mueller-Hinton (Himedia – Índia) a placas de microtitulação de 96 poços, em seguida 1µL da suspensão bacteriana e posteriormente o cateter modificado. O crescimento bacteriano foi avaliado mediante absorbância a 595nm em leitor de microplaca (Bio-Tek PowerWave HT - USA), após 24 horas de incubação a 37°C, utilizando como parâmetro comparativo cateteres não modificados (Figura 25).

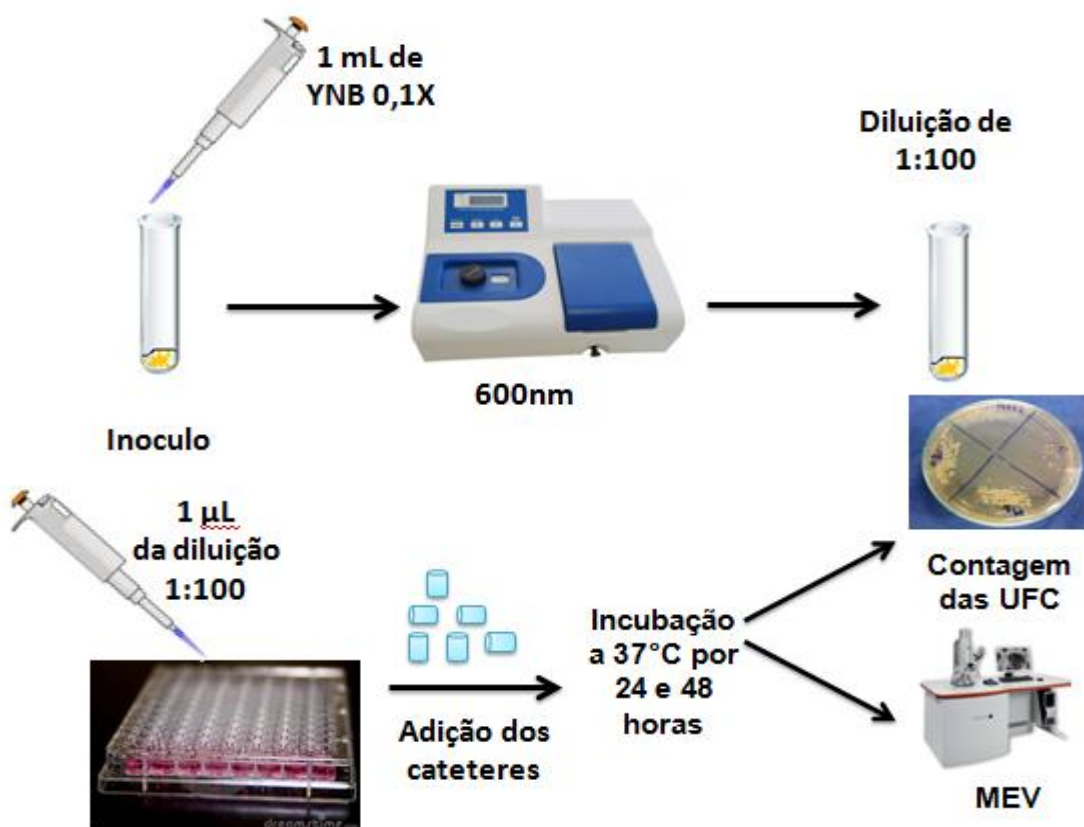
Figura 25: Esquema do teste antimicrobiano bactérias X cateteres modificados.



4.8. 2. Espécies de *Candida* X cateteres modificados

Os inóculos correspondentes as células de *C. tropicalis*, *C. Krusei* e *C. albicans* foram diluídos em Yeast Nitrogen Base 0,1X (YNB, BD, Franklin Lakes, EUA) suplementado a 5 mM de glicose (Sigma-Aldrich) obtendo uma densidade de 0,07% em comprimento de onda de 600 nm, medidos em espectrofotômetro digital. 1µL de uma diluição de 1:100 do inóculo em YNB 0,1X foi adicionado a cada poço nas microplacas contendo os cateteres tratados e não tratados. As placas de microtitulação foram incubadas por 24 e 48 horas a 37°C. Os seguimentos de cateter foram utilizados para posterior contagem de Unidades formadoras de Colônia (UFC) e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Figura 26).

Figura 26: Esquema do teste antimicrobiano *Candida sp.* X cateteres modificados.



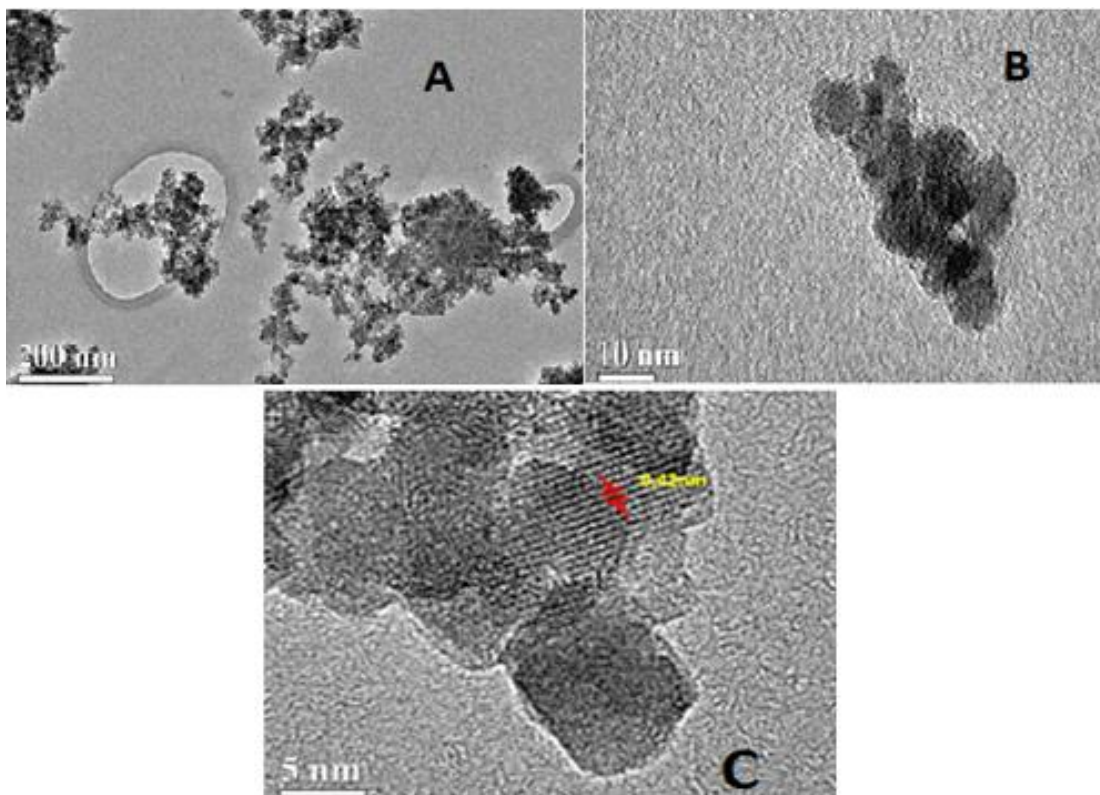
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. 1. Análise morfológica

A fim de obter informações detalhadas sobre a morfologia das Fe_3O_4 Nps sintetizadas no presente estudo, realizou-se a técnica de MET. A figura 27 é formada por imagens de MET referente às NPsFe_3O_4 . Nas imagens 27A e 27B é possível observar a forte tendência que as nanopartículas de magnetita possuem de se aglomerarem. Wu et al. (2008) afirma que tal tendência associa-se ao fato das NPs possuírem uma elevada relação volume/área de superfície e se agregam para minimizar tal energia de superfície.

Em virtude desta tendência a se aglomerar, as NPs sintetizadas tiveram suas superfícies revestidas com 3TA e DMSA, buscando menos agregação e melhoria de sua capacidade de segmentação. Segundo Muthia et al. (2013) tais revestimentos colaboram com a obtenção de partículas solúveis e estáveis para diversas aplicações biológicas.

Figura 27: Micrografias de MET das Fe_3O_4 Nps..



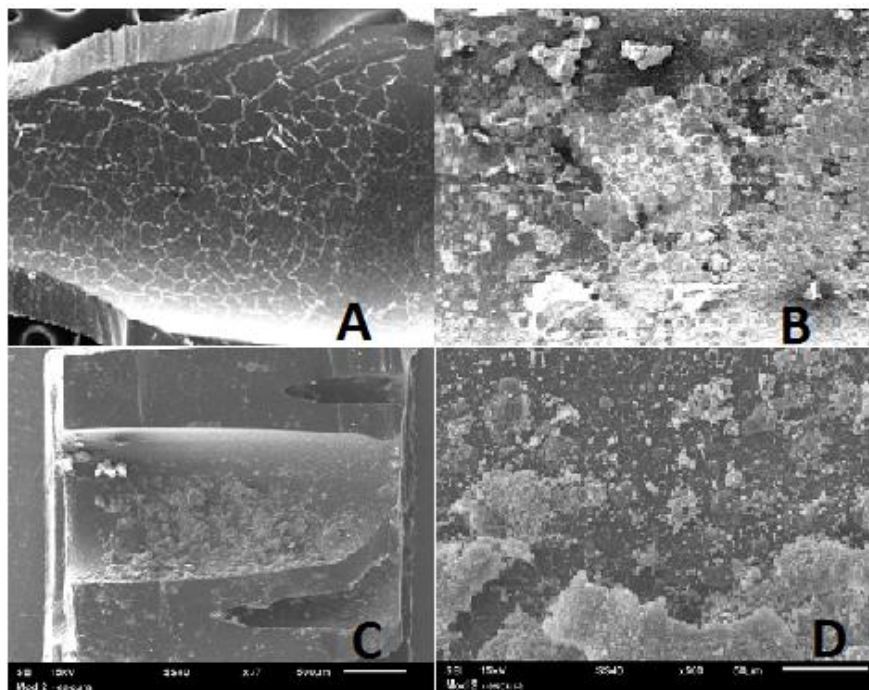
Ainda na figura 27 é possível destacar de forma mais isolada a morfologia das NPs. A figura 27C revelou a presença de NPFe_3O_4 de formato esférico, tamanho homogêneo e diâmetro médio de ~ 10 nm. Esta imagem representa uma microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (High resolution transmission electron microscopy- HRTEM), na qual foi possível observar as franjas da rede atômica da nanopartícula (em destaque), indicando que a mesma é formada por única rede cristalina que corresponde a um espinélio cúbico em virtude da distância encontrada entre os átomos de $\sim 0,42$ nm, medida esta já mencionada por Hu e colaboradores (2010) em seus experimentos com síntese de NPs de magnetita.

Lellouche et al (2012) apresentou em seu estudo a síntese de nanopartículas de MgF_2 para o revestimento da superfície de cateteres venosos de poliuretano, demonstrando a formação de biofilme efetivamente restringida em meios de crescimento e fluidos de interesse biológico. Neste caso a atuação antimicrobiana foi exercida pelas Nps de MgF_2 , as quais penetraram nas células microbianas reduzindo o pH interno e causando o rompimento da membrana.

No presente estudo, os cateteres venosos foram revestidos com NPFe_3O_4 funcionalizadas com Clav A. Segundo Lellouche et al (2012) Por apresentarem grande relação superfície/volume a associação de NPFe_3O_4 à superfícies promove um aumento da reatividade desses nanomateriais, mediada por superfície química. Além disso, de acordo com Vatta et al. (2008) nanopartículas magnéticas apresentam alta coercitividade, propriedade esta que permite o transporte das NPFe_3O_4 pela extensão desejada do cateter, através da ação de um campo magnético externo.

Para facilitar a visualização da modificação do cateter, um corte transversal foi realizado nos cateteres. Nas figuras 28A e 28B são apresentadas a superfície do cateter original e após a modificação, respectivamente.

Figura 28: Micrografias da superfície interna do cateter.

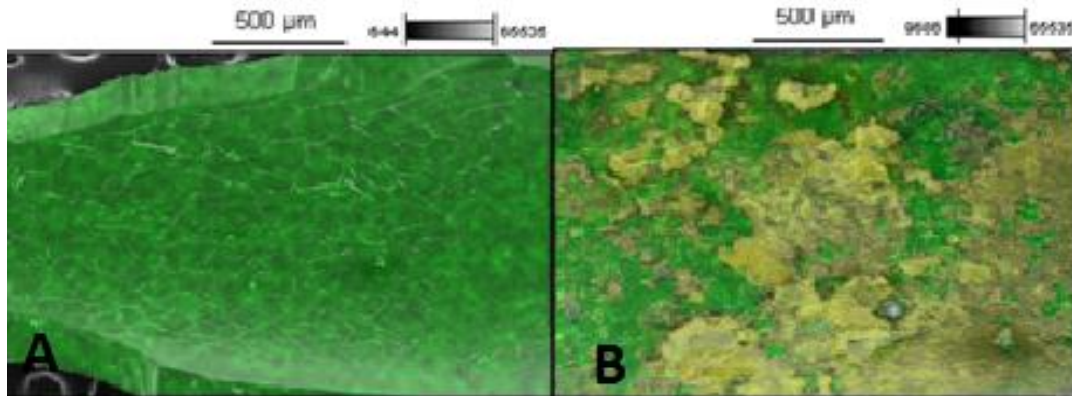


A Figura 28 A mostra a superfície interna do cateter original, antes de receber o sistema NPsFe₃O₄-Clavanina A, o qual apresenta uma superfície em baixo relevo, porém com a presença de ranhuras, as quais facilitam a adesão das NPs à superfície do cateter. A superfície externa do cateter por ser extremamente lisa, sem defeitos, promove menor aderência às partículas, dificultando a modificação do cateter externamente.

Em adição, as figuras 28 B, C e D revelam a presença das nanopartículas aderidas à região interna do cateter, revestindo grande parte de sua superfície, porém demonstrando áreas de maior concentração do que outras.

O mapeamento de EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva) permitiu uma análise qualitativa dos elementos presentes na superfície do cateter após modificação, havendo a confirmação da presença do elemento ferro em forma de nanopartículas. Como mostra a figura 29, que diferencia a superfície original do cateter não modificado com a superfície revestida com ferro (em amarelo).

Figura 29: Mapeamento de EDS. (A) Cateter original e (B) Cateter modificado.



A realização do EDS pontual em três regiões diferentes da superfície interna de uma amostra de cateter modificado revelou a presença não só do elemento ferro, como também, a presença dos elementos alumínio, silício, enxofre e bário em pequenas porcentagens atômicas (Tabela 2). Tais valores foram obtidos através da medição das energias emitidas pelos átomos de cada elemento presente na amostra mediante um feixe de elétrons incidente.

Tabela 2: Porcentagem atômica dos elementos presentes na superfície de cateter modificado.

	(%) Al	(%) Si	(%) S	(%) Fe	(%) Ba
Região 1	21.26	15.83	19.77	29.43	13.71
Região 2	10.95	10.04	10.13	65.02	3.87
Região 3	17.07	18.44	25.74	32.11	6.64

É possível observar na tabela acima que apesar da presença de outros elementos, provavelmente decorrente de contaminações, as maiores porcentagens atômicas são correspondentes ao elemento ferro, com uma das regiões chegando a 65,02%, indicando a presença deste elemento de forma majoritária na superfície do cateter.

5.2. Atividade antibacteriana

Neste estudo foi possível avaliar a atividade antimicrobiana de cateteres modificados frente às bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e fungos do gênero *Candida*

(*C. albicans*, *C. krusei* e *C. Tropicallis*). As amostras de cateteres foram classificadas em três sistemas, de acordo com a modificação realizada: ClavA(NPsFe₃O₄-DMSA)-Cateter; ClavA(NPsFe₃O₄-3TA)-Cateter e Cateter controle (original).

De acordo com os gráficos da figura 30, é possível visualizar que ambos os sistemas foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, porém através das linhas azul claro e roxo, percebe-se que o sistema ClavA(NPsFe₃O₄-DMSA)-Cateter inibiu de forma satisfatória em relação ao cateter controle (linha azul escuro) e como mostra a tabela 3, tal sistema obteve melhores porcentagens de inibição que o sistema ClavA(NPsFe₃O₄-3TA)-Cateter.

Figura 30: Absorbância em função do tempo da atividade antibacteriana dos cateteres modificados em relação ao cateter controle: Cateter controle (linha azul escuro), ClavA(NPsFe₃O₄-3TA) -Cateter (verde e vermelha), ClavA(NPsFe₃O₄-DMSA)-Cateter (lilás e azul claro).

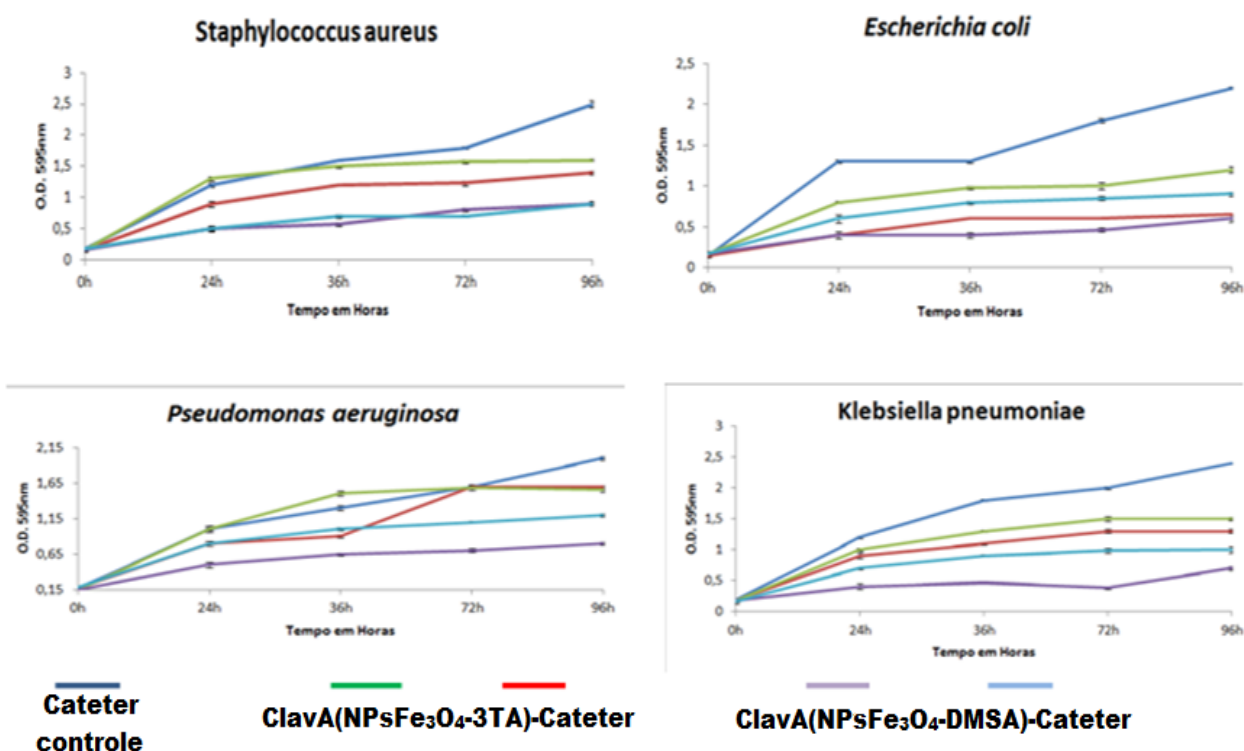


Tabela 3: Porcentagens de inibição para cada bactéria em relação aos dois tipos de modificação dos cateteres, demonstrando a melhor atuação inibitória de ClavA(NPsFe₃O₄-DMSA)-Cateter.

Bactérias	NPsFe ₃ O ₄ -3TA	NPsFe ₃ O ₄ -DMSA
<i>S. aureus</i>	50%	70%
<i>P. aeruginosa</i>	20%	67%
<i>E. coli</i>	80%	90%
<i>K. pneumoniae</i>	48%	80%

Como podemos visualizar, na tabela 3, as maiores taxas de inibição para os dois sistemas são referentes, às bactérias Gram-negativas. Essa classe de bactérias é caracterizada pela presença de grande quantidade de lipopolissacarídeos (LPS) na face externa da membrana e fosfolipídeos na face interna. Em virtude da exposição de grupos carboxil e fosforil, os LPS possuem carga aniônica e se distribuem por uma grande área (Camesano & Abu-Lail, 2003). Logo, a face externa altamente carregada negativamente torna a superfície da bactéria atrativa aos peptídeos catiônicos, no caso a Clavanina A.

Vale ressaltar que a resposta de cada bactéria frente ao peptídeo depende de sua espécie e da quantidade de lipídeos presentes em sua membrana (Ratledge & Wilkinson, 1988). Portanto, observou-se que a *Escherichia coli* apresentou uma maior taxa de inibição (90%), uma vez que, sua membrana externa é composta por aproximadamente 91% de fosfatidiletanolamina, 3% de fosfatidilglicerol e 6% de difosfatidilglicerol (Lugtenberg e Peters, 1976), configurando uma membrana altamente aniônica.

As bactérias *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apesar de serem bactérias Gram-negativas, provavelmente devem possuir uma membrana externa com menor quantidade de carga negativa, em virtude da distribuição dos fosfolipídeos nesta. Além disso, tais bactérias produzem como fator de virulência uma espessa cápsula polissacarídica externamente à membrana (Murray et al., 1992; Gupta et al., 2003) a qual poderia dificultar a inserção do peptídeo.

Adicionalmente, como já mencionado, a Clavanina A é um peptídeo que demonstra um amplo espectro de ação, não só contra bactérias gram-negativas, mas também contra bactérias gram-positivas (van Kan et al., 2003). Portanto, a bactéria *S. aureus* mesmo sendo uma bactéria Gram-positiva, também se torna atrativa aos peptídeos catiônicos, devido à presença dos ácidos teicóico e lipoteicóico que se encontram na camada de peptídeoglicano que reveste a membrana externa desta bactéria (Murray et al., 2006). Porém, é importante ressaltar que bactérias com maior quantidade de cargas negativas em suas membranas, tornam-se mais suscetíveis a PAMs catiônicos (Matsuzaki et al., 1997).

A contagem das Unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada em função da resposta dos fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* frente aos cateteres modificados com $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-DMSA}$, $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-3TA}$, contendo Clavanina A. As placas foram analisadas com 24 e 48 horas de incubação.

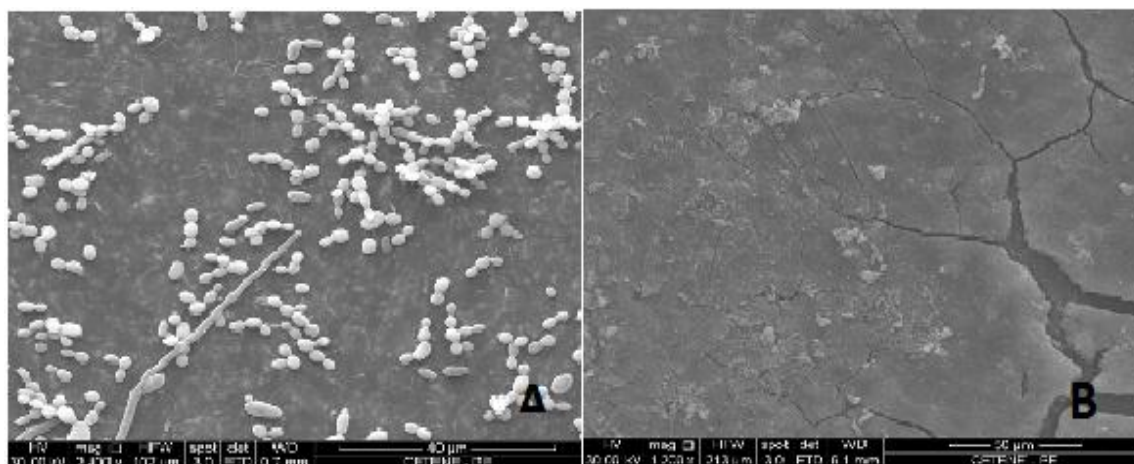
A tabela 4 mostra valores em porcentagem referentes à inibição do crescimento fúngico, na qual se destaca o sistema $\text{ClavA}(\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-3TA})$ - Cateter por ter sido significativo tanto para *C. albicans*, como para *C. krusei*. O sistema $\text{ClavA}(\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-DMSA})$ - Cateter só foi eficiente contra *C. tropicalis*.

Tabela 4: Porcentagens de inibição das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para cada levedura frente aos dois sistemas de modificação dos cateteres em relação ao cateter controle (original).

Leveduras	$\text{ClavA}(\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-3TA})$ - Cateter	$\text{ClavA}(\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-DMSA})$ - Cateter
<i>C. tropicalis</i>	—	100%
<i>C. Krusei</i>	100%	—
<i>C. albicans</i>	60%	—

A microscopia eletrônica de varredura, após o período de incubação, revelou imagens das superfícies dos cateteres e a partir destas, foi possível confirmar a atividade antimicrobiana dos cateteres modificados que já havia sido evidenciada com a contagem das UFC (Figura 31).

Figura 31: Micrografias de MEV dos cateteres modificados e original após incubação com a levedura *C. Tropicalis*. (A) Micrografia do cateter controle mostrando as leveduras de *C. tropicalis* em crescimento e formas típicas. (B) sistema ClavA(NPsFe₃O₄-DMSA) - Cateter, demonstrando crescimento reduzido das leveduras.



Quanto às paredes celulares e membranas plasmáticas de fungos, estas são abundantes em compostos orgânicos que, em pH fisiológico, estão carregados negativamente e conferem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas à superfície celular, tornado-se atrativas para PAMs catiônicos. As paredes celulares são ricas em manoproteínas contendo cadeias longas e ramificadas com ligações *N*-glicosídicas entre resíduos manosil e cadeias menores lineares de manana unidas por ligações *O*-glicosídicas (que constituem cerca de 30-40% do peso seco da parede celular), quitina e cadeias β -1,3 e β -1,6 glucanas. Já as membranas plasmáticas, elas são constituídas de proteínas (52%), de fosfolípídeos (7%) e de ergosterol (4%), além de outros compostos minoritários (Nelson et al., 2005).

O mecanismo de ação do peptídeo Clavanina A sobre células fúngicas ainda não foi totalmente elucidado. Contudo, estudos relacionados a derivados sintéticos de peptídeos provenientes de tunicados, evidenciaram que tais PAMs são capazes de interagir com β -1,3-glucana, componentes da parede da célula fúngica, promovendo a partir daí a formação de poros na membrana e consequentemente, lise e morte celular (Janga et al., 2006).

Além disso, a Clavanina A não só possui características catiônicas e anfipáticas, como também apresenta uma sequência rica em histidina fenilalanina e resíduos de glicina (Silva et al., 2014). O fato de este peptídeo possuir histidinas em sua sequência faz com que possamos sugerir que seu mecanismo de ação sobre células fúngicas se aproxime dos peptídeos catiônicos da família das Histatinas. A ação desses PAMs é dependente da presença de proteínas de ligação à histidina na parede celular da levedura. Esta ligação leva a formação de poros e efluxo de íons K^+ , Mg^{2+} e ATP da célula, culminando com sua morte (Li et al., 2003).

Contudo, vale salientar que os estudos citados foram realizados utilizando peptídeos em solução. No presente estudo, o peptídeo Clavanina A encontra-se imobilizado na superfície de cateteres plásticos, fato que também sugere a existência de um mecanismo de ação inespecífico. Segundo Harris et al (2009), foi comprovado por microscopia eletrônica que a ação inibitória de crescimento fúngico de uma série de PAMs pode ser parcialmente explicada pelos efeitos que eles causam na parede celular, tais como quebras em sua estrutura, desintegração, afinamento e septação anormal.

Adicionalmente, é importante reforçar a ideia já mencionada por Galdiero et al. (2013) que membranas biológicas são estruturas complexas compostas, que não formam uma mistura homogênea, sendo algumas regiões mais enriquecidas do que outras em relação a presença de certos componentes, a depender de cada organismo, explicando assim o fato do peptídeo Clavanina A interagir melhor com a membrana de alguns microrganismos em relação a outros, refletindo assim nas respostas dos testes antimicrobianos para os cateteres modificados.

Por fim, o presente trabalho permitiu o uso da imobilização química como ferramenta bastante vantajosa para revestimento de superfícies com PAMs, promovendo maior estabilidade para a molécula e reduzindo os riscos de toxicidade, por impedir a lixiviação do peptídeo, assim como, a melhoria do sistema de revestimento com a associação de $NPsFe_3O_4$, as quais proporcionam aumento da área de superfície específica e propriedade de superparamagnetismo, além de não apresentarem toxicidade e serem consideradas de baixo custo.

Portanto, foram desenvolvidas superfícies que possibilitaram o controle da formação de biofilmes bacterianos e fúngicos em cateteres venosos centrais. Visto que, ainda não foi encontrado na literatura histórico de cateteres revestidos com $NPsFe_3O_4$ e Clavanina A que

possuam atuação contra bactérias e fungos, constituindo assim uma possibilidade para a redução de infecções nosocomiais associadas a tais dispositivos intravenosos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A síntese das NPsFe_3O_4 foi realizada de forma satisfatória com a obtenção de NPs de aproximadamente 10 nm caracterizadas por única rede cristalina correspondente a um espinélio cúbico. ClavA foi efetivamente imobilizada sobre a superfície do cateter. Ambas as modificações químicas foram eficazes para modificar a superfície do cateter. Os sistemas ClavA(NPsFe_3O_4 -DMSA) - Cateter e ClavA(NPsFe_3O_4 -3TA)-Cateter apresentaram um bom desempenho contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva), *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (Gram-negativas) e leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*). A atividade antimicrobiana dos cateteres modificados com filmes nanoestruturados e o peptídeo Clavanina A pôde ser explicada baseando-se na interação deste com a parede celular e a membrana plasmática destes microrganismos de acordo com a organização e componentes estruturais. Portanto, a modificação da superfície de cateteres plásticos com NPsFe_3O_4 e Clavanina A trata-se de uma proposta que pode ser vislumbrada como uma nova alternativa para o controle de infecções nosocomiais associadas a cateteres intravenosos.

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem as primeiros descritos na obtenção de cateteres modificados com NPsFe_3O_4 e Clavanina A. Desta forma, como perspectivas futuras podemos destacar:

- Aperfeiçoar a cobertura antibiofilme do cateter, tornando-a mais homogênea e eficiente;
- Realizar testes comparativos com relação ao peptídeo livre e o peptídeo associado as NPsFe_3O_4 e peptídeo imobilizado em cateter;
- Promover testes de estabilidade em função do tempo para os cateteres modificados;
- Realizar testes de citotoxicidade com células endoteliais;
- Promover testes em animais.

REFERÊNCIAS

APPENDINI P.; HOTCHKISS J. H. Surface modification of poly (styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. **Journal of Applied Polymer Science**, v.81, n.4, p. 609-616, 2001.

ALVES D.; PEREIRA M.O. Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. **Biofouling**, v. 30, n. 4, p. 483–499, 2014.

ALMEIDA Z. G., FARIAS L. R. Investigação epidemiológica das principais infecções nosocomiais no brasil e identificação dos patógenos responsáveis: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de pesquisa em ciências da saúde**, v.1, n.2, p.49 – 53, 2014.

ARNOW, P. M.; FLAHERTY, J. P. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: C. Glenn Mayhall. **Hospital Epidemiology and Infetion Control, Williams & Wilkins. Galvestone**, p. 366-387, 1996.

ANDREU, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v.47, p. 415-433, 1998.

AGERBERTH B.; GUNNE H.; ODEBERG J.; KOGNER P.; BOMAN H.G; GUDMUDSSON G.H. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine free and expressed in bone marrow and testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.9, p. 92:195, 1995.

AGERBERTH B.; CHARO J.; WERR J. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. **Blood**, v. 96, p. 3086, 2000.

AMSTAD E.; TEXTOR M.; REIMHULT E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, p. 2819, 2011.

AN-HUI L.U.; SALABAS E.L. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v.46, p. 1222 – 1244, 2007.

ASHAR B.; WARD R. S.; TURCOTTE L. R. Development of a silica-free silicone system for medical applications. **Journal of biomedical materials research**, v.15, n.5, p.663-72, 1981.

APPENDINI P.; HOTCHKISS J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.3, n.2, p.113-126, 2002.

BENJAMIN D.K.; CALANDRA T.F.; *et al.* Infectious Diseases society of America clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases Society of america. **Clinical infectious diseases**, v. 48, p.503–535, 2009.

BREATHNACH A.S. Nosocomial infections and infection control. **Elsevier**, p. 651-653, 2013.

BROGDEN K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 238–50, 2005.

BUZEA C.; BLANDINO P. I.; ROBBIE K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v.2, p. MR17 - MR172, 2007.

BAGHERI M.; BEYERMANN M.; DATHE M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.53, p.1132-4, 2009.

BENCHARIT S.; BYRD W.C.; *et al.* Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants. **Clinical Implant Dentistry Related Research**, v. 16, n.6, p. 817-26, 2014.

BRIGANTI E.; LOSI P.; RAFFI A.; SCOCCIANI M.; MUNAO A.; SOLDANI G. Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. **Journal of Materials Science**, v.17, n.3, p. 259-66, 2006.

CAMESANO, T.; ABU-LAIL, N. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 2173, 2003.

COSTA F.; CARVALHO I.F.; MONTELARO R.C.; GOMES P.; MARTINS M.C.L. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v.7, p.1431–1440, 2011.

COLOMBO A. L.; *et al.* Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: results from the Division of Infectious Diseases, UNIFESP. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n. 3, p. 571-587, 2009.

COLOMBO A. L.; GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p. 599-607, 2003.

COTRIM E.R.; ROCHA RR.; FERREIRA M.F.R. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – kpc em enterobacteriaceae: O desafio das bactérias multirresistentes. **Pós em revista do centro universitário newton paiva**, 5ed, 2012.

CÂNDIDO E.S.; CARDOSO M.H.S.; *et al.* The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, v. 55, p.65–78, 2014.

CARVALHO L.A.C.; MACHINI M.T. Hemocidins derived from hemoglobin: structures, properties and perspectives. **Química nova**, v.36, n. 7, p.1021-1029, 2013.

CHEN R.; COLE N.; WILLCOX M.D.; PARK J.; RASUL R.; KUMAR N. Synthesis, characterization and in vitro activity of a surface-attached antimicrobial cationic peptide. **Biofouling**, v.25, n.6, p. 517-524, 2009.

DONLAN R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**. v.7, n. 2, 2002.

DOUGLAS L.J. Candida biofilms and their role in infection. **TRENDS in Microbiology**, v.11, n.1, 2003.

DUNCAN T.V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Jornal of Colloid and Interface Science**, p 1–24, 2011.

DUARTE L.C.; JUCHEM P.L.; *et al.* Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v.30, n.2, p.3-15, 2003.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. Doenças das aves. **Campinas: Facta**, cap.4, p. 457-474, 2009.

FERREIRA H.; LALA, E. R. P.; Pseudomonas aeruginosa:Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.12, n. 4, p. 44-50, 2010.

FORTINA, K.L.J.; SURREY S.; GRODZINSKI P. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition Paolo. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n.4, 2005.

FLORA S.J. S.; PACHAURI V. Chelation in Metal Intoxication. **International Journal Environmental Research Public Health**, v.7, p. 2745-2788, 2010.

GAO G. *et al.* The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. **Biomaterials**, v. 32, n.16, p.899-909, 2011.

GUPTA A.; AMPOFO K.; RUBENSTEIN D.; SAIMAN L. Klebsiella pneumoniae produtora de β -lactamase (Extended spectrum β -lactamase – producing Klebsiella pneumoniae infections: a review of the literature). The Children Hospital of New York. **Journal Perinatol**, v.23, p. 439-443, 2003.

GALLO R. L.; *et al.* Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of allergy clinical immunology**, 2002.

GALDIERO S.; FALANGA A.; CANTISANI M.; VITIELLO M.; MORELLI G.; GALDIERO M. Peptide-Lipid Interactions: Experiments and Applications. **International Journal Molecular Science**, v.14, p.18758-18789, 2013.

GIOLO M.P; SVIDZINSKI T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GODOY-GALLARDO M.; *et al.* Covalent Immobilization of hLf1-11 Peptide onto Titanium Surface Reduces Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. **Acta Biomaterialia**, 2014.

GODDARD J. M.; HOTCHKISS J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v.32, n.7, p. 698-725, 2007.

HOFFMAN J.A; KAFATOS F.C; JANEWAY C.A; EZEKOWITZ R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, p. 284:1313–8, 1999.

HOSSAIN H.; ANSARI F.; SCHULZ-WEIDNER N.; WETZEL W.E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol and Immunol**, v.18, p.302-308, 2003.

HANCOCK R. E.; SAHL H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v.24, n.12, p. 1551-7, 2006.

HASAN S. A. Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. **Research Journal of Recent Sciences**, v.4, 2015.

HARIANI P. L.; FAIZAL M.; *et al.* Synthesis and Properties of Fe₃O₄ Nanoparticles by Co-precipitation Method to Removal Procion Dye. **International Journal of Environmental Science and Development**, v.4, n. 3, 2013.

HAYNIE S. L.; CRUM G. A.; DOELE B. A. Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n.2, p. 301-7, 1995.

INGHAM E. Enterobacteriaceae; 2000. Disponível em: [http://: medic.med.uth.tmc.edu](http://medic.med.uth.tmc.edu). Consulta em Set/2015.

JANGA W.S.; KIMA H.K.; LEEB K.Y.; *et al.* Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. **FEBS Letters**, p. 1490–1496, 2006.

KINDRACHUK J.; NIJNIK A.; HANCOCK, R. E. W. Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. In **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**, v.5, p. 175-216, 2010.

KHANDHAR A.P.; MATTHEW R.F.; KANNAN M. KRISHNANA. Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: Implications in biological systems. **Journal of applied physics**, p. 109, 2011.

KARAM L.; JAMA C.; *et al.* Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. **Journal of Materials Environmental Science**, v.4, n.5, p.24, 2013.

KIM M.J; JANG D.W; CHO Y.H. Preparation and characterization of carboxyl functionalization of magnetite nanoparticles for oligonucleotide immobilization. **Physica Scripta**, 2010.

KAUFFMANN C. A. Treatment of candidemia or invasive candidiasis in adults. Disponível em: **www.uptodate.com**. Acessado 30 de novembro de 2015.

LEON C.; *et al.* What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. **Intensive care medicine**, v.40, p. 808–819, 2014

LORENTE L.; HENRY C.; MARTÍN M.M.; JIMÉNEZ A.; MORA M.L. Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. **Critical Care**, 2005.

LEE I. H. ET AL; Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. **FEBS Lett**, v.400, n. 2, p. 158-162. 1997.

LEE H.; ZHAO C.; *et al.* Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes I. **Received 14; revised version received**, 1996.

LI X.; *et al.* Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties. **Acta Biomaterialia**, v.10, p. 258–266, 2014.

LI X. S.; REDDY M.S.; BAEV D.; EDGERTON M. Candida albicans Ssa1/2p Is the Cell Envelope Binding Protein for Human Salivary Histatin. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28553–28561, 2003.

LINDSAY D.; HOLY A. V. Bacterial biofilms within the clinical setting: What healthcare professionals should know. **Journal of Hospital Infection**, v.64, p.313-325, 2006.

LOGOTHETIDIS S. Nanostructured Materials and Their Applications, NanoScience and Technology. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2012.

LIU X.; JIANG S.; CHEN H.; CATHERINE A.; LARSON, C. Nanotechnology knowledge diffusion: measuring the impact of the research networking and a strategy for improvement Roc. **Journal of Nanoparticles Research**, v.16, p.2613, 2014.

LEE J.; CHOA Y. H.; KIM J.; KIM K. H. Comparison of the Magnetic Properties for the Surface-Modified Magnetite. **Ieeexplore transactions on magnetics**, v. 47, n.10, 2011.

LIM K.; CHUA R. R.; SARAVANAN R. Immobilization studies of an engineered arginine-tryptophan-rich peptide on a silicone surface with antimicrobial and antibiofilm activity. **ACS Appl Mater Interfaces**, v.5, n.13, p. 6412-22, 2013.

LUGTENBERG E.J.J.; PETERS R. Distribution of lipids in ytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli K12. **Biochimica at Biophysica Acta**, v.441, n.1, p. 38-47, 1976.

MONTEIRO J.A. Infecções Nosocomiais. Alguns aspectos. **Acta Médica Portuguesa**, v. 6, p.135-140, 2003.

MISHRA B, BASU A.; *et al.* Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens. **Journal of Materials Chemistry B**, v.2, p.1706–1716, 2014.

MESIANO E.R.A.B; MERCHÁN-HAMANN E. Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, 2007.

MOSCOSO M.; GARCIA E.; LO'PEZ R. Biofilm Formation by Streptococcus pneumoniae: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. **Journal of bacteriology**, p. 7785–7795, 2006.

MADSON B.; OFEK I.; CLEGG S.; ABRAHAM S.N. Type 1 fimbrial shafts of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infection and Immunity**, v.62, p.843-8, 1994.

MURRAY P. R.; *et al.* **Microbiologia Médica**. 6ª ed., Elsevier, São Paulo, p. 85-90, 1992.

MENDEZ E.; MORENO A.; COLILLA F.; *et al.* Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. **European Journal Biochemistry**, v.194, p.533–9, 1990.

MARO'TI G.; KERESZT A.; MERGAERT P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in microbiology**, p. 162, 2011.

MUTHIAH M.; IN-KYU P.; CHONG-SU. Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1224–1236, 2013.

MURRAY P.R.; ROSENTHAL K.S.; PFALLER M.A. **Microbiologia Médica**. 5ed. Ed.Mosby, p.992, 2006.

NEVES JUNIOR M. A.; MELO R.C. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.9 n.1, p.46-50, 2010.

NEIDHARDT F. C.; INGRAHAM, J.; SCHAECHTER, M. Physiology of the bacterial cell - a molecular approach. **Sinauer Associates**, 1990.

NGUYEN L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol**, v.29, n. 9, p. 464-472, 2011.

OLEJNICKOVA K.; HOLA V.; RUZICKA F. Catheter-related infections caused by Pseudomonas aeruginosa: virulence factors involved and their relationships. **Pathogens and Disease**, 2014.

OTERO-GONZALEZ A. J. *et al.* Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, v.24, n. 5, p. 1320-1334, 2010.

ONAIZI S. A.; LEONG S.S. Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges. **Biotechnology Advances**, v.29, n.1, p. 67-74, 2011.

OLIVEIRA H.P.; ANDRADE C.A.S.; DE MELO C.P. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.319, n.2, p.441-449, 2008.

PEREIRA M.S.; SOUZA A.C.S.; TIPPLE A.F.V.; PRADO M.A. Infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 14, n.2, p.250-7, 2005.

PODSCHUN R.; ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n. 4, p. 589-603., 1998.

POLDERMAN K.H.; GIRBES A.R.J. Central venous catheter use. Part 1: Mechanical complications. **Intensive Care Med**. v.28, p.1-17, 2002.

PAVIANI E.R.; STADINIK C.B.; HEINEK I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, 2004.

PRUCEK R.; *et al.* The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. **Biomaterial**, v.32, p.4704-4713, 2011.

QIAN J.; CUTLER J.; COLE R.B. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, n. 3, p. 439-449, 2008.

RATLEDGE E.; WILKINSON G. (1988) Microbial lipids. **Academic Press**, v.1, London, 1988.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.26, n.1, p.65-70, 2004.

ROSZEK B.; JONG W.H.; GEERTSMA R.E. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. **National institute for public Health and the environment**, p.21, 2005.

RAPSCH K.; BIER F.F.; TADROS M.; NICKISCH V.R. Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. **Bioconjugate Chemistry**, v.25, n.2, p.308-19, 2014.

SAÚDE A.C.M.; *et al.* Clavanin bacterial sepsis control using a novel methacrylate nanocarrier. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, 2014

SANTOS A. C. D. M.; **et al.** A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v.33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SANTOS A.L.; SANTOS D.O.; FREITAS C.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SOTO S.M.; SMITHSON A.; MARTINEZ J.A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **Journal of urology**, v. 177, n.1. p.365-368, 2007.

STOVER C. K.; PHAM X. Q. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, 2000.

SCHMIDTCHEN A.; PASUPULETI M.; MALMSTEN M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 265–274, 2014.

SCHNAPP D.; REID C.J.; HARRIS A. Localization and expression of human-defensin-1 in the pancreas and kidney. **Journal of Pathology**, v.186, p.99–103, 1998.

SILVA R.R.; AVELINO K.Y.; RIBEIRO K.L.; FRANCO O. L.; OLIVEIRA M.D.; ANDRADE C.A.: Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for microorganism diagnosis. **Frontiers Microbiology**. v.5, p. 443, 2014.

SHUKLA A.; FLEMING K. E.; H. F. CHUANG, T. M.; CHAU, C. R.; LOOSE, G. N. Stephanopoulos and P. T. Hammond: Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. **Biomaterials**. v. 31, p.2348-57, 2010.

STENDAHL J.C.; RAO M. S. Intermolecular Forces in the Self-Assembly of Peptide Amphiphile Nanofibers. **Advanced Functional Materials**. v. 16(4), p. 499-508, 2006.

SUAREZ, C. E.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clínica**, v. 27, p. 116-129, 2009.

TARDIVO T.B.; NETO J.F.; JUNIOR J.F. Infecções Sangüíneas Relacionadas aos Cateteres Venosos. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, p.224-227, 2008.

TANG H.; *et al.* Effect of surface modification of silicone on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization. **Journal Biomedical Materials Research**, p. 885-894, 2006.

VILELA R.; DANTAS S.; TRABASSO P. Interdisciplinary task-force reduces catheter-related bloodstream infection in a Pediatric Intensive Care Unit. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.4, p. 292-98, 2010.

VON BAU H.; MARRE R. Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. **Journal of Medical Microbiology** . p. 503–511, 2005.

VAN‘T HOF W.; VEERMAN E.; HELMERHORST E.J.; AMERONGEN A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biological Chemistry**, p. 597–619, 2001.

VAN KAN E.J.M.; DEMEL R. A. *et al.* The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. **Biochimica end Biophysica Acta**, p. 84–92, 2003.

VAN KAN E.J.M.; DEMEL R. A. *et al.* Membrane Activity of the Peptide Antibiotic Clavanin and the Importance of Its Glycine Residues. **Biochemistry**, v. 40(21), p. 6398-405, 2001.

VATTA L.L.; SANDERSON R.D.; KOCH K.R. Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications. **Pure Applied Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 1793–1801, 2006.

VANDERLEYDEN E.; *et al.* Gelatin functionalised porous titanium alloy implants for orthopaedic applications. **Materials Science Engineering**, v.42, p. 396-404, 2014.

WHITCHURCH C.B.; NIELSEN T.T.; RAGAS P.C.; MATTICK J.S. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. **Science**, v.295, 2002.

WU W.; HE Q.; JIANG C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Research Letters**, p. 397–415, 2008.

WILLCOX MD.; HUME EB.; Y. ALIWARGA, N.; KUMAR, N. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. **Journal Applied Microbiology**, p.1817–1825, 2008.

ZANETTI M.; LITTERI L.; GENNARO R.; HORSTMANN H.; ROMEO D. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils are generated from precursor molecules stored in the large granules. **Journal of Cell Biology**, p.111:36, 1990.

APÊNDICES

Apêndice A

Depósito do Pedido de Patente intitulado "CATETERES MODIFICADOS COM CLAVANINA A NANOESTRUTURADA PARA A REDUÇÃO DE INFECÇÕES".

Número do Pedido - INPI: BR 10 2016 003888 0

Data do depósito: 23/02/2016

Hora do Depósito: 14:51h (horário de Brasília)



Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
 1.2 Qualificação: IFES - INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR – AUTARQUIA FEDERAL
 1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08
 1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235 – CIDADE UNIVERSITÁRIA – RECIFE – PE
 1.5 CEP: 50670-901
 1.6 Telefone: 81-2126-8958 1.7 Fax: 81-2126-8959
 1.8 E-mail: patentes_dine.propesq@ufpe.br

☒ continua em folha anexa

- 2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

CATETERES MODIFICADOS COM CLAVANINA A NANOESTRUTURADA PARA A REDUÇÃO DE INFECÇÕES

☐ continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido N°** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX **Data de Depósito:** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

- 5. Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

☐ continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA

Tipo de Documento:

Formulário

DIRPA

Página:

2/3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código:

FQ001

Versão:

2

Procedimento:

DIRPA-PQ006

6. Inventor (72):

☐

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

6.2 Qualificação: ESPECIALISTA

6.3 CPF:

6.4 Endereço Completo:

6.5

6.6 Telefone:

6.7 FAX:

6.8 E-mail: kalline_farmajp@hotmail.com

☒

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

☐

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome: XX

9.2 CNPJ/CPF: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 9.3 API/OAB: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

9.4 Endereço Completo: XX

9.5 CEP: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.6 Telefone: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.7 FAX: XXXXXXXXXXXXXXXX

9.8 E-mail: XX

☐

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

☐



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

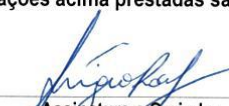
	Documentos Anexados		folhas
X	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
X	11.2	Procuração.	04
	11.3	Documentos de Prioridade.	
	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
X	11.5	Relatório descritivo.	08
X	11.6	Reivindicações.	03
X	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n°, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	03
X	11.8	Resumo.	01
	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n° de CDs ou DVDs (original e cópia).	
	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
X	11.13	Outros (especificar) ANEXO 01 (COTITULARES); ANEXO 02 (COINVENTORES); DELEGAÇÕES DE PODERES; NOMEAÇÃO D.O.U.	06

12. Total de folhas anexadas: 26 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Recife, 23 de fevereiro de 2016.

Local e Data


Assinatura e Carimbo
Sérgio Ribério de Aguiar
Diretor Adjunto de Inovação - UFPE
SIAPE: 2568983

Apêndice B

Artigo publicado na revista *Frontiers in Microbiology*

**Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for
microorganism diagnosis**

OPTICAL AND DIELECTRIC SENSORS BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES FOR MICROORGANISMS DIAGNOSIS

Rafael R. Silva¹, Karen Y.P.S Avelino², Kalline L. Ribeiro¹,

Octavio L. Franco³, Maria D.L. Oliveira², Cesar A.S. Andrade^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brasil

*Correspondence: Corresponding Author, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil, e-mail: csrandrade@gmail.com

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8576.

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are natural compounds isolated from a wide variety of organisms that include microorganisms, insects, amphibians, plants and humans. These biomolecules are considered as part of the innate immune system and are known as natural antibiotics, presenting a broad spectrum of activities against bacteria, fungi and/or viruses. Technological innovation enabled AMPs utilization for development of novel biodetection devices. Advances in

nanotechnology, as the synthesis of nanocomposites, nanoparticles and nanotubes, have allowed the nanostructured platforms development with biocompatibility and high surface area for immobilization of biocomponents, arising as additional tools for obtaining more efficient biosensors. Diverse AMPs have been used as biological recognition elements for obtaining biosensors with more specificity and low detection limits, whose analytical response can be evaluated through electrochemical impedance and fluorescence spectroscopies. AMPs-based biosensors have shown potential application as a supplementary tool for conventional diagnosis methods of microorganisms. In this review, conventional methods for microorganisms diagnosis as well new strategies using AMPs for the development of impedimetric and fluorescent biosensors were focused. AMPs-based biosensors are promising diagnostic methods for infections and bacterial contaminations, with wide applications possibility in clinical analysis, laboratory in microbiological quality control.

Keywords: antimicrobial peptides, biosensors, bacterial infections, impedance spectroscopy, fluorescence spectroscopy.

Antimicrobial peptides

Currently, the search for novel compounds with antibiotic ability to overcome bacterial resistance has increased. Antimicrobial peptides (AMPs) appear to be an excellent alternative, since more effective therapeutic approaches are required for many types of pathogens (Brogden et al. 2005; Hancock and Sahl 2006; Schmidtchen et al. 2014). AMPs are components of the innate immune system, acting in defense against multiple pathogens (Schmidtchen et al. 2014). In general, AMPs may also show other different activities such as antiviral or antitumor properties, making them excellent candidates as new therapeutic drugs (Reddy et al. 2004).

AMPs are biomolecules present in diverse organisms, such as insects, plants and animals (Mendez et al. 1990; Schnapp and Harris 1998). In general, AMPs are mainly cationic small molecules composed of 10-50 amino acids residues in length, with molecular masses ranging from 1 to 5 kDa. In addition, AMPs comprise a chemically and structurally heterogeneous family (Andreu and Rivas 1998; Costa et al. 2011).

In general, AMPs only assume an amphipathic structure after interacting with the bacterial membrane, since it is not a favorable structure in an aqueous environment, allowing lethal permeabilization of the bacterial membrane (Costa et al. 2011; van 't Hof et al. 2001). The classical modes of action described previously in the literature are not necessarily exclusive of one other (Bechinger and Lohner 2006; Brogden et al. 2005; Toke 2005; van 't Hof et al. 2001). In the case of the barrel-stave model, a lipid bilayer disruption by AMPs occurs, until the peptides reach a threshold concentration and insert themselves across the bilayer to obtain peptide-lined pores. Subsequently, a membrane solubilization into micellar structures occurs, resulting in the carpet model or in forming peptide-and-lipid lined pores (toroidal pore model) (Rapaport and Shai 1991).

The mechanisms of action of AMPs were reviewed and described by Nguyen et al. (Nguyen et al. 2011) and can be seen in Figure 1. In this new proposal, pore formation in the disordered toroidal pore model is more stochastic, involving low peptide quantity. The presence of peptides can directly affect the bilayer thickness and, therefore, the membrane is remodeled to form rich domains of anionic lipids on the peptide surface. In addition, AMPs can form non-bilayer intermediates in the membrane coupled to small anions. On the other hand, in the molecular electroporation model, a peptide accumulation occurs on the outer lipid membrane leaflet, making the membrane permeable to various molecules including the AMPs (Nguyen et al. 2011).

Nanotechnology has been widely introduced for multidisciplinary applications, especially associated with the use of AMPs in biology and biomedicine (Barkalina et al. 2014). Among the diverse uses of AMPs have been highlighted quality control of foods, raising animals, controlled release systems and biosensors (Li et al. 2012; Sobczak et al. 2013). In this context, the peptide nisin has been applied as a milk derivatives preservative in foods quality control (Bi et al. 2011). In animal husbandry, peptides can be used in ruminants as an alternative to common antibiotics avoiding bacterial resistance or to assist immunization of animals preventing diseases (Cheema et al. 2011).

Infectious diseases are part of humanity for centuries, and some of them killing millions of people worldwide. Different types of pathogens (bacteria, viruses, fungi and parasites) can cause infections from exogenous (acquired from the environment, animals or people) or endogenous (from the normal flora) origins (Murthy et al. 2013)(Mazzoni et al. 1987). Furthermore, in

agribusiness, the use of purified peptides, as well as the development of transgenic plants, aims to minimize plant diseases, avoiding the use of fungicides (Keymanesh et al. 2009). In clinical applications, some AMPs are in the early stages of clinical research to prevent inflammation and sepsis (Schuerholz et al. 2012).

Identification and quantification of pathogenic agents are important parameters for the bacterial infections diagnosis and implementation of an effective therapeutic drug (Lazcka et al. 2007). The most common methods are direct examination by counting bacteria colonies in culture plates and serodiagnosis tests (van Pelt et al. 1999). The direct examination by optical microscopy can identify the morphology using a simple and specific Gram staining. Culture media allow the growth as well as the isolation and identification of specific types of bacteria (Bragulat et al. 2004; Szakal and Pal 2003). However, these methods are time-consuming and require specialized technicians. Of note, for some pathogens to obtain a correct diagnosis from samples of mucosae, skin or blood can be required weeks to be identified (Benes et al. 1996). Obviously, a few days may be sufficient to worsen the clinical status of the patient before receiving appropriate treatment.

Traditional methods of diagnosis also consist of molecular tests or amplification tests of nucleic acids (ATNA). Techniques based on ATNA include polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction, transcription mediated amplification, strand displacement amplification and loop-mediated isothermal amplification (Andersen et al. 2000; Palka-Santini et al. 2009; Yang et al. 2002). Techniques based on nucleic acids enable a specific molecular detection through hybridization between a DNA molecule and its complementary strand (Junhui et al. 1997; Wang 1998; Wang et al. 1997). Although effective, these techniques may present some limitations as the need for sample enrichment and purification prior to analysis, prolonged time of experimentation, false-positive results due to cross-reactions and high cost (Caygill et al. 2010; Singh et al. 2014).

In order to reduce or overcome these restrictions, new detection methods are required and biosensors are considered promising tools for clinical diagnosis (Abdel-Hamid et al. 1999; Deisingh and Thompson 2004). In this context, AMPs can be an excellent alternative to the development of biosensors since it has been demonstrated their potential use for specific detection pathogenic bacteria (Kulagina, 2005).

Strategies for the development of AMP-based biosensors

Advances in nanotechnology have contributed to the improvement of biotechnological research associated with the rapid progression of biodetection devices (Fournier-Wirth and Coste 2010; Jianrong et al. 2004; Yeom et al. 2011). Nanostructures have been extensively used in the biosensors development due to the unique physicochemical characteristics as quantum size effect, elevated ratio between surface area and volume and analytical signal amplification capacity (Li et al. 2010; Jianrong et al. 2004). AMPs utilization as recognition elements in biosensors is a concept relatively new, but their development is of great relevance due to the numerous application areas (Etayash et al. 2014).

Biosensors are chemical devices comprising two basic functional units (Figure 2). The first one is a biomolecule responsible for recognition of the target substance through specific intermolecular binding or by means of catalytic reactions (D'Orazio 2003). The second is the transducer that converts the biochemical response into a measurable electric signal, which is mainly proportional to analyte concentration (Higgins and Lowe 1987; Hulanicki et al. 1991; Thevenot et al. 1999). In addition, diverse transducers can be used for conversion of the biochemical response into a quantifiable analytical signal, being classified according to their physical principles as electrochemical, electrical, optical, piezoelectric, calorimetric, acoustic and magnetic (Hulanicki et al. 1991; Marco and Barcelo 1996; Sethi 1994; Thevenot et al. 1999).

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) comprises the current main strategy used for the development of biodevices based on AMPs, as shown in Table 1. EIS is an effective method for the investigation of modified surfaces and monitoring of interfacial processes, allowing the characterization of electrochemical systems (Bard 2000; Lasia 2002; Stoyanov and Savova-Stoyanova 1986). In the EIS technique, a signal of perturbation of low amplitude, in the form of sinusoidal potential and different frequency values, is applied to the transducer, forming sinusoidal alternating current (Chang and Park 2010; Katz and Willner 2003; Macdonald 1990; Macdonald 1992). EIS is a valuable tool for interfacial phenomena analyses occurring between electrode and solution. Dielectric analyses allows the electron charge-transfer parameters evaluation, double-layer electrical layer and modeling the experimental data to equivalent circuits (Macdonald 1990; Oliveira et al. 2013; Bott 2001; Stoyanov and Savova-Stoyanova 1986).

EIS is a technique of great relevance due to the numerous technological applications such as the development of biosensors, studies of dielectric materials, corrosion processes, biofuel cells and rechargeable batteries (Guan et al. 2004; Macdonald 1992). EIS is a new experimental approach to understanding about the AMPs mechanisms of action through lipid membrane properties monitoring changes such as thickness, ion permeability and homogeneity after peptide exposure (Chang et al. 2008; Nascimento et al. 2012; Oliveira et al. 2013; Sugihara et al. 2012).

Several biological elements can be used for the manufacturing of biosensitive systems, such as cell receptors, enzymes, antibodies, antigens, nucleic acids, aptamers, lectins and peptides (Byfield and Abuknesha 1994; Caygill et al. 2010; Guan et al. 2004). In particular, AMPs are outstanding molecules due to their wide biotechnological applications (Dawson and Liu 2008; Meng et al. 2010; Seo et al. 2012). In addition, AMPs are promising molecules for the development of biosensors due to the possibility of recognizing a wide variety of pathogenic agents, including bacteria, fungi, toxins, and viruses with lipoprotein envelope (De Smet and Contreras 2005; Kulagina et al. 2007; Zasloff 2002).

The basic principle that enables the AMPs use in biosensors is its ability to selectively interact with pathogens cell membrane components (Kulagina et al. 2005). The (bio) interaction is mainly drive by electrostatic forces, hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Seelig 2004). The biological recognition thermodynamic depends of lipid membrane composition and of peptide properties such as hydrophobicity, amphipathicity, molecular charge and degree of secondary structure angle (Fernandes et al. 2012; Mozsolits et al. 2001; Oliveira et al. 2013; Papo and Shai 2003). Therefore, the AMPs specificity is based on the different molecular affinities allowing their employment in diagnostic tests (Etayash et al. 2014; Kulagina et al. 2005; Li et al. 2014).

Interdigitated electrodes are an excellent alternative for biosensor development. Mannoor et al. (2010) reported the development of an interdigitated capacitive biosensor for detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In this study, magainin I was immobilized on gold microelectrodes via its C-terminal cysteine residue, and the binding capacity to bacterial cells was evaluated by EIS. The changes in the dielectric properties of the modified electrode surface allowed the determination of selectivity for pathogenic Gram-negative bacteria *E. coli* and *S.*

typhimurium in relation to non-pathogenic *E. coli* and the Gram-positive species *Listeria monocytogenes* (Mannoor et al. 2010).

Recently, Li and co-workers (Li et al. 2014) developed an impedimetric biosensor with magainin I conjugated to a structured film of ferrocene for bacterial detection. The biosensor showed a preferential selectivity for *E. coli* O157: H7 followed by non-pathogenic *E. coli* K12, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis*. In addition, a detection limit was observed for *E. coli* O157: H7 of 10^3 CFU mL⁻¹.

A microelectromechanical sensor using two synthetic peptides (C16G2cys or G10KHc) was developed for the detection of *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* (Lillehoj et al. 2014). It is important to note that C16G2cys and G10KHc have a cysteine amino acid residue in the C-terminus, and the –SH group of the cysteine can be used to promote binding on the gold surface, resulting in the vertical orientation of the recognition molecules.

Among the optical properties explored for the construction of biosensors, one of the most prevalent is fluorescence, evaluated by a significant number of techniques that allow the analysis of the systems conjugated with fluorophores and molecular targets quantification (Altschuh et al. 2006; Fan et al. 2008; Gauglitz 2005; Lazcka et al. 2007). Fluorescence is a phenomenon of photons emission resulting from the passage of a valence electron in an orbital of ground state for an orbital of higher energy level to the absorb radiation of appropriate wavelength. Upon returning to the state of origin, the photons are liberated with bottom energy to absorbed light. Fluorescence spectroscopy allows quantify the analyte with sensibility, low cost and easy implementation (Eaton 1990; Lazcka et al. 2007). Thus, the molecular recognition is assessed through variations in fluorescence properties after the interaction of the bioreceptor with the specific target (Altschuh et al. 2006; McFarland and Finney 2001).

In this context, magainin I was immobilized on glass slides modified with 3-mercaptopropyl triethoxysilane (MPTES) and N-(γ -maleimidobutyryloxy) succinimide ester (GMBS) through direct covalent binding or by avidin-biotin coupling, being used as a recognition molecule for *E. coli* O157: H7 and *S. typhimurium* (Kulagina et al. 2005). The immobilization method interferes with biosensor sensitivity, and the direct binding of magainin I reduces nonspecific interactions, resulting in detection limits of 1.6×10^5 and 6.5×10^4 cells.mL⁻¹ for *E. coli* and *S. typhimurium* labeled with Cy5, respectively. Through the indirect method values of 6.8×10^5 and 5.6×10^5

cells.mL⁻¹ were obtained (Kulagina et al. 2005). Moreover, cecropin A, parasin, magainin I, and polymyxin B and E, immobilized on a glass slide modified with MPTES and GMBS, were also used in screening fluorescent assays for detection of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* (Kulagina et al. 2006). The assay in “sandwich” format, with the employment of Cy3-labeled anti-*E. coli* or anti-Salmonella, demonstrated different AMP affinities for pathogenic species (Kulagina et al. 2006). In another study, cecropin (A, B and P), parasin, magainin I, polymyxin (B and E), melittin, and bactenecin were evaluated for the biodetection of viral particles and bacterial cells using Cy3 (Kulagina et al. 2007).

Cecropin P1 (CP1), SMAP-29 and PGQ were used as alternative molecules for detection of *E. coli* O157:H7 in substitution of the anti-*E. coli* O157:H7 antibody (Arcidiacono et al. 2008). Through screening in solution and quantification of fluorescence, it was verified that the detection limits for Cy5 CP1, Cy5 SMAP and Cy5 PGQ were 10⁴, 10⁵ e10⁶ CFU mL⁻¹, respectively, in comparison to 10⁵ CFU mL⁻¹ for Cy5 anti-*E. coli* O157 antibody. Because of the high sensitivity of the CP1 and specificity of the anti-*E. coli* O157:H7 antibody, a prototype immuno-magnetic bead biosensor was developed, resulting in a 10-fold improvement in sensitivity (Arcidiacono et al. 2008).

Glass microspheres (GMs) based on microfluidic chip were used for magainin I immobilization as a new method for *E. coli* biodetection (Yoo et al. 2014). GMs provided greater detection efficiency through the increase of superficial area of adsorption relative to the volume, enabling a greater number of bonds between microorganism-AMPs. The biodevice presented a good detection efficiency of 87% in a limit of 10³ cells.mL⁻¹ obtained by image analysis under fluorescence microscopy (Yoo et al. 2014).

The most common applications of the AMPs-based biosensors are the identification of diverse bacteria such as *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, and others (Li et al. 2014; Mannoor et al. 2010). In this scenario, AMPs stand out for presenting differential characteristics and large applicability potential, since AMPs are highly stable under unsuitable conditions and can be continuously exposed to natural surroundings (Dawgul, 2014; Hassan, 2012; Laverty, 2011; Mannoor et al. 2010; Casteels et al. 1989). AMPs are capable of interacting with invariant components of the target surfaces (Kulagina et al. 2006), providing to each peptide the possibility of recognize a variety of pathogens (Kulagina et al. 2007; De Smet and Contreras

2005; Zasloff 2002). Despite the importance of bacterial diagnosis, diverse studies are undertaken to the detection systems development for other microorganisms and toxins (De Smet and Contreras 2005; Kulagina et al. 2007; Zasloff 2002).

Therefore, AMPs can be used in nanostructured platforms for the detection of agents pathogenic due to the singular properties, ease of obtaining and relevant biological activity (Kulagina et al. 2005; Yonekita et al. 2013). AMPs are an excellent alternative for obtaining new methods of diagnostics sensitive, inexpensive, portable, versatile and fast for the analyte identification and quantification (Caygill et al. 2010; Yoo et al. 2014). Thus, nanobiosensors based on AMPs can be used in basic and applied research, clinical analysis, commercial applications, microbiological quality control and environmental monitoring (D’Orazio 2003; Mehrvar and Abdi 2004; Higgins and Lowe 1987).

Conclusions

AMPs are considered promising molecules in the development of biodetection devices. Nanotechnology has enabled the construction of biosensors based on AMPs with more specificity and sensitivity for detection of pathogenic agents. Biosensors based on AMPs are a useful tool since it is possible to investigate a wide variety of molecular targets in real time, providing quantitative or semi-quantitative analytical information that is both specific and selective. In spite of AMPs-based biosensors be prototypes and also submit challenges to commercialization such as reproducibility, validation and standardization proper, they may be considered valuable alternatives to obtaining new diagnostic methods.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by the FACEPE and Rede de Nanobiotecnologia/CAPES. Andrade and Oliveira are also gratefully for CNPq financial support (grant 310305/2012-8 and 310361/2012-5, respectively). Ribeiro and da Silva would like to thank FACEPE for M.Sc. and PhD scholarships, respectively.

Figure Captions

Figure 1. AMPs schematic models of action. (a) Barrel model: In this model, the peptides assume an amphipathic helical conformation and organize themselves to form a structure with a central lumen, like a barrel. The hydrophobic part of the AMPs interacts with the lipid hydrocarbon chains of the membrane and their hydrophilic part is exposed so as to form the lumen of the transmembrane aqueous channel formed. (b) Carpet model: In this case, the cationic peptides attracted by anionic phospholipids cover the surface of the bacterial membrane completely until that a point of saturation is reached, which results in solubilization of the bacterial membrane. (c) Toroidal model: The peptide helices are inserted in parallel in the membrane and cause folding of the lipid monolayers in order to form a pore formed by peptides interspersed with phospholipids, in this case, the polar groups of the peptides interact with the polar heads of the phospholipids. (d) Detergent model: This mode of action is a consequence of the previous (carpet), where the solubilization of the membrane leads to the formation of micellar structures, destabilizing it and leading to cell death.

REFERENCES

- Abdel-Hamid I, Ivnitski D, Atanasov P, Wilkins E (1999) Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors & bioelectronics* 14:309-316
- Altschuh D, Oncul S, Demchenko AP (2006) Fluorescence sensing of intermolecular interactions and development of direct molecular biosensors. *J Mol Recogn* 19:459-477
- Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet* 356:1099–1104
- Andreu D, Rivas L (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415-433
- Arcidiacono S, Pivarnik P, Mello CM, Senecal A (2008) Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157:H7. *BiosensBioelectron* 23:1721-1727
- Bard JBF, Faulkner LR (2000) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, New Jersey
- Barkalina N, Charalambous C, Jones C, Coward K (2014) Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine* 14: 1549-9634

- Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758:1529-1539
- Benes J, Gabrielova A, Horova B, Zitko K, Rozsypal H, Dzupova O, Kabelkova M (1996) [Comparison of various methods of hemoculture tests] *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie : casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne* 45:101-107
- Bi L, Yang L, Narsimhan G, Bhunia AK, Yao Y (2011) Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide. *J Control Rel* 150:150-156
- Bott AW (2011) Electrochemical techniques for the characterization of redox polymers. *Current Separations* 19(3): 71-75
- Bragulat MR, Martinez E, Castella G, Cabanes FJ (2004) Selective efficacy of culture media recommended for isolation and enumeration of *Fusarium* spp *Journal of food protection* 67:207-211
- Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M (2005) The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nature Immunol* 6:558-564
- Byfield MP, Abuknesha RA (1994) Biochemical aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron* 9:373-400
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* 8(8):2387-2391
- Caygill RL, Blair GE, Millner PA (2010) A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal Chim Acta* 681:8-15
- Chang WK, Wimley WC, Searson PC, Hristova K, Merzlyakov M (2008) Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.* 1778:2430-2436.
- Chang BY, Park SM (2010) Electrochemical impedance spectroscopy. *Annu Rev Anal Chem* 3:207-229
- Cheema UB, Younas M, Sultan JI, Iqbal A, Tariq M, Waheed A (2011) Antimicrobial Peptides: An alternative of Antibiotics in Ruminants. *Advances in Agricultural Biotechnology* 2 15- 21.
- Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MC (2011) Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater* 7:1431-1440

- Dawgul M, Maciejewska M, Jaskiewicz M, Karafova A, Kamysz W (2014) Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta poloniae pharmaceutica* 71:39-47
- Dawson RM, Liu CQ (2008) Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. *Crit Rev Microbiol* 34:89-107
- De Smet K, Contreras R (2005) Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27:1337-1347
- Deisingh AK, Thompson M (2004) Biosensors for the detection of bacteria. *Can J Microbiol* 50(2): 69-77
- D'Orazio P (2003) Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 334:41-69
- Eaton DF (1990) Recommended methods for fluorescence decay analysis. *Pure & Appl. Chem.* 62(8):1631-1648
- Etayash H, Jiang K, Thundat T, Kaur K (2014) Impedimetric detection of pathogenic gram-positive bacteria using an antimicrobial peptide from class IIa bacteriocins. *Anal. Chem.* 86:1693-1700
- Fan XD, White IM, Shopova SI, Zhu HY, Suter JD, Sun YZ (2008) Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal Chim Acta* 620:8-26
- Fernandes FC, Rigden DJ, Franco OL (2012) Prediction of antimicrobial peptides based on the adaptive neuro-fuzzy inference system application. *Peptide Sci.* 98:280-287
- Fournier-Wirth C, Coste J (2010) Nanotechnologies for pathogen detection: Future alternatives? *Biologicals: J Int Assoc Biol Standard* 38:9-13
- Gaughlitz G (2005) Direct optical sensors: principles and selected applications. *Anal Bioanal Chem* 381:141-155
- Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ (2004) Impedimetric biosensors. *J Biosci Bioengineer* 97:219-226
- Hancock REW, Sahl HG (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnol* 24:1551-1557
- Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology* 113:723-736
- Higgins IJ, Lowe CR (1987) Introduction to the principles and applications of biosensors. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 316:3-11

- Hulanicki A, Glab S, Ingman F (1991) Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl Chem* 63:1247-1250
- Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L (2004) Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol Adv* 22:505-518
- Junhui Z, Hong C, Ruifu Y (1997) DNA based biosensors. *Biotechnology Advances* 15(1):43-58
- Katz E, Willner I (2003) Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. *Electroanal* 15:913-947
- Keymanesh K, Soltani S, Sardari S (2009) Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microb Biotechnol* 25:933-944
- Kulagina NV, Lassman ME, Ligler FS, Taitt CR (2005) Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. *Anal Chem* 77:6504-6508
- Kulagina NV, Shaffer KM, Anderson GP, Ligler FS, Taitt CR (2006) Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and *Salmonella* screening. *Anal Chim Acta* 575:9-15
- Kulagina NV, Shaffer KM, Ligler FS, Taitt CR (2007) Antimicrobial peptides as new recognition molecules for screening challenging species. *Sens Act B-Chem* 121:150-157
- Lasia A (2002) Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. In: Conway BE, Bockris JOM, White R (ed) *Modern Aspects of Electrochemistry*, 1st edn. Springer, New York, pp 143-248.
- Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF (2011) The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of molecular sciences* 12:6566-6596
- Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX (2007) Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron* 22:1205-1217
- Li Y, Afrasiabi R, Fathi F, Wang N, Xiang C, Love R, She Z, Kraatz HB (2014) Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. *Biosens Bioelectron* 58:193-199
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37:207-215
- Li Y, Schluesener HJ, Xu S (2010) Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* 43(1):29-41

- Lillehoj PB, Kaplan CW, He J, Shi WY, Ho CM (2014) Rapid, electrical impedance detection of bacterial pathogens using immobilized antimicrobial peptides. *Jala-J Lab Autom* 19:42-49
- Macdonald DD (1990) Review of mechanistic analysis by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim Acta* 35:1509-1525
- Macdonald JR (1992) Impedance spectroscopy annals of biomedical engineering 20:289-305
- McFarland SA, Finney NS (2001) Fluorescent chemosensors based on conformational restriction of a biaryl fluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1260-1261
- Mannoor MS, Zhang S, Link AJ, McAlpine MC (2010) Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Proc Nat Acad Sci USA* 107:19207-19212
- Marco MP, Barcelo D (1996) Environmental applications of analytical biosensors. *Meas Sci Technol* 7:1547-1562
- Mazzoni A, Fiacchini M, Cevenini R, Gatti M, Nanetti A (1987) Incidence of endogenous and exogenous opportunistic fungal infections in relation to different prophylactic measures: clinical and microbiological study of 431 immunocompromised patients *Chemioterapia : international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy* 6:374-376
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, de Haro C (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem FEBS* 194:533-539
- Meng S, Xu H, Wang F (2010) Research advances of antimicrobial peptides and applications in food industry and agriculture. *Curr Prot Pept Sci* 11:264-273
- Mehrvar M, Abdi M (2004) Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences* 20:1113-1126
- Mozsolits H, Wirth HJ, Werkmeister J, Aguilar MI (2001) Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmonresonance. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1512:64-76
- Murthy S, Keystone J, Kisson N (2013) Infections of the developing world. *Critical care clinics* 29:485-507
- Nascimento JM, Franco OL, Oliveira MDL, Andrade CAS (2012) Evaluation of magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem. Physics Lipids* 165:537-544

- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29:464-472
- Oliveira MDL, Franco OL, Nascimento JM, Melo CP, Andrade CAS (2013) Mechanistic aspects of peptide-membrane interactions determined by optical, dielectric and piezoelectric techniques: an overview. *Current Protein and Peptide Science* 14:543-555
- Oliveira MDL, Abdalla DSP, Guilherme DF, Faulin TES, Andrade CAS (2011) Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL⁻) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal)-gold nanoparticles matrix. *Sensors and Actuators B* 155:775–781
- Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O (2009) Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiology* 9:1
- Papo N, Shai Y (2003) Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: Differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochem.* 42:458-466
- Rapaport D, Shai Y (1991) Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogs with lipid bilayers *J Biol Chem* 266:23769-23775
- Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int JAntimicrob Agents* 24:536-547
- Schmidtchen A, Pasupuleti M, Malmsten M (2014) Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Adv Coll Interf Sci* 205:265-274
- Schnapp D, Harris A (1998) Antibacterial peptides in bronchoalveolar lavage fluid. *Amer J Respir Cell Mol Biol* 19:352-356
- Schuerholz T, Brandenburg K, Marx G (2012) Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Crit Care* 16(2):207
- Seelig J (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1666:40-50
- Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ (2012) Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules* 17:12276-12286
- Sethi RS (1994) Transducer aspects of biosensors. *Biosens Bioelectr* 9:243-264

- Singh PK, Shiha MJ, Kumar A (2014) Antibacterial responses of retinal Muller glia: production of antimicrobial peptides, oxidative burst and phagocytosis. *Journal of neuroinflammation* 11:33
- Sobczak M, Debek C, Oledzka E, Kozlowski R (2013) Polymeric systems of antimicrobial peptides -strategies and potential applications. *Molecules* 18:14122-14137
- Stoynov ZB, Savova-Stoynova B (1986) Structural simulation of electrochemical impedances. *J Electroanal Chem* 209:11-18
- Sugihara K, Delaia M, Szendro I, Guillaume-Gentil O, Vörös J, Zambelli T (2012) Simultaneous OWLS and EIS monitoring of supported lipid bilayers with the pore forming peptide melittin. *Sens. Act. B* 161:600-606
- Szakal D, Pal T (2003) Comparison of media for the selective culture of enteroinvasive *Escherichia coli* *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 22:235-241
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* (1-2):121-31.
- Toke O (2005) Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80:717-735
- van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382:597-619
- van Pelt C et al. (1999) Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods *Journal of clinical microbiology* 37:2158-2164
- Wang J, Rivas G, Cai X, Palecek E, Nielsen P, Shiraish H, Dontha N, Luo D, Parrado C, Chicharro M, Farias PAM, Valera FS, Grant DH, Ozsoz M, Flair MN (1997) DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta* 347:1-8
- Wang J (1998) DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review. *Biosensors & Bioelectronics* 13:757–762
- Wang J, Rivas G, Cai X, Palecek E, Nielsen P, Shiraish H, Dontha N, Luo D, Parrado C, Chicharro M, Farias PAM, Valera FS, Grant DH, Ozsoz M, Flair MN (1997) DNA

- electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta* 347:1-8.
- Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, Rothman RE (2002) Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 40(9):3449-3454
- Yeom SH, Kang BH, Kim KJ, Kang SW (2011) Nanostructures in biosensor-a review. *Front Biosci* 16:997-1023
- Yonekita T, Ohtsuki R, Hojo E, Morishita N, Matsumoto T, Aizawa T, Morimatsu F (2013) Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* *Journal of microbiological methods* 93:251-256 doi:10.1016/j.mimet.2013.03.006
- Yoo JH, Woo DH, Chang M-S, Chun M-S (2014) Microfluidic based biosensing for *Escherichia coli* detection by embedding antimicrobial peptide-labeled beads. *Sens Act B: Chem* 191:211-218
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395

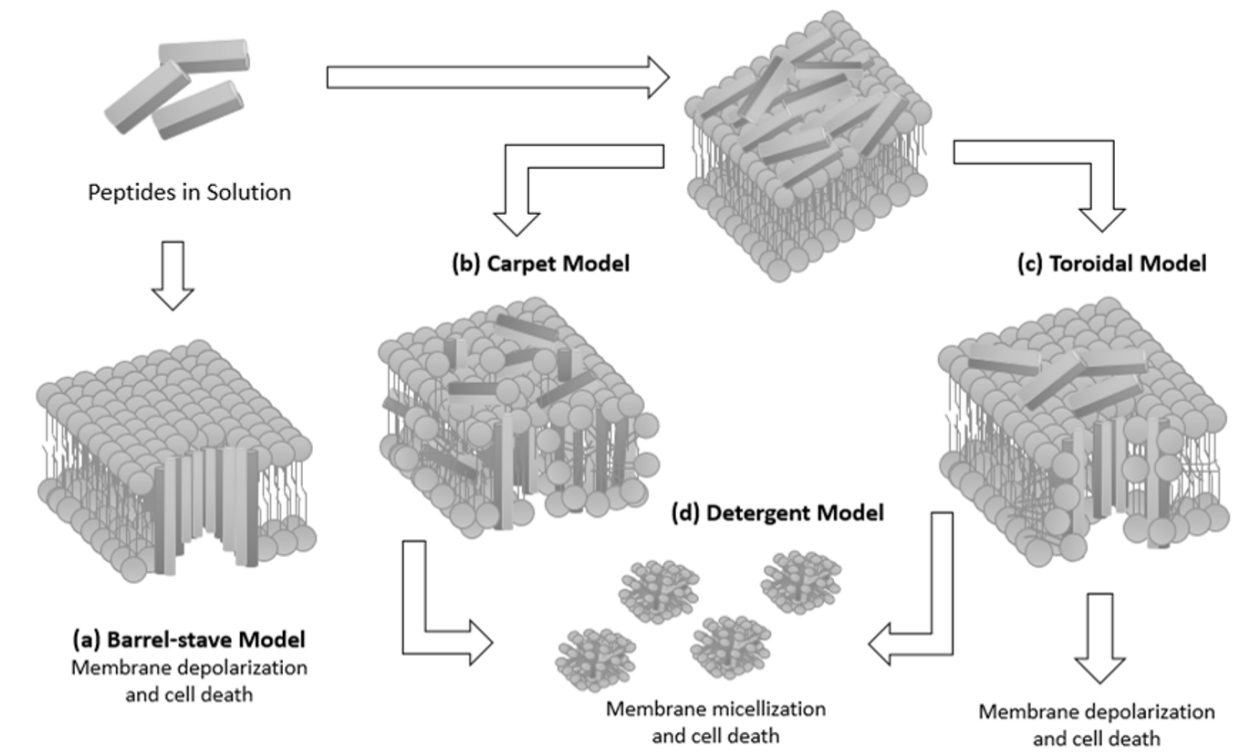


Figure 1.

Apêndice C

Artigo publicado na revista *Fronteirs Bioscience*

Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces

Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces

Rafael R. Silva¹, Karen Y.P.S. Avelino², Kalline L. Ribeiro¹, Octavio L. Franco³, Maria D.L. Oliveira², Cesar A.S. Andrade^{1,2}

¹*Programa de Pos-Graduacao em Inovacao Terapeutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil,* ²*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil,* ³*Centro de Analise Proteomicas e Bioquimicas de Brasilia, Universidade Catolica de Brasília, 71966-700, Brasilia, DF, Brasil*

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
 - 2.1. Antimicrobial Peptides
3. Physical methods for immobilization of AMPs
4. Chemical approaches for covalent immobilization of AMPs onto surfaces
5. Effectiveness of AMPs immobilized onto a biomaterial surface
6. Conclusions
7. Acknowledgments
8. References

1. ABSTRACT

Hospital infections associated with surgical procedures and implants still present a severe problem in modern societies. Therefore, new strategies to combat bacterial infections mainly caused by microorganisms resistant to conventional antibiotics are necessary. In this context, antimicrobial peptides have gained prominence due to their biocompatibility, low toxicity and effectiveness. The immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces is an excellent alternative for the development of new biodevices with microbicidal properties. Herein, we describe reports related to physical-chemical characterization, *in vitro/in vivo* studies and the clinical applicability of such active surfaces. In this review, we focused on the mechanisms of action, different peptide immobilization strategies on solid surfaces and the microbicidal effectiveness of AMPs.

2. INTRODUCTION

Bacterial resistance is still one of the major problems facing public health in modern societies (1). This can occur due to the indiscriminate use of antibiotics, which induces the formation of new species that are resistant to conventional antibiotics (2). A major problem facing modern societies is the health risks stemming from the transmission of new infections that are difficult to treat. In addition, the transmission routes (e.g. airborne or direct contact) can lead

to epidemic episodes (3). Thus, many studies have aimed to minimize microbial contamination by developing new drugs. Although there are thousands of new compounds synthesized per year, the difficult process of validation and clinical phase studies decrease the possibility of new drug manufacturing. In this context, the discovery of antimicrobial peptides (AMPs) has shown promise as a way to eradicate some resistant bacterial strains (4).

AMPs are small amino acid sequences obtained by their extraction from many types of organisms (plants, insects and animals) and play an important role in inhibiting the growth of multiple microorganisms (5, 6). Currently, the database that contains detailed information on these peptides (antimicrobial peptides database, APD) contains 2495 types with different functions: antibacterial, antifungal, antiparasitic, anti-cancer, antioxidant, etc. (7). Chemically modified AMPs are obtained from the modifications of natural ones derived from magainin and histidine (8, 9) or through new synthetic forms (e.g. E14LKK, RK1, RK2), aiming to improve microbicidal effectiveness (10, 11).

Some hospital infections come from the adherence of microbes, especially bacterial species on the surfaces of medical devices and implants (e.g. dental or orthopedic) or during surgical procedures due to the lack of adequate hygienization (12, 13). The massive bacterial colonization on solid surfaces could contribute to biofilm formation (14). This process involves the transport of bacterial cells and further attachment commonly mediated by van der Waals and electrostatic charges. The adhesion of proteins and extracellular polymeric substances (EPS) can reinforce bacterial adhesion (15). Once implanted, these microorganisms can mature and differentiate, forming microcolonies and propagating infections with detached cells (16). As a result, infections associated with bacteria are difficult to treat, and the removal or replacement of infected medical implants or devices reflects considerable costs for the healthcare system, which leads to patient suffering, prolonged hospitalization and eventually death (17).

In this scenario, the development of new biomaterials to prevent adhesion and microbial infection in hospital equipment and implants are of increased interest. The use of AMPs in adsorption processes, functionalization and immobilization of organic coatings onto substrate surfaces (titanium or silicone) has demonstrated good activity with clinical potential, summarized in Table 1.

Therefore, this review addresses three important aspects for the use of AMPs in antimicrobial coatings: basic concepts and mechanisms of action of peptides against microorganisms (with the emphasis on bacteria), chemical immobilization strategies for the inclusion of peptides associated to solid substrates and the effectiveness of these models in antimicrobial testing.

2.1. Antimicrobial Peptides

AMPs are important components of the innate immune system in living organisms and contribute effectively against exogenous pathogens (18). After a microbial infection, most of these peptides act to neutralize a wide range of microorganisms. In addition, AMPs are efficient

at low concentrations, are less likely to promote bacterial resistance and have antitumor properties. Therefore, AMPs are promising candidates for their use as novel therapeutic drugs (4). They comprise a chemically and structurally heterogeneous family yet share molecular masses lower than 5 kDa, aside from having cationic and amphipathic properties (19, 20).

Due to the enormous variety of amino acid sequences and structural features, the exact action mechanism of AMPs is still a controversial issue. However, there is a consensus about the mechanism of positively charged peptides. The cationic charges on the peptide surface favor the electrostatic interaction of negatively charged microbial membranes through bivalent cation exchange (20). In addition, AMPs assume an amphipathic structure after interacting with the bacterial membrane, resulting in a lethal permeabilization (20, 21).

The antimicrobial activity of AMPs is based on four model mechanisms named barrel, carpet, toroidal and detergent. In the barrel model, the hydrophobic part of AMPs interacts with the lipid hydrocarbon chains of membranes, and their hydrophilic part exposes the lumen as a result of transmembrane aqueous channel formation. The carpet model occurs due to the saturation of the bacterial membrane by AMP molecules, resulting in its permeabilization (21, 22). In the toroidal model, the peptides are interspersed with phospholipids, and the polar groups of both molecules interact with each other, resulting in pore formation in the lipid membrane, where peptides are assumed to adopt a transmembrane orientation (23). Finally, the detergent-like model can occur as a consequence of the carpet model. Once attached to membrane surface by electrostatic interactions, AMPs interleave the lipid bilayer until reaching a saturation point with subsequent micelle formation and bacterial membrane destruction (24).

The systemic use of AMPs is restricted, mainly due to their toxicity when used at high concentrations, as well as by its relatively short half-life and susceptibility to proteases (10). The interaction of peptides with bacteria is initially driven by weak attraction forces (van der Waals and electrostatic interactions), which are further enhanced by specific interactions involving peptides and biofilm formation (25). Therefore, the most feasible way to use peptides is through their immobilization onto solid surfaces with the aim of developing new antimicrobial structures. In general, the use of intermediary linkers between solid surfaces and AMPs is required to obtain better microbicidal activity (25).

Bacterial infections associated with implanted devices still present a significant threat to patients and are a serious challenge for physicians. High rates of infection are observed for orthopedic implants, dental devices, vascular grafts, urinary and venous catheters, which results in low performance of these devices in terms of safety and longevity (26, 27). Central venous catheters, commonly used in clinical cases (e.g. chemotherapy, prolonged parenteral nutrition and hemodialysis), contain silicone or polyurethane in their constitution. In addition, catheters are useful for peptide immobilization and, therefore, acquire the potential to be used against biofilms involved in hospital infections post-surgery (28). Furthermore, limitations of biomolecule immobilization could spur the development of new antimicrobial surfaces capable of preventing initial bacterial colonizations or at least reduce active bacterial titles. Thus, modified surfaces could directly affect patient health and reduce costs in public health, making the use of AMPs an excellent alternative to remedy these issues.

3. PHYSICAL METHODS FOR IMMOBILIZATION OF AMPS

Recently, several studies have demonstrated AMP coupling with different substrates and their effectiveness against biofilm formation (29-33). AMPs have unique bioactive properties capable of overcoming limitations of other antibacterial coatings, such as the risk of developing bacterial resistance, short-term antimicrobial protection, limited antimicrobial spectrum and high cytotoxicity (34-37). Therefore, AMP immobilization onto diverse medical devices, including implants, urinary and intravenous catheters, exhibits the undeniable potential for clinical use (38-41). However, new immobilization strategies are required to ensure the applicability of AMPs on solid surfaces, improving the effectiveness and functionality of modified biodevices (35, 42).

AMPs can be immobilized onto solid surfaces through physical methods such as adsorption, self-assembled monolayers (SAM) or through chemical methods via selective or non-selective covalent binding (35, 42, 43). Physical methods are based on hydrogen bonds, permanent or induced dipole interactions (van der Waals' force or London dispersion force), and hydrophobic or ionic interactions of AMPs with surfaces (44-47). Some substrates have been used for AMP anchoring such as gold (32), titanium (31, 34, 40, 48), titanium dioxide (49), silicon (50), silicone (11, 41), polymeric brushes and resins (8, 51-54). Of note, immobilization onto substrate surfaces can be performed without any shape restriction, such as planar, spherical or curved geometries (55). However, specific surface properties (nature, composition, charge, hydrophilic or hydrophobic character, topography and roughness) and AMP characteristics (type, charge, molecular size and conformational stability) interfere in the immobilization process (46). In addition, experimental conditions such as time, peptide concentration, pH and temperature should be also considered (46, 53).

The self-assembly technique is one of the main strategies used for physical AMP immobilization (56, 57). This approach is based on the alternating deposition of anionic and cationic layers on a solid substrate (58-60), enabling the obtainment of functionalized films through the insertion of AMPs between polyelectrolytes layers (55) and the control of film thickness and adsorbed biomolecule amount (56). Moreover, self-assembly is an effective procedure since it does not cause chemical changes in the functional peptide and maintains its conformational stability by retaining water molecules between the matrices (57, 61). One of the main features that make SAM films promising for biotechnological applications is the possibility of temporal control over incorporated AMP release in hydrolytically degradable polymers through surface erosion (57, 62-64).

Several studies have demonstrated good prospects for AMP application in polymeric films. However, some disadvantages could be associated with the self-assembly technique, limiting its application for obtaining implants coated by biomaterials and medical devices (55). An important disadvantage comprises AMP incorporation into the lower layers of the film, which restricts their direct contact with the surrounding bulk (31). AMP bioactivity is dependent on the diffusion process at the interface, being influenced by the tortuosity of the diffusion (64) via film thickness (65) and intermolecular interactions between the polymer and peptide (66). A relatively fast peptide release from the polymeric films results in a decreased amount of anchored AMPs, interfering in the minimum AMP concentration required to inhibit the growth of

microorganisms and increase the number of biomolecules in the bulk (55). In addition, a fast release can provide conditions for the development of bacterial resistance, local toxicity and hemolytic activity (45, 55). Therefore, the limitations of the self-assembly technique should be considered prior to its use as a strategy for obtaining more effective antimicrobial coatings.

The achievement of antimicrobial coatings with adequate properties results from the improvement of immobilization techniques (16, 39). The development of appropriate methodologies for coating surfaces ensures biological peptide properties including mechanism of action, wide spectrum bioactivity, stability in adverse conditions and low propensity for the development of bacterial resistance (3, 40-42). However, this requires some factors that influence the performance of these biomolecules, such as peptide orientation, surface concentration of bounded AMPs, spacer length and flexibility, which determine the lateral mobility of AMPs (5, 7). Under these conditions, the use of chemical methods for the immobilization of AMPs onto solid surfaces has increased (27).

4. CHEMICAL APPROACHES FOR COVALENT IMMOBILIZATION OF AMPs ONTO SURFACES

Chemical immobilization of AMPs is an alternative strategy for coating surfaces and improving peptide stability. Consequently, the duration of the antimicrobial efficacy is increased and is further associated with a reduction in the toxicological risks for patients by reducing the leaching of peptides (8, 37, 65, 66). Besides these advantages, adequate AMP orientation on the substrate can provide greater bioactivity (20, 67). For these reasons, covalent bonds have been extensively studied as a tool to overcome the limitations of the physical anchoring methods (20, 54, 68). However, it is important to emphasize that chemical immobilization can alter the conformational structure of the molecule, restrict its mobility and interfere in the mechanism of action (46). Therefore, molecular coupling mechanisms should be thoroughly evaluated for the maintenance of bioactive AMP properties (52).

Chemical immobilization involves the formation of at least one covalent bond between the surface and the responsible biomolecule to provide stability to antimicrobial film (20). Stability is obtained through the high binding energy of covalent bonds, which prevents spontaneous peptide uncoupling (8, 10, 69). Covalent bonds are classified as selective or non-selective (70). A selective bond between AMPs and substrates can be obtained through the insertion of a specific functional group in the molecular structure of the peptide via chemical synthesis (35). In addition, it is possible to control the route of reaction and orientation of the biomolecule (8, 48, 71). On the other hand, non-selective immobilization occurs naturally without requiring additional chemical modifications in the peptides. In this case, covalent binding uses the intrinsic functional groups (e.g. carboxylic acid, amino, sulfhydryl and hydroxyl groups) of the peptide sequence to react chemically with activated surfaces. Non-selective immobilization can result in more than one type of covalent binding with different orientations of the biomolecule (42, 72). However, for non-reactive surfaces, the functional groups should be inserted through spacers to obtain a covalent bond between AMPs and surfaces (73). Substrate

modification can be performed using SAM composed by chemically-reactive organic molecules, as a simple and effective strategy (35, 74-76). The spacer length can be varied from one to several carbon atoms with a direct influence on AMP bioactivity (35).

Another strategy to covalently immobilize AMPs involves the use of functionalized polymer resins such as polyethylene glycol (PEG) or other ‘brushes’ that bear reactive groups suitable for coupling peptides (8, 10, 51, 53). PEG is one of the main spacers used in the activation of surfaces by presenting the anti-adhesive property that prevents or minimizes bacterial colonization (77-79). In addition, PEG is an amphiphilic and flexible polymer that allows for greater lateral mobility of the AMPs and retention of water molecules in its interior. PEG is capable of maintaining the bactericidal activity of peptides after immobilization onto solid supports (25). However, a disadvantage of the use of polymers as spacers consists in the possibility of polymer chain degradation and premature AMP release (53).

A wide variety of chemical coupling methods for the immobilization of AMPs onto surfaces are shown in Figure 1. Carboxylic acid-functionalized surfaces can react with primary amines, leading to the formation of peptide bonds (amide bonds) (73). However, the reactive chemical groups on the surface should be initially activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure 1a) (35, 73). On the other hand, the AMP immobilization onto amino-functionalized surfaces is similarly obtained, as explained previously, for carboxylic acid-functionalized surfaces. In this case, the accessible carboxylic groups of the peptide should be activated with the EDC:NHS coupling method before being added to the functionalized surface (Figure 1b) (35). The carboxyl-amine conjugation reactions based on the use of EDC and NHS occur in two sequential steps. EDC first reacts with a carboxyl group, forming an amine-reactive O-acylisourea intermediate. This unstable intermediate is susceptible to hydrolysis and stabilized through the addition of NHS by converting it to a semistable amine-reactive NHS ester (Figure 1a). After the addition of NHS, it is possible to obtain a stable amide bond with a 10-20 fold increase in coupling efficiency. Carbodiimide cross linker chemistry is widely used for the immobilization of peptides on modified surfaces with carboxyl (Figure 1a) or amino groups (Figure 1b) (80-82). Another strategy for biomolecule immobilization is based on aldehyde groups displayed on functionalized surfaces. This approach can be used to covalently bind AMPs from primary amines, resulting in the formation of imine bonds. However, since the imine bonds are unstable, they should be converted to amine bonds through reducing agents, as sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN), for the stabilization of anchored peptides (Figure 1c) (71, 83).

The surface coupling strategy also uses isothiocyanate for the attachment of peptides via primary amine groups (Figure 1d) (35). Disulfide bonds can also be used to immobilize many peptides and proteins. Surfaces modified with thiol groups can covalently immobilize AMPs through disulfide bonds established between the surface and cysteine residues of the peptide (Figure 1e) (70, 84). AMPs can be attached to maleimide-functionalized surfaces through covalent bonds established between the thiol group of the peptide and the α,β -unsaturated carboxyl of the maleimide (Figure 1f) (25, 52). AMPs containing thiol or primary amino group derivatives (e.g. amino acids cysteine and lysine, respectively) can be easily immobilized onto

epoxide-functionalized surfaces through a nucleophilic ring opening in a spontaneous reaction (Figure 1g) (83, 85).

There are currently two reaction mechanisms for AMP immobilization onto alcohol-functionalized surfaces (Figure 1h). In the first mechanism, the spacers containing hydroxyl groups are derivatized with an amino alcohol such as ethanolamine. Subsequently, the peptides whose carboxylic acid groups were previously activated with EDC:NHS solution are added to the modified surface, resulting in a covalent bond (35). In the second mechanism, the spacers presenting the alcohol function are derivatized with an aldehyde (e.g., glutaraldehyde). Therefore, the immobilization of AMPs on aldehyde-modified surfaces occurs similarly, as has been shown previously (35). As explained before, diverse methodologies for AMP immobilization onto solid surfaces are available. However, the advantages and disadvantages of each technique should be evaluated for obtaining effective antibacterial films(46). Therefore, the molecular coupling process should be rigorously controlled for the maintenance of the bioactive properties of the peptides and the functionality of the final product (42, 43).

5. EFFECTIVENESS OF AMPS IMMOBILIZED ONTO A BIOMATERIAL SURFACE

Antimicrobial peptides have a well-defined mechanism of action described by interaction models that evaluate the association between the sequence of peptides and bacterial cell wall (86-88). The search for improving the efficiency of AMP-bacteria interaction also leads to the development of artificial peptides and the discovery of novel, natural peptides extracted from various living organisms. In recent years, there has been increased interest in developing new antimicrobial biomaterials in pre/post-surgery processes to avoid nosocomial infections (25). The applications of immobilized AMPs are an excellent alternative for use against nosocomial infections caused by common pathogens and antibiotic-resistant microorganisms (8, 42). AMPs have been tested on diverse solid surfaces such as resins, glass, silicone, titanium and stainless steel for clinical use (43, 89).

Resins are solid polymers obtained from plants or chemical synthesis. Some resins are chemically modified and useful as a substrate for AMP immobilization due to their high molecular weight and amide/amine moieties in its molecular chain (10, 90) (Table 1). However, physicochemical characteristics of resins do not contribute to clinical applications. Of note, these materials are important to obtain a better understanding of the mechanisms of action of surface-active peptides (8, 53).

Haynie *et al.* studied the bactericidal effects of magainin 2 and various synthetic peptides mainly containing lysine, leucine and glycine in their compositions, utilizing an ethylenediamine-modified polyamide resin (Pepsin K). Altogether, 70% of the tested peptides, which included magainin2, showed bactericidal activity against fungi and Gram-positive and Gram—negative strains. Among them, E14LKK showed the highest antibacterial activity, except for *P. aeruginosa* and *A. niger*. Other studies also used E14LKK immobilized onto polyethylene film containing PEG as the intermediate binder. The peptide remained active and reduced *E. coli* strains up to 3 log (54).

The covalent immobilization of AMPs at different binding sites and with different length

spacers also influences biocidal and hemolytic activities. Two α -helical cationic AMPs, MK5E and KLAL, were immobilized on polystyrene resin beads (Table 1). MK5E is an AMP derived from magainin2 having only microbicidal activity while KLAL has both biocidal and hemolytic activities. Bagheri *et al.* used resin beads with different sizes (TentaGel S NH₂, HypoGel 200, and 400 NH₂) with covalently linked peptides via N and C terminal chains. They demonstrated that the antibacterial activity of cationic AMPs was influenced by spacer length. AMP biocidal activity is directly dependent on the spacer length, providing more flexibility and capacity to interact with microorganism surfaces (8).

Bioactive glasses also provide an advantage in forming an interface between implant and organism without inducing immune responses. This type of glass has potential applications in dentistry (91), ophthalmology (92) and orthopedics (93). However, there are still few studies on the immobilization of AMPs onto glass (72, 94). These materials have been used for the immobilization of melamine, a cationic peptide modified by covalent bonding. In addition, ligands such as 4-azidobenzoic acid or 4-fluoro-3-nitrophenyl azide are used to modify glass substrate surfaces (72) (Table 1). Glass coated by indium-tin-oxide was also functionalized with silane coatings containing epoxy rings (3-glycidyloxypopyl-trimethoxysilane (94).

Silicone is a synthetic polymer obtained from fluid resin or elastomer forms. Silicone is one of the most cited materials for peptide immobilization and is extensively used in the medical and pharmaceutical fields due to its biocompatibility and wide range of physical forms. In addition, this polymer is applied in manufacturing medical devices and prostheses (e.g., catheters and stents) (95, 96). New approaches have been developed to prevent biofilm formation on pre/post-surgical procedures aiming to decrease mortality rates and costs to public health (97-99).

Some peptides have been immobilized on venous catheters composed of silicone for the development of bactericidal surfaces against bacterial strains (38). The understanding of the interactions between AMPs and bacteria has led to the development of novel synthetic peptides (e.g. CW11, RK1 and RK2) (11, 100). CW11, a synthetic peptide, was chemically immobilized on a polydimethylsiloxane (PDMS) surface maintaining an *in vitro* bactericidal effect (Table 1). CW11 is mainly composed of tryptophan and arginine, which contribute to a better adhesion process on bacterial surfaces even under saline conditions. CW11 has low cytotoxicity and excellent antibiotic activity against *E.coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* as compared to conventional antibiotics. Thus, the CW11 peptide is an alternative for modifying medical devices based on silicone as a substrate (100).

In addition, other peptides such as RK1 and RK2 (both derived from the human beta-defensin-28 variant) showed a broad antimicrobial spectrum, tolerance to saline conditions and can be used in the modification of silicone surfaces (101) (Table 1). These peptides are rich in arginine, lysine and tryptophan residues, showing antimicrobial activity against *E.coli*, *S. aureus* and *C. albicans* in phosphate buffered solutions and urine samples. Cultures of smooth muscle cells showed no signs of toxicity, demonstrating biocompatibility for use in urinary catheters. Therefore, the development of new peptides is an alternative for covering catheters and preventing urinary tract infections (11). In addition, new, natural and/or synthetic peptides have been used to modify metal surfaces such as titanium, and have been applied in clinical and

preclinical research studies (9, 31, 40, 102).

Titanium (Ti) is another material used for implants in dental and orthopedic applications (12, 13). Likewise, the properties of biocompatibility, corrosion resistance and ability to bind to bone has induced new research studies (103). The use of AMPs and Ti is associated with the lack of toxicity and low immune response. The bactericidal effectiveness of LL-37 on Ti surfaces was evaluated (104, 105) (Table 1). LL-37 is a peptide derived from cathelicidin and extracted from epithelial cells and neutrophil granules. Zanetti *et al.* (104) performed the immobilization of LL37 by covalent bonding strategies using PEG as a spacer between solid surfaces and the peptide. In addition, LL-37 with cysteine (Cys-LL37) was used to assess binding to the spacer. The presence of cysteine ensured stable bonding with PEG and better mobility of LL-37, facilitating the interaction with the evaluated bacterial cell membrane. AMPs conjugated to spacers (copolymer “brushes”) with a low density provide a high number of peptide/polymer chains, which results in higher antimicrobial activity (48).

Besides LL-37, another example of AMPs extracted from humans are human lactoferrins (hLF). In addition, hLFs are involved in the activation and differentiation processes and immune responses against microorganisms (106-108). The peptide hLF1-11 is effective against strains of *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus salivarius*, preventing the formation of biofilms at the early stages. Recently, the antimicrobial effect of the hLF1-11 attached to Ti surfaces was demonstrated to be effective for dental applications (31).

On the other hand, stainless steel (SS) is a metal present in several areas where hygiene is essential, including the home, the food industry and the medical field. The presence of SS in hospital environments highlights its importance for developing antimicrobial surfaces in order to avoid pre/postoperative infections (109, 110). In this context, the functionalization of organic polymers deposited by plasma (glow discharge plasma) is essential to immobilize covalent peptides. The process occurred by binding the peptide amine groups and epoxy groups from polymerized interlayers deposited via plasma on SS surfaces. These systems reduced the growth of *E. coli* and *B. subtilis* ranging from 3 to 6 log¹⁰ in accordance with the tested peptide (85). In addition, chitosan polymer layers (1,4 linked N-acetyl glucosamine and glucosamine) were used on SS surfaces to immobilize the AMPs nisin and Magainin I. This strategy was possible due to the insertion of terephthalaldehyde cross linker (111). New studies, even at early stages, are essential to contribute to the development and improvement of biomaterials for clinical use and biodevice implantation.

6. CONCLUSION

Since bacterial resistance is still one of the major problems facing modern societies, new strategic therapies to combat microorganisms resistant to conventional antibiotics are required. In this context, antimicrobial peptides are promising due to their biocompatibility, low toxicity and high effectiveness. Synthetic forms of peptides also have increased their microbicidal activity. Currently, chemical methods for immobilization of AMPs on surfaces are considered valuable tools for the construction of modified biodevices. Chemical immobilization provides improvements in peptide stability and ensures an adequate orientation of the biomolecule.

Covalent bonding overcomes limitations of the physical anchoring methods, creating films with greater antimicrobial efficacy. Chemical approaches to covalent immobilization of AMPs on solid surfaces, such as orthopedic implants and surgical instruments, represent an advance in the prevention of nosocomial infections. Although many studies are still in the initial phase, they represent the first step towards the development and improvement of new antimicrobial biomaterials with the capability of reducing infections in hospital environment and improving human health.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Pernambuco State Foundation for Research Support (FACEPE), Nanobiotechnology/CAPES. Silva and Ribeiro would like to thank FACEPE for scholarships.

8. REFERENCES

1. S B Levy, B Marshall: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, 10(12 Suppl), S122-9 (2004)
2. M F Mohamed, M N Seleem: Efficacy of short novel antimicrobial and anti-inflammatory peptides in a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) skin infection. *Drug Des Dev Ther*, 8, 1979-83 (2014)
3. K Molbak: Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans-the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51(8-9), 364-9 (2004)
4. K V Reddy, R D Yedery, C Aranha: Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 24(6), 536-47 (2004)
5. M Zasloff: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-95 (2002)
6. T Ganz: Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3(9), 710-20 (2003)
7. Z Wang and G Wang: APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue), D590-2 (2004)
8. M Bagheri, M Beyermann, M Dathe: Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(3), 1132-41 (2009)

9. S Makihiro, H Nikawa, T Shuto, M Nishimura, Y Mine, K Tsuji, K Okamoto, Y Sakai, M Sakai, N Imari, S Iwata, M Takeda, F Suehiro: Evaluation of trabecular bone formation in a canine model surrounding a dental implant fixture immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin. *J Mater Sci Mater Med*, 22(12), 2765-72 (2011)
10. S L Haynie, G A Crum, B A Dole: Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(2), 301-7 (1995)
11. X Li, P Li, R Saravanan, A Basu, B Mishra, S H Lim, X Su, P A Tambyah, S S Leong: Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties. *Acta Biomater*, 10(1), 258-66 (2014)
12. S Bencharit, W C Byrd, S Altarawneh, B Hosseini, A Leong, G Reside, T Morelli, S Offenbacher: Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*, 16(6), 817-26 (2014)
13. E Vanderleyden, S Van Bael, Y C Chai, J P Kruth, J Schrooten, P Dubruiel: Gelatin functionalised porous titanium alloy implants for orthopaedic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 42, 396-404 (2014)
14. J W Costerton, P S Stewart, E P Greenberg: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-22 (1999)
15. C C de Carvalho: Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Pat Biotechnol*, 1(1), 49-57 (2007)
16. W M D Jr: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 155-66 (2002)
17. L Zhao, P K Chu, Y Zhang, Z Wu: Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91(1), 470-80 (2009)
18. A Schmidtchen, M Pasupuleti, M Malmsten: Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Adv Coll Interf Sci*, 205(0), 265-274 (2014)
19. D Andreu, L Rivas: Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47(6), 415-33 (1998)
20. F Costa, I F Carvalho, R C Montelaro, P Gomes, M C L Martins: Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*, 7(4), 1431-1440 (2011)
21. W van 't Hof, E C Veerman, E J Helmerhorst, A V Amerongen: Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem*, 382(4), 597-619 (2001)
22. L A C Carvalho, M T Machini: Hemocidinas derivadas da hemoglobina: estruturas, propriedades e perspectivas. *Quim Nova*, 36, 1021-1029 (2013)

23. K A Brogden: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-50 (2005)
24. R R Silva, K Y Avelino, K L Ribeiro, O L Franco, M D Oliveira, C A S Andrade: Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for microorganism diagnosis. *Front Microbiol*, 5, 443 (2014)
25. F Costa, I F Carvalho, R C Montelaro, P Gomes, M C Martins: Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*, 7(4), 1431-40 (2011)
26. G Gao, D Lange, K Hilpert, J Kindrachuk, Y Zou, J T Cheng, M Kazemzadeh-Narbat, K Yu, R Wang, S K Straus, D E Brooks, B H Chew, R E Hancock, J N Kizhakkedathu: The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials*, 32(16), 3899-909 (2011)
27. R O Darouiche: Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*, 350(14), 1422-9 (2004)
28. J Vila, A Soriano, J Mensa: (Molecular basis of microbial adherence to prosthetic materials. Role of biofilms in prosthesis-associated infection). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26(1), 48-54 (2008)
29. R T Cleophas, J Sjollem, H J Busscher, J A Kruijtz, R M Liskamp: Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel. *Biomacromolecules*, 15(9), 3390-5 (2014)
30. L H Eckhard, A Sol, E Abtew, Y Shai, A J Domb, G Bachrach, N Beyth: Biohybrid polymer-antimicrobial peptide medium against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*, 9(10), e109413 (2014)
31. M Godoy-Gallardo, C Mas-Moruno, M C Fernandez-Calderon, C Perez-Giraldo, J M Manero, F Albericio, F J Gil, D Rodriguez: Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater*, 10(8), 3522-34 (2014)
32. A Lombana, Z Raja, S Casale, C M Pradier, T Foulon, A Ladram, V Humblot: Temporin-SHa peptides grafted on gold surfaces display antibacterial activity. *J Pept Sci*, 20(7), 563-9 (2014)
33. M Dawgul, M Maciejewska, M Jaskiewicz, A Karafova, W Kamysz: Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol Pharm*, 71(1), 39-47 (2014)
34. M Kazemzadeh-Narbat, J Kindrachuk, K Duan, H Jenssen, R E Hancock, R Wang: Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*, 31(36), 9519-26 (2010)
35. S A Onaizi, S S Leong: Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges. *Biotechnol Adv*, 29(1), 67-74 (2011)

36. G Wang, M L Hanke, B Mishra, T Lushnikova, C E Heim, V Chittezh Thomas, K W Bayles, T Kielian: Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds. *ACS Chem Biol*, 9(9), 1997-2002 (2014)
37. L Ferreira, A Zumbuehl: Non-leaching surfaces capable of killing microorganisms on contact. *J Mater Chem*, 19(42), 7796-7806 (2009)
38. M B Fontana, M C Bastos, A Brandelli: Peptide-like substances as antimicrobial barriers to *Corynebacterium* sp. adhesion to silicone catheters. *Lett Appl Microbiol*, 45(3), 324-9 (2007)
39. P H Kwakman, A A te Velde, C M Vandenbroucke-Grauls, S J van Deventer, S A Zaat: Treatment and prevention of *Staphylococcus epidermidis* experimental biomaterial-associated infection by bactericidal peptide 2. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(12), 3977-83 (2006)
40. X W Tan, T W Goh, P Saraswathi, C L Nyein, M Setiawan, A Riau, R Lakshminarayanan, S Liu, D Tan, R W Beuerman, J S Mehta: Effectiveness of antimicrobial peptide immobilization for preventing perioperative cornea implant-associated bacterial infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(9), 5229-38 (2014)
41. B Mishra, A Basu, R R Y Chua, R Saravanan, P A Tambyah, B Ho, M W Chang, S S J Leong: Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens. *J Mater Chem B*, 2(12), 1706-1716 (2014)
42. K Rapsch, F F Bier, M Tadros, M. von Nickisch-Rosenegk: Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconjug Chem*, 25(2), 308-19 (2014)
43. D Alves, M Olivia Pereira: Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*, 30(4), 483-99 (2014)
44. D Leckband, J Israelachvili: Intermolecular forces in biology. *Q Rev Biophys*, 34(2), 105-267 (2001)
45. A D Buckingham: Permanent and Induced Molecular Moments and Long-Range Intermolecular Forces. In: *Advances in Chemical Physics*. John Wiley & Sons, Inc., (2007)
46. L Karam, C Jama, P Dhulster, N Chihib: Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *J Mater Environ Sci*, 4(5), 24 (2013)
47. J C Stendahl, M S Rao, M O Guler, S I Stupp: Intermolecular Forces in the Self-Assembly of Peptide Amphiphile Nanofibers. *Adv Funct Mater*, 16(4), 499-508 (2006)
48. G Gao, K Yu, J Kindrachuk, D E Brooks, R E Hancock, J N Kizhakkedathu: Antibacterial surfaces based on polymer brushes: investigation on the influence of brush properties on antimicrobial peptide immobilization and antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 12(10), 3715-27 (2011)

49. A R Statz, J P Park, N P Chongsiriwatana, A E Barron, P B Messersmith: Surface-immobilised antimicrobial peptoids. *Biofouling*, 24(6), 439-48 (2008)
50. A Basu, B Mishra, S S Jan Leong: Immobilization of poly(bia-MPI) by allyl glycidyl ether based brush chemistry to generate a novel antimicrobial surface. *J Mater Chem B*, 1(37), 4746-4755 (2013)
51. W M Cho, B P Joshi, H Cho, K H Lee: Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(21), 5772-6 (2007)
52. K Glinel, A M Jonas, T Jouenne, J Leprince, L Galas, W T Huck: Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjug Chem*, 20(1), 71-7 (2009)
53. P Appendini, J H Hotchkiss: Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. *J Appl Polym Sci*, 81(3), 609-616 (2001)
54. M D Steven, J H Hotchkiss: Covalent immobilization of an antimicrobial peptide on poly(ethylene) film. *J Appl Polym Sci*, 110(5), 2665-2670 (2008)
55. O Etienne, C Picart, C Taddei, Y Haikel, J L Dimarcq, P Schaaf, J C Voegel, J A Ogier, C Egles: Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 3662-9 (2004)
56. D Alves, M O Pereira: Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*, 30(4), 483-499 (2014)
57. A Shukla, K E Fleming, H F Chuang, T M Chau, C R Loose, G N Stephanopoulos, P T Hammond: Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*, 31(8), 2348-57 (2010)
58. K Ariga, J P Hill, Q Ji: Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Phys Chem Chem Phys*, 9(19), 2319-40 (2007)
59. G Decher, J D Hong, J Schmitt: Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210-211, Part 2(0), 831-835 (1992)
60. G Decher, M Eckle, J Schmitt, B Struth: Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr Opin Coll Interf Sci*, 3(1), 32-39 (1998)
61. W Soliman, S Bhattacharjee, K Kaur: Adsorption of an antimicrobial peptide on self-assembled monolayers by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B*, 114(34), 11292-302 (2010)
62. D M Lynn: Peeling Back the Layers: Controlled Erosion and Triggered Disassembly of Multilayered Polyelectrolyte Thin Films. *Adv Mater*, 19(23), 4118-4130 (2007)

63. E Vázquez, D M Dewitt, P T Hammond, D M Lynn: Construction of Hydrolytically-Degradable Thin Films via Layer-by-Layer Deposition of Degradable Polyelectrolytes. *J Am Chem Soc*, 124(47), 13992-13993 (2002)
64. K C Wood, H F Chuang, R D Batten, D M Lynn, P T Hammond: Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(27), 10207-10212 (2006)
65. J M Goddard, J H Hotchkiss: Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci*, 32(7), 698-725 (2007)
66. K Vasilev, J Cook, H J Griesser: Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert Rev Med Devices*, 6(5), 553-567 (2009)
67. N Aumsuwan, R C Danyus, S Heinhorst, M W Urban: Attachment of Ampicillin to Expanded Poly(tetrafluoroethylene): Surface Reactions Leading to Inhibition of Microbial Growth. *Biomacromolecules*, 9(7), 1712-1718 (2008)
68. X Qi, G Poernomo, K Wang, Y Chen, M B Chan-Park, R Xu, M W Chang: Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties. *Nanoscale*, 3(4), 1874-1880 (2011)
69. P Appendini, J H Hotchkiss: Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci Emerg Technol*, 3(2), 113-126 (2002)
70. F Rusmini, Z Zhong, J Feijen: Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789 (2007)
71. P Jonkheijm, D Weinrich, H Schröder, C M Niemeyer, H Waldmann: Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew Chem Int Ed*, 47(50), 9618-9647 (2008)
72. R Chen, N Cole, M D Willcox, J Park, R Rasul, E Carter, N Kumar: Synthesis, characterization and in vitro activity of a surface-attached antimicrobial cationic peptide. *Biofouling*, 25(6), 517-524 (2009)
73. V Humblot, J F Yala, P Thebault, K Boukerma, A Héquet, J M Berjeaud, C M Pradier: The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*, 30(21), 3503-3512 (2009)
74. J J Gooding, F Mearns, W Yang, J Liu: Self-Assembled Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications. *Electroanalysis*, 15(2), 81-96 (2003)
75. T P Sullivan, W T S Huck: Reactions on Monolayers: Organic Synthesis in Two Dimensions. *Eur J Org Chem*. 2003(1), 17-29 (2003)
76. A Ulman: Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev*, 96(4), 1533-1554 (1996)

77. F Boulmedais, B Frisch, O Etienne, P Lavalle, C Picart, J Ogier, J C Voegel, P Schaaf, C Egles: Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials*, 25(11), 2003-2011 (2004)
78. L G Harris, S Tosatti, M Wieland, M Textor, R G Richards: Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(l-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, 25(18), 4135-4148 (2004)
79. P Kingshott, J Wei, D Bagge-Ravn, N Gadegaard, L Gram: Covalent attachment of poly(ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. *Langmuir*, 19(17), 6912-6921 (2003)
80. Y Gao, I Kyratzis: Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide--a critical assessment. *Bioconjug Chem*, 19(10), 1945-50 (2008)
81. D Sehgal, I K Vijay: A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal Biochem*, 218(1), 87-91 (1994)
82. J V Staros, R W Wright, D M Swingle: Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem*, 156(1), 220-2 (1986)
83. L S Wong, F Khan, J Micklefield: Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chem Rev*, 109(9), 4025-4053 (2009)
84. S J Oh, B J Hong, K Y Choi, J W Park: Surface modification for DNA and protein microarrays. *OMICS*, 10(3), 327-343 (2006)
85. C Vreuls, G Zocchi, B Thierry, G Garitte, S S Griesser, C Archambeau, C Van de Weerd, J Martial, H Griesser: Prevention of bacterial biofilms by covalent immobilization of peptides onto plasma polymer functionalized substrates. *J Mater Chem*, 20(37), 8092-8098 (2010)
86. M Rahnamaeian: Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal Behav*, 6(9), 1325-32 (2011)
87. J J Lopez Cascales, A Garro, R D Porasso, R D Enriz: The dynamic action mechanism of small cationic antimicrobial peptides. *Phys Chem Chem Phys*, 16(39), 21694-705 (2014)
88. K L Lam, H Wang, T A Siaw, M R Chapman, A J Waring, J T Kindt, K Y Lee: Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1818(2), 194-204 (2012)
89. R E Hancock, H G Sahl: Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24(12), 1551-7 (2006)
90. M Bagheri, M Beyermann, M Dathe: Mode of action of cationic antimicrobial peptides defines the tethering position and the efficacy of biocidal surfaces. *Bioconjug Chem*, 23(1), 66-74 (2012)

91. A Kirsten, A Hausmann, M Weber, J Fischer, H Fischer: Bioactive and thermally compatible glass coating on zirconia dental implants. *J Dent Res*, 94(2), 297-303 (2015)
92. J Ye, J He, C Wang, K Yao, Z Gou: Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity. *Biotechnol Lett*, 36(5), 961-8 (2014)
93. N Drnovsek, S Novak, U Dragin, M Ceh, M Gorenssek, M Gradisar: Bioactive glass enhances bone ingrowth into the porous titanium coating on orthopaedic implants. *Int Orthop*, 36(8), 1739-45 (2012)
94. M Mohorcic, I Jerman, M Zorko, L Butinar, B Orel, R Jerala, J. Friedrich: Surface with antimicrobial activity obtained through silane coating with covalently bound polymyxin B. *J Mater Sci Mater Med*, 21(10), 2775-2782 (2010)
95. B Ashar, R S W Jr, L R Turcotte: Development of a silica-free silicone system for medical applications. *J Biomed Mater Res*, 15(5), 663-72 (1981)
96. E Briganti, P Losi, A Raffi, M Scoccianti, A Munao, G Soldani: Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. *J Mater Sci Mater Med*, 17(3), 259-66 (2006)
97. M C Musolf: Altering the physical properties of silicone elastomers for medical device applications. *Med Device Technol*, 1(1), 26-9 (1990)
98. L Azevedo Calderon, A A Silva, P Ciancaglini, R G Stabeli: Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*, 40(1), 29-49 (2011)
99. A Giacometti, O Cirioni, M S Del Prete, F Barchiesi, A M Paggi, E Petrelli, G Scalise: Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 46(5), 807-10 (2000)
100. K Lim, R R Chua, R Saravanan, A Basu, B Mishra, P A Tambyah, B Ho, S S Leong: Immobilization studies of an engineered arginine-tryptophan-rich peptide on a silicone surface with antimicrobial and antibiofilm activity. *ACS Appl Mater Interf*, 5(13), 6412-22 (2013)
101. R Saravanan, X Li, K Lim, H Mohanram, L Peng, B Mishra, A Basu, J M. Lee, S Bhattacharjya, S S Leong: Design of short membrane selective antimicrobial peptides containing tryptophan and arginine residues for improved activity, salt-resistance, and biocompatibility. *Biotechnol Bioeng*, 111(1), 37-49 (2014)
102. M Yoshinari, T Kato, K Matsuzaka, T Hayakawa, K Shiba: Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. *Biofouling*, 26(1), 103-10 (2010)

103. E Vasilescu, P Drob, D Raducanu, V D Cojocaru, I Cinca, D Iordachescu, R Ion, M Popa, C Vasilescu: In vitro biocompatibility and corrosion resistance of a new implant titanium base alloy. *J Mater Sci Mater Med*, 21(6), 1959-1968 (2010)
104. M Zanetti, R Gennaro, D Romeo: Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, 374(1), 1-5 (1995)
105. M Gabriel, K Nazmi, E C Veerman, A V Nieuw Amerongen, A Zentner: Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjug Chem*, 17(2), 548-50 (2006)
106. W J Velden, T M van Iersel, N M Blijlevens, J P Donnelly: Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC Med*, 7, 44 (2009)
107. A M van der Does, P J Hensbergen, S J Bogaards, M Cansoy, A M Deelder, H C van Leeuwen, J W Drijfhout, J T van Dissel, P H Nibbering: The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 exerts immunomodulatory effects by specific inhibition of myeloperoxidase activity. *J Immunol*, 188(10), 5012-9 (2012)
108. A M van der Does, S J Bogaards, L Jonk, M Wulferink, M P Velders, P H Nibbering: The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced TLR-mediated immune response. *Biometals*, 23(3), 493-505 (2010)
109. H Ceylan, A B Tekinay, M O Guler: Selective adhesion and growth of vascular endothelial cells on bioactive peptide nanofiber functionalized stainless steel surface. *Biomaterials*, 32(34), 8797-805 (2011)
110. E M Davis, D Y Li, R. T Irvin: A peptide-stainless steel reaction that yields a new bioorganic-metal state of matter. *Biomaterials*, 32(23), 5311-9 (2011)
111. A Hequet, V Humblot, J M Berjeaud, C M Pradier: Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. *Coll Surf B Biointerf*, 84(2), 301-9 (2011)

Abbreviations: AMP: antimicrobial peptide, PEG: Polyethylene glycol, CPTES: chloropropyltriethoxysilane, APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane, hLF: human lactoferrin, Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, AGE:allylglycidyl ether, ABA: 4-azidobenzoic acid, FNA: 4-fluoro-3-nitrophenyl azide, SAM: self-assembly monolayers

Key Words: Antimicrobial peptides, Immobilization, Surface, Biomaterial, Review

Send correspondence to: Cesar Andrade, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil, Tel: 55-81-2126-8-450, Fax: 55-81-2126-8-576, E-mail: csrandrade@gmail.com

Figure 1. Examples of chemical strategies for controlled covalent attachment of AMPs on surfaces functionalized with different reactive groups. a) Surfaces functionalized with carboxylic acid groups can be used to covalently bind AMPs via coupling agents 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) that activate the chemical groups on the surface. b) AMPs can be attached to amino-functionalized surfaces through activation of their carboxylic groups with EDC and NHS before incubating on the surface. c) Aldehyde groups present on functionalized surfaces can chemically react with amine groups of AMPs and establish stable covalent bonds through reducing agents, such as sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN). AMPs can be immobilized on solid supports functionalized with d) isothiocyanate, e) thiol, f) maleimide and g) epoxide groups. Except for anchoring of AMPs on isothiocyanate modified-surfaces, the use of thiol-bearing peptides is verified for covalent immobilization of AMPs on surfaces functionalized with thiol, maleimide and epoxide groups. In all cases, the chemical coupling occurs in a single step and without the need for additional reagents. h) Surfaces functionalized with alcohol can anchor AMPs via two reaction mechanisms. In the first mechanism, hydroxyl groups of spacers are derivatized with an amino alcohol, such as ethanolamine, and the carboxylic acid groups of AMPs are activated with EDC and NHS for the attachment of the peptides on the surface. In the second mechanism, hydroxyl groups of spacers are derivatized with an aldehyde (e.g. glutaraldehyde), subsequently, the immobilization of AMPs proceeds similarly to the anchoring of peptides on aldehyde-modified surfaces.

Table 1. AMP covalent immobilization on solid surfaces and their antimicrobial activity against bacteria, fungi and yeasts

Substratum	AMP	Chemistry Immobilization Strategy	Evaluated microorganisms	References
Polyamide resin (pepsynK)	Novel synthetic peptides and Magainin 2	Grafting of C-terminus to the polymer support during solid-phase peptide synthesis	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i>	10
PEG ¹ -Polystyrene (PEG-PS) resin beads	6K8L	Peptide synthesized by solid-phase peptide synthesis on a PEG-PS resin using Fmoc ² chemistry	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>S. aureus</i>	53
PEGylated resin beads (TentaGel S NH ₂ , HypoGel 400 NH ₂ and HypoGel 200 NH ₂)	KLAL and Magainin-derived peptide (MK5E)	C-terminal immobilization by standard solid-phase peptide synthesis and Fmoc chemistry; N-terminal and side-chain immobilization by thioalkylation and oxime formation	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	8
PEGylated resin beads (TentaGel S NH ₂ resin beads)	Melittin, Buforin 2 and Trirpticin	Thetered modified beads by oxime-forming ligation strategy	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	90
PEG-Polystyrene (PEG-PS) resin beads	amphipathic β -sheet peptides	Covalent binding by Fmoc chemistry on PEG-PS beads	<i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> .	51
Glass coverslips	Melimine	Grafting via ABA ³ and FNA ⁴ linkers	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	72

Indium-tin-oxide glass	Polymixin B	Silane containing epoxy rings to couple peptides by catalyst	<i>E. coli</i> . NCTC 8007	94
Polydimethylsiloxane (PDMS)	CW11	Cross-Linking of peptides to allylglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE ⁵ -PEG) via Sulfhydryl Chemistry	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	100
Silicone Urinary Catheter and Polydimethylsiloxane (PDMS)	RK1 and RK2	Cross-linking of peptides to allylglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE-PEG) via Sulfhydryl Chemistry	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	11
Pretreated Ti with amino silane and epoxy silane	LL-37	Site-specific conjugation through amine reactive NHS-group and the Thiol-reactive maleimide-moiety	<i>E. coli</i> .	105
Pretreated Tisilanization with CPTES or APTES	hLF ⁶ -11	Peptide physical adsorption and covalent binding with CPTES ⁷ or APTES ⁸	<i>S. sanguinis</i> <i>L. salivarius</i>	31
-	Nisin, Trp-11, 4K-C16	Covalent immobilization via reaction between amine groups on the peptides and surface epoxy groups on the plasma polymer interlayer	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	85
-	Nisin, Magainin I.	Covalent immobilization through grafting of chitosan, cross-linking agents and peptides	<i>L. ivanovii</i>	111

¹PEG: Polyethylene glycol, ²Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, ³ABA: 4-azidobenzoic acid, ⁴FNA: 4-fluoro-3-nitrophenyl azide, ⁵AGE: allylglycidyl ether, ⁶hLf: human lactoferrin, ⁷CPTES: chloropropyltriethoxysilane, ⁸APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane.

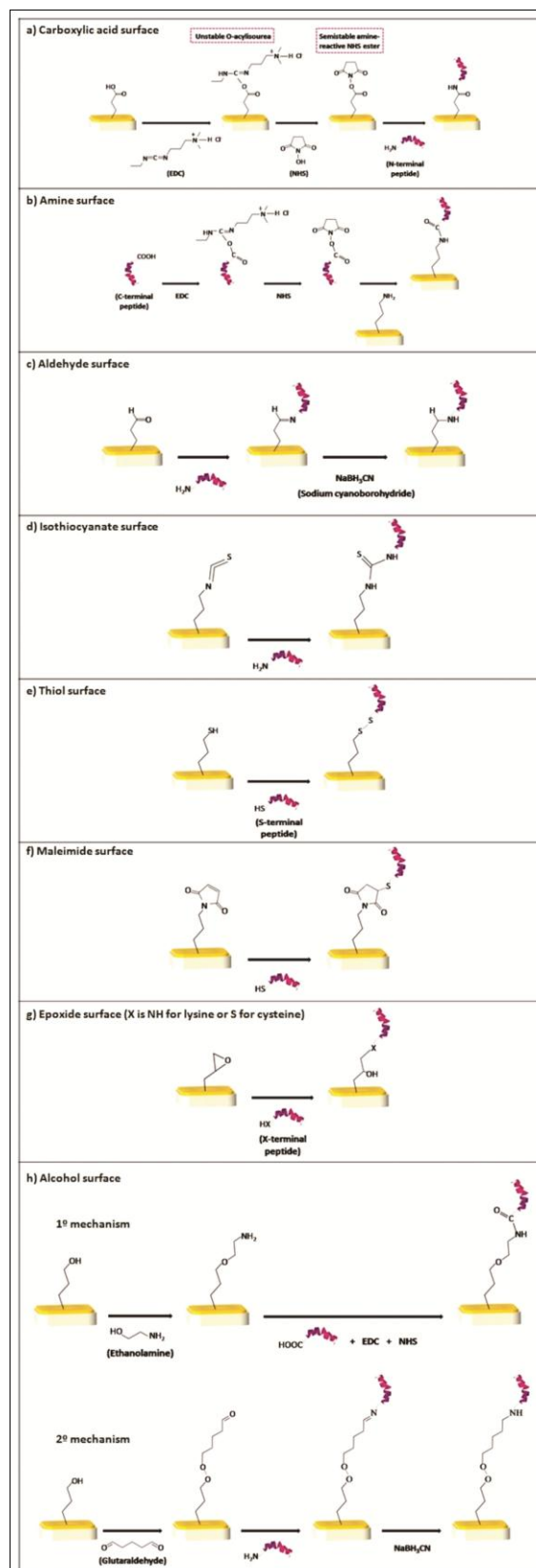


Figura 1.

