



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E IMUNOMODULADORA DE
CrataBL ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS**

RECIFE

2018

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E IMUNOMODULADORA DE
CrataBL ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, área de concentração Biologia Aplicada à Saúde Humana, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

Coorientadora: PROFA. DRA. ISABELLA MACÁRIO FERRO CAVALCANTI

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Campos, Luís André de Almeida

Avaliação das atividades biológicas e imunomoduladora de crataBL encapsulada em lipossoamas / Luís André de Almeida Campos. – 2018.

84 f. : il.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.

Coorientadora: Isabella Macário Ferro Cavalcanti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Doenças parasitárias. 2. Lectinas I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro (Coorientadora). III. Título.

616.96

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 247

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E IMUNOMODULADORA DE
CrataBL ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, área de concentração Biologia Aplicada à Saúde Humana, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 21/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Andresa Pereira de Oliveira Mendes
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Ao meu pai, Severino Campos, à minha mãe, Josefa Almeida, à minha mãe científica, Isabella Macário por estarem sempre ao meu lado, contribuindo fortemente na formação do meu caráter e encorajando-me a vencer todos os obstáculos presentes em minha vida. Obrigado por Tudo!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Pai de infinito amor, de bondade e misericórdia, por oportunizar essa fase de aprendizado e crescimento na dimensão intelectual, pessoal, profissional e também espiritual.

Ao Jesus, irmão querido e amado e a toda plêiade de espíritos amigos pela força interior que me foi ofertada para finalização desse momento e começo de outros novos momentos.

Aos meus pais, Severino Carneiro Campos, Maria Lúcia de Almeida (em memória) e a Josefa Maria de Almeida por todo amor e carinho, pela preocupação, por acreditarem em mim, no meu potencial e pelo exemplo de honestidade, caráter, boas virtudes, bem como pela contribuição na formação de minha integridade intelecto-moral.

À minha orientadora, Nereide Stela Santos-Magalhães, pelo acolhimento, pela oportunidade de realizar o mestrado com a senhora, por todo conhecimento que me foi oportunizado, a senhora é um exemplo de dedicação e competência.

À minha orientadora, Isabella Macário Ferro Cavalcanti, por todo apoio, por todo conhecimento que me ajudou a adquirir, pela amizade sincera, pela boa companhia, por toda compreensão, pelo auxílio nos momentos ruins de minha vida, a senhora é uma grande inspiração como professora e como orientadora. Muito obrigado por sempre inspirar o meu melhor.

Aos meus familiares que foram muito importantes nesse processo, por toda a ajuda, por todo apoio, por toda dedicação, por acreditarem e confiarem em mim e principalmente por todo o amor que me foi dado, sem esse amor eu não teria conseguido essa conquista.

Aos amigos que sempre tiveram pensamentos positivos e apoiaram-me nessa escolha e fase de minha vida, por toda compreensão nos momentos que não estavam presentes.

Aos amigos da pós-graduação que me fizeram aprender muito em diversos aspectos, pelas boas conversas, risadas, compartilhamento dos bons e maus

momentos, pela sua amizade sincera e afetuosa, em especial aos integrantes do NB4, Priscila Santos, Aline Larissa, Geilza Carla, Mirella Monteiro, Anna Oliveira, Anthony Alves e Wilson Lima.

À família espírita, em especial a Isabely Lustosa, Adja Cristina, Walter Lacerda, Beatriz Ribeiro, Maria de Jesus Albuquerque, por estarem sempre fazendo prece e emitindo boas vibrações, por me apoiarem em minhas decisões, por sempre elevar minha autoestima, por estar ao meu lado sempre que precisei, por serem bons amigos, por estarem lembrando-me que somos espíritos imortais em evolução e que tudo é aprendizado e crescimento.

Ao grupo de pesquisa em Microbiologia Clínica e Novas Abordagens Terapêuticas – MicroNAT, em especial, a João Oliveira e Sérgio Dias, Carla Branco que contribuiriam diretamente para esta dissertação, aos Ic's, Letícia Leoncio e Ylanna Alves por todo auxílio, pela amizade e por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos no momento dos experimentos.

Ao grupo de pesquisa em Sistema de Liberação Controlada de Fármacos – LNFARM por todo auxílio, pela amizade construída, pelas novas aprendizagens, por terem me acolhido com tanto carinho, pela oportunidade de aprendizado e troca de conhecimentos, em especial, a Rafaela Ferraz, Milena Ferraz, Marcela Araújo, Sarah Palácio, Vanderval de Oliveira, Danielle Rocha, Laís Macedo, Clara Barros Humberto Junior, e a Profa. Mariane Cajubá.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, em nome do Prof. Dr. Luiz Bezerra e Prof. Dr. Eduardo Beltrão, e em especial a Fábio, pela paciência, pela ampliação da minha visão enquanto pesquisador e por todo acolhimento.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em nome do Prof. Dr. José Luiz, pelo acolhimento, pela oportunidade de realização dos experimentos, pelos ensinamentos e principalmente pelo carinho e amizade estabelecida durante o convívio.

À Universidade Federal de Pernambuco e a todos os professores que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, pela mediação e oportunidade de construção dos conhecimentos.

Por fim, a todos que puderam contribuir para que eu conseguisse alcançar essa vitória. Afirmo que este é o término de uma fase e começo de uma nova em minha carreira acadêmica.

*“Dificuldades e obstáculos são fontes
valiosas de saúde e força para qualquer
sociedade”*

Albert Einstein, 1910

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a citotoxicidade, atividade tripanocida, antibacteriana, antibiofilme e imunomoduladora da CrataBL encapsulada em lipossomas. Os lipossomas contendo CrataBL (CrataBL-Lipo) foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de ciclos de congelamento e descongelamento e sonicação. Eles foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e taxa de encapsulação. A citotoxicidade de CrataBL e CrataBL-Lipo foi avaliada em linhagens celulares de fibroblastos L929 e macrófagos J774A.1 e os resultados foram expressos na concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular (CC_{50}). A atividade tripanocida de CrataBL e CrataBL-Lipo foi determinada utilizando tripomastigotas obtidos a partir de cultura celular infectada e os resultados foram expressos na concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular do parasito (IC_{50}). O mecanismo de indução da morte dos tripomastigotas após o tratamento com CrataBL-Lipo foi avaliado utilizando a técnica de citometria de fluxo. A atividade imunomoduladora de CrataBL-Lipo foi avaliada em macrófagos J774A.1 e as citocinas foram quantificadas utilizando o kit de mouse CBA Th1/Th2/Th17. A atividade antibacteriana de CrataBL e CrataBL-Lipo frente a *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foi determinada através do método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM). A atividade antibiofilme de CrataBL e CrataBL-Lipo foi avaliada utilizando o método de coloração por cristal violeta em concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4). Os lipossomas contendo CrataBL apresentaram tamanho de partícula de $101,9 \pm 1,3$ nm, índice de polidispersão de 0,245, potencial zeta de $+33,8 \pm 1,3$ mV, pH 7,41 e eficiência de encapsulação de $80 \pm 0,84\%$. A CrataBL apresentou citotoxicidade apenas para fibroblastos L929 ($CC_{50} = 56,8 \mu\text{g/ml}$), enquanto que CrataBL-Lipo não exibiu citotoxicidade nas linhas celulares de macrófagos J774A.1 e de fibroblastos L929 ($CC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). CrataBL não exibiu atividade tripanocida, porém CrataBL-Lipo apresentou IC_{50} de $1,1 \mu\text{g/ml}$ com índice de seletividade maior que 90,9. CrataBL-Lipo induziu a morte celular do parasito através da apoptose tardia e necrose. CrataBL-Lipo apresentou atividade imunomoduladora com redução da

síntese de IL-10 e TNF- α . CrataBL não exibiu atividade antibacteriana (CIM > 0,72 mg/ml), porém CrataBL-Lipo apresentou CIM variando de 0,56 a 0,72 mg/ml frente a MSSA, MRSA e VRSA. CrataBL apresentou atividade antibiofilme em concentrações subinibitórias inibindo de 38,8% a 55,4% a formação de biofilme e reduzindo de 2,5% a 19,8% o biofilme préformado de MSSA, MRSA e VRSA, enquanto que CrataBL-Lipo apresentou maiores porcentagens de inibição da formação do biofilme (45,4% a 75,6%) e redução do biofilme préformado (12,1% a 69,2%). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que CrataBL encapsulada em lipossomas é promissora para infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, MSSA, MRSA e VRSA, bem como apresenta potencial imunomodulador.

Palavras-chave: Lectina. *Trypanosoma cruzi*. imunomodulação. *Staphylococcus aureus*. biofilme.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and evaluate cytotoxicity, trypanocidal, antibacterial, antibiofilm and immunomodulatory activity of CrataBL encapsulated in liposomes. CrataBL-containing liposomes (CrataBL-Lipo) were prepared by the lipid film hydration method followed by freeze-thaw cycles and sonication, and characterized for particle size, polydispersity index, zeta potential, pH and encapsulation efficiency. Cytotoxicity of CrataBL and CrataBL-Lipo was evaluated against L929 fibroblast and J774A.1 macrophages and the results were expressed as the concentration able to inhibit 50% of cell viability (CC_{50}). Trypanocidal activity of CrataBL and CrataBL-Lipo was assessed using trypomastigotes obtained from infected cell culture and the results were expressed as the concentration able to inhibit 50% of cell viability 50% of the parasite cell viability (IC_{50}). The mechanism of induction of death of trypomastigotes after the treatment with CrataBL-Lipo was evaluated by flow cytometry technique. Immunodulation activity of CrataBL-Lipo was evaluated in J774A.1 macrophages and the cytokines were quantified using the CBA Th1/Th2/Th17 mouse kit. The antibacterial activity of CrataBL and CrataBL-Lipo against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) was determined by the broth microdilution method according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) to establish the minimum inhibitory concentration (MIC). The activity of CrataBL and CrataBL-Lipo for inhibition of biofilm formation and eradication of preformed biofilm was evaluated using the violet crystal staining method at subinhibitory concentrations ($MIC/2$ and $MIC/4$). CrataBL-Lipo showed particle size of 101.9 ± 1.3 nm, polydispersity index of 0.245, zeta potential of $+33.8 \pm 1.3$ mV, pH 7.41 and encapsulation efficiency of $80 \pm 0.84\%$. CrataBL showed cytotoxicity only against L929 fibroblast cell line ($CC_{50} = 56.8$ $\mu\text{g/ml}$), whereas CrataBL-Lipo did not exhibit cytotoxicity in the J774A.1 macrophages and L929 fibroblast cell lines ($CC_{50} > 100$ $\mu\text{g/ml}$). CrataBL did not exhibit trypanocidal activity, whereas CrataBL-Lipo showed IC_{50} of 1.1 $\mu\text{g/ml}$ with selectivity index higher than 90.9. CrataBL-Lipo induced cell death of the parasite through later apoptosis and necrosis. CrataBL-Lipo presented immunomodulatory activity with reduced synthesis of IL-10 and TNF- α . CrataBL did not exhibit antibacterial activity, whereas CrataBL-Lipo presented MIC from 0.56 to 0.72 mg/ml against MSSA, MRSA and

VRSA. CrataBL presented antibiofilm activity at subinhibitory concentrations inhibiting biofilm formation from 38.8% to 55.4% and reducing the preformed biofilm from 2.5% to 19.8% of MSSA, MRSA and VRSA, whereas CrataBL-Lipo presented higher percentage of inhibition of biofilm formation (45.4% to 75.6%) and reduction of preformed biofilm (12.1% to 69.2%). The results obtained in this study suggest that CrataBL encapsulated into liposome is promising for infections caused by *Trypanosoma cruzi*, MSSA, MRSA and VRSA, as well as it has a potential immunomodulatory activity.

Keywords: Lectin. *Trypanosoma cruzi*. immunomodulation. *Staphylococcus aureus*. biofilm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização de lipossomas contendo CrataBL.....	54
Tabela 2 –	Citotoxicidade e atividade tripanocida de CrataBL e CrataBL encapsulado em lipossomas.	56
Tabela 3 –	Análise por citometria de fluxo de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com CrataBL-Lipo e marcados com anexina V/7AAD.....	59
Tabela 4 –	Atividade antibacteriana de CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microscopia eletrônica de varredura de <i>T. cruzi</i> na forma tripomastigota (A) e amastigota (B).....	24
Figura 2 –	Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 3 –	Respostas imunológicas frente à infecção causada pelo <i>T. cruzi</i> ...	29
Figura 4 –	Microscopia eletrônica de varredura de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 5 –	Microscopia eletrônica de varredura de biofilme bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figura 6 –	Etapas do processo de formação do biofilme bacteriano.....	34
Figura 7 –	Classificação das lectinas quanto à estrutura.....	36
Figura 8 –	Estrutura tridimensional de um monômero da CrataBL.....	39
Figura 9 –	Representação esquemática do lipossoma.....	41
Figura 10 –	Farmacocinética de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada.....	41
Figura 11 –	Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho das vesículas e ao número de lamelas.....	42
Figura 12 –	Classificação dos lipossomas quanto à composição química.....	43
Figura 13 –	Análise por citometria de fluxo de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com CrataBL-Lipo e marcados com Anexina V/7AAD.....	58
Figura 14 –	Produção de TNF por macrófagos J774A.1 após tratamento com CrataBL encapsulada em lipossomas e benznidazol.....	60
Figura 15 –	Produção de IL-10 por macrófagos J774A.1 após tratamento com CrataBL encapsulada em lipossomas e benznidazol.....	61
Figura 16 –	Inibição da formação de biofilme pelo tratamento com CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.....	64
Figura 17 –	Inibição do biofilme pré-formado pelo tratamento com CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.....	66

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µg	- Micrograma
µl	- Microlitro
Mm	- Micrometro
7AAD	- 7-Aminoactinomicina D
APCs	- Células apresentadoras de antígenos
ATCC	- American Type Culture Collection
AV	- Annexina V
BNZ	- Benznidazol
CA-MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina associado à comunidade
CC ₅₀	- Concentração correspondente a 50% de inibição da viabilidade celular
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	- Concentração mínima inibitória
CrataBL	- Lectina de <i>Crateva tapia</i>
CrataBL-Lipo	- Lipossoma contendo CrataBL
DC	- Doença de Chagas
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EPS	- Exopolissacarídeos
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
HA-MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina associado aos hospitais
IC ₅₀	- Concentração correspondente a 50% de inibição do parasito

IFN- γ	- Interferon gama
IL-12	- Interleucina 12
IL-13	- Interleucina 13
IL-17A	- Interleucina 17 ^a
IL-2	- Interleucina 2
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-6	- Interleucina 6
Inos	- Enzima óxido nítrico sintetase
KDa	- Kilodalton
LUV	- Vesículas unilamelares grandes
Mg	- Miligrama
MHA	- Ágar Müeller Hinton
MHC	- Caldo Müeller Hinton
MHC I	- Complexo principal de histocompatibilidade
mL	- Mililitro
MLV	- Vesículas multilamelares grandes
mM	- Milimolar
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
MTT	- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
mV	- Milivolt

NaCl	- Cloreto de sódio
NK	- Células natural killer
Nm	- Nanômetro
NO	- Óxido nítrico
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAMPs	- Padrões moleculares associados aos patógenos
PBP	- Proteína ligadora de penicilina
PBP2a	- Proteína ligadora de penicilina adicional
PDI	- Índice de polidispersão
Pg	- Picograma
SCC <i>mec</i>	- Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
SI	- Índice de seletividade
SUS	- Sistema Único de Saúde
SUV	- Vesículas unilamelares pequenas
Th1	- T helper 1
Th17	- T helper 17
Th2	- T helper 2
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TSB	- Caldo triptona de soja
UFC	- Unidade formadora de colônia
VRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.2 Objetivo Geral.....	22
1.1.3 Objetivos Específicos.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 DOENÇAS INFECCIOSAS.....	23
3.1.1 Doença de Chagas.....	24
3.1.2 Sistema imunológico e as respostas imunes ao <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	26
3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	30
3.1.3.1 Biofilmes.....	33
3.2 LECTINAS.....	35
3.2.1 Classificação.....	35
3.2.2 Atividades biológicas.....	37
3.2.3 CrataBL.....	38
3.3 LIPOSSOMAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS.....	40
4 METODOLOGIA.....	46
4.1 PURIFICAÇÃO DO CRATABL.....	46
4.2 PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO CRATABL.....	46
4.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS.....	46
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE CRATABL EM LIPOSSOMAS.....	47
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	48
4.5.1 Cultura de fibroblastos e macrófagos.....	48
4.5.2 Citotoxicidade de fibroblastos.....	48

4.5.3 Citotoxicidade de macrófagos.....	48
4.6 ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE CRATABL E CRATABL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS.....	49
4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE DO PARASITO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
4.8 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO.....	50
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE CRATABL E CRATABL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS.....	51
4.10 ENSAIO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	51
4.11 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO PRÉ-FORMADO DE BIOFILME.....	52
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS.....	54
5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	55
5.3 ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE CRATABL E CRATABL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS.....	55
5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE DO PARASITO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	58
5.5 ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO.....	60
5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CRATABL E CRATABL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS.....	62
5.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	63
5.8 INIBIÇÃO DO BIOFILME PRÉ-FORMADO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

As infecções são consideradas uma das principais causas de morbimortalidade mundialmente. Os protozoários podem ser agentes etiológicos de graves infecções como a Doença de Chagas (DC), infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* que afeta cerca de 8 a 10 milhões da população da América com alto índice de mortes prematuras (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). O tratamento desta infecção possui limitações como toxicidade, baixa eficácia dos medicamentos e a longa duração do tratamento, representando também um problema de saúde pública alarmante (URBINA, 2015; MARÍN et al., 2017). Para eliminar essa infecção, o organismo humano dispõe de células e moléculas do sistema imunológico que estão envolvidas no combate dos microrganismos (SICA; MANTOVANI, 2012). Essas respostas imunológicas podem ser potencializadas pela utilização de moléculas que auxiliam o sistema imune na defesa frente às células tumorais, doenças autoimunes, e em especial, frente a infecções microbianas (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013; ARREOLA et al., 2015).

Além dos protozoários, as bactérias, em especial *Staphylococcus aureus* com perfil de resistência, podem causar infecções severas no ambiente hospitalar e na comunidade com impacto na morbidade, mortalidade, tempo de internação e aumento dos gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos (AUMEERUDDY; GURIB; MAHOMOODALLYA, 2016; ALISSON et al., 2017). O uso de antimicrobianos para eliminar esse agente patogênico está diretamente relacionado ao aumento da resistência. A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores obstáculos para o sucesso do tratamento das infecções bacterianas uma vez que ela limita a quantidade de agentes terapêuticos disponíveis para uso na clínica, sendo considerada um problema de saúde pública mundial progressivo (OTEO; ARACIL, 2015; PROCHNOW et al., 2015).

Associado ao problema da multirresistência, *S. aureus* pode apresentar fatores de virulência, como os biofilmes, que consolidam a infecção e dificultam a terapêutica (RABIN et al., 2015). O biofilme bacteriano é formado por um conjunto de células bacterianas envolvidas em uma matriz composta por proteínas, polissacarídeos e DNA. O tratamento dos biofilmes bacterianos é um desafio, pois,

comumente, são necessárias altas doses de antimicrobianos para eliminá-los (BJARNSHOLT et al., 2013; WU et al., 2015).

Com as limitações enfrentadas na terapêutica da DC, a necessidade de uma resposta imunológica mais eficaz e o problema da resistência bacteriana, novas moléculas com ação antimicrobiana e imunomoduladora estão sendo pesquisadas. Nesse sentido, os produtos naturais provenientes das plantas apresentam importância na terapêutica como possíveis fontes de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Moléculas naturais como as lectinas vêm ganhando destaque na pesquisa como agentes terapêuticos. Lectinas podem ser proteínas que podem reconhecer e ligar-se reversivelmente a carboidratos (KUMAR et al., 2012).

CrataBL é uma lectina extraída de *Crataeva tapia* (Cappariaceae), conhecida popularmente como Trapiá, uma árvore encontrada no Nordeste do país na Floresta Atlântica Tropical Pluvial (PRATISSOLI et al., 2007). CrataBL apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva (ARAÚJO et al., 2011), inseticida frente a *Nasutitermes corniger*, uma espécie de cupim (ARAÚJO et al., 2012), antitumoral para linhagens de células cancerígenas de próstata DU145 e PC3 (FERREIRA et al., 2013), larvicida frente a *Callosobruchus maculatus*, uma espécie de carrapicho de feijão (NUNES et al., 2015) e terapêutica para doença pulmonar obstrutiva crônica (OLIVA et al., 2015). Devido a essa diversidade de atividades biológicas, a CrataBL é uma molécula promissora na terapêutica. Entretanto, as lectinas podem apresentar alguns obstáculos para sua utilização na clínica, como a degradação rápida nos fluidos biológicos e a necessidade de uma frequência de doses para manter a sua concentração no nível terapêutico (CLELAND; DAUGHERTY; 2001, CUNHA et al., 2016). Esses obstáculos podem ser superados através da encapsulação de CrataBL em nanocarreadores, como os lipossomas.

Lipossomas são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. Esses nanocarreadores apresentam baixa toxicidade e alta biocompatibilidade com as membranas celulares (TORCHILIN, 2012; AKBARZADEH et al., 2013; HENRY et al., 2015). Assim, a encapsulação de CrataBL em lipossomas pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos, em especial, *T. cruzi* e *S. aureus*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver lipossomas contendo CrataBL e avaliar suas atividades biológicas e imunomoduladora.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver lipossomas contendo CrataBL;
- Realizar caracterização dos lipossomas desenvolvidos;
- Determinar a taxa de encapsulação da CrataBL em lipossomas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da CrataBL encapsulada em lipossomas;
- Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* da CrataBL encapsulada em lipossomas;
- Avaliar o mecanismo de indução de morte de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com CrataBL encapsulada em lipossomas;
- Avaliar *in vitro* a atividade imunomoduladora da CrataBL encapsulada em lipossomas em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana e antibiofilme da CrataBL encapsulada em lipossomas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DOENÇAS INFECCIOSAS

Na atualidade, as infecções são consideradas uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento (AUMEERUDDY-ELALFIA, GURIB-FAKIMB, FAWZI-MAHOMOODALLYA, 2016). O processo infeccioso ocorre quando há a invasão e colonização do microrganismo no hospedeiro, assim como a sua evasão do sistema imunológico (HEGGENDORNN et al., 2016).

As infecções são um problema de saúde pública mundial, em especial, as causadas por protozoários, como *Trypanosoma cruzi* ou infecções provocadas por bactérias resistentes, como algumas cepas de *Staphylococcus aureus*. As infecções causadas por *T. cruzi* acometem fortemente a população brasileira. Dentre os 20 países latino-americanos, o território brasileiro abriga 20,14% de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e estima-se que haja 4,6 milhões de pessoas infectadas no país. Os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe, São Paulo e Tocantins são considerados como regiões de risco para a transmissão vetorial. Entretanto, são as regiões Norte e Nordeste que exibem os maiores índices de prevalência para DC (BRASIL, 2009; MARTINS-MELO et al., 2014; DIAS et al., 2016). Em 2013, houveram 5.992 óbitos na América Latina, esses óbitos totalizam 40% do total de mortes esperadas para a DC. Neste mesmo período, as estimativas mostram que para as regiões Norte e Nordeste ocorreu um aumento de 38,5% de óbitos com tendência crescente (MARTINS-MELO et al., 2012; SILVA et al., 2017).

As estimativas para incidência e prevalência da DC são alarmantes e esse estado grave é similar ao observado para infecções por bactérias resistentes. O Brasil apresenta maior prevalência de infecções nosocomiais por bactérias resistentes quando comparado com a Europa e a América do Norte. Em torno 62% dos pacientes brasileiros internados nos hospitais adquirem infecções nosocomiais causadas por bactérias resistentes. O panorama da resistência bacteriana no Brasil é alarmante e o surgimento crescente de novas cepas de bactérias multirresistentes nos hospitais brasileiros está causando preocupação (ALMEIDA; FARIAS, 2014;

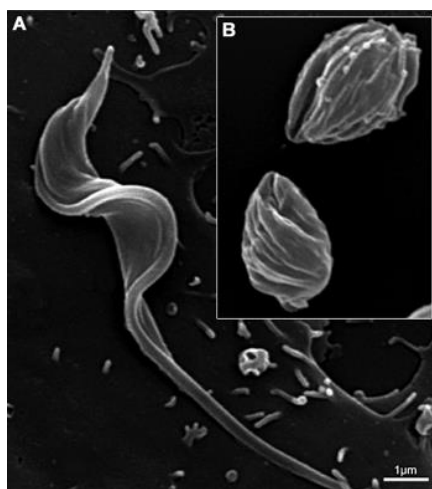
MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016). O cenário epidemiológico atual para essas doenças é um desafio no que diz respeito às ações de controle e estabelecimento de um plano consistente no Sistema Único de Saúde (SUS) para diagnóstico, tratamento e atenção integral aos cidadãos (DIAS; COURA; YASUDA, 2014; SOARES et al., 2017).

3.1.1 Doença de Chagas

DC é causada pelo protozoário *T. cruzi* através das fezes do triatomíneo hematófago infectado com esse protozoário. Os triatomíneos, vetores do protozoário flagelado, são amplamente encontrados na América do Sul, América Central, no México e Sul dos Estados Unidos. A DC também pode ser transmitida através de transfusões de sangue, transplantes de órgãos, de mãe para filho durante o parto e através de comida e bebida contaminada (NUNES et al., 2013; CHATELAIN, 2015).

T. cruzi pertence à classe Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. Este protozoário flagelado apresenta diferentes morfologias durante seu ciclo de vida (Figura 1). Ele possui organização e estrutura comum às células eucarióticas com compartimentos celulares particulares como o cinetoplasto, que contém o DNA mitocondrial, e reservosomos que junto ao flagelo garantem a sobrevivência desses organismos em diferentes hospedeiros (CALDERANO et al., 2017).

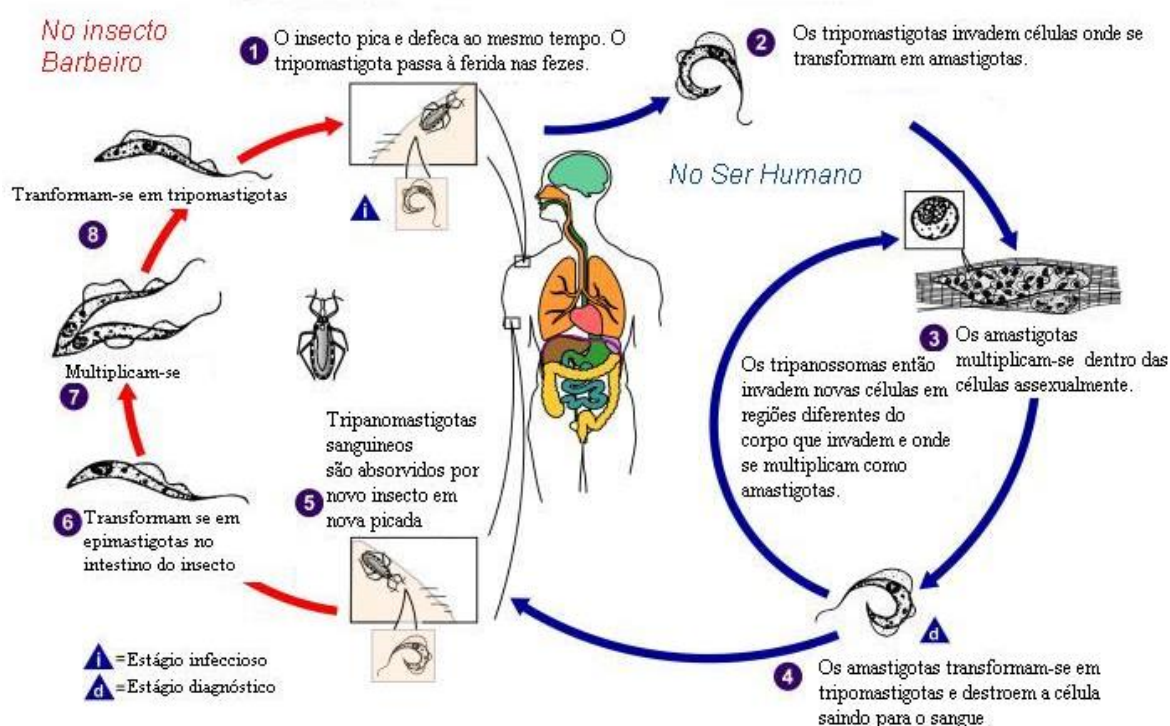
Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de *T. cruzi* na forma tripomastigota (A) e amastigota (B).



Fonte: COSTA (2015).

No ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 2), os insetos hematófagos vetores do gênero *Triatoma* contaminam-se ao ingerir sangue com o *T. cruzi* circulante na forma tripomastigota. No intestino desses insetos, as formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, proliferando-se, e posteriormente, assumindo a forma tripomastigota metacíclico. Quando os insetos hematófagos alimentam-se os tripomastigotas metacíclicos são eliminados com as fezes. Em contato com o hospedeiro o parasito penetra as células do mamífero e no interior das células humanas ocorre a diferenciação do parasito para a forma amastigota. Estas formas proliferam-se, e diferenciam-se em tripomastigotas, rompem as células e são liberadas na circulação sanguínea, infectando os tecidos, principalmente músculos e gânglios (CARREA; DIAMBRA, 2016; CALDERANO et al., 2017).

Figura 2 – Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2017).

Esta infecção apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por sintomas não específicos como febre, adenopatia generalizada e edema. Em sua fase crônica, a DC apresenta-se de forma assintomática nos anos

iniciais e após algumas décadas ocorre hepatomegalia, esplenomegalia, lesões no coração e no sistema digestivo que podem ser irreversíveis, comprometendo a função cardíaca, esofágica e colônica (VERMELHO et al., 2016; SILVA-JUNIOR et al., 2017).

A DC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países tropicais, principalmente em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), DC é considerada uma doença negligenciada e um problema alarmante de saúde (BONNEY, 2014). Em torno de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo, especialmente na América Latina, onde essa infecção é endêmica. Além da América Latina, a DC está apresentando taxas crescentes nos Estados Unidos, Canadá e Europa (BERN, 2015; BERMUDEZ et al., 2016). Os aspectos mais relevantes da DC são a sua capacidade de causar morte prematura e o dispêndio econômico com o tratamento (VIOTTI et al., 2014).

Os fármacos utilizados no tratamento da DC são benzonidazol e nifurtimox, porém eles apresentam efeitos adversos graves e podem levar à interrupção do tratamento, além de ser ineficaz na fase crônica da doença (VILLATA et al., 2013; DA SILVA et al., 2017). O benzonidazol provoca distúrbios digestivos, erupções cutâneas, dores articulares e musculares, neuropatia periférica e distúrbios hematopoiéticos, enquanto que o nifurtimox causa náuseas, vômitos, dor abdominal, polineurite e psicose (PINAZO et al., 2013; MOLINA et al., 2015).

Com a expansão da DC para outras regiões, pela alta prevalência desta patologia e com o abandono da terapia pelos pacientes devido aos efeitos adversos induzidos pelos fármacos, a comunidade científica está buscando novas moléculas com potencial tripanocida para tratar pacientes chagásicos e minimizarem este problema de saúde pública mundial (URBINA, 2015; DA SILVA et al., 2017).

3.1.2 Sistema imunológico e as respostas imunes frente ao *Trypanosoma cruzi*

O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de moléculas e células que reconhecem estruturas moleculares e substâncias estranhas ao organismo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). As respostas do sistema imunológico têm papel fundamental na defesa frente a agentes

infecciosos, impedindo a ocorrência de infecções disseminadas que estão associadas com alto índice de mortalidade (WYNN et al., 2014).

Com a entrada dos microrganismos no corpo, como por exemplo, o *T. cruzi*, as respostas imunológicas são ativadas, ocorrendo, inicialmente, uma resposta inata por meio do desencadeamento do processo inflamatório com recrutamento de neutrófilos, monócitos, proteínas do sistema complemento, colectinas e pentraxinas a partir da liberação de quimiocinas, como CXC IL-8 e CC eotaxina. As células apresentadoras de antígenos (APC's) identificam a presença do agente infeccioso através do reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Em seguida, os macrófagos secretam IL-12 ativando as células Natural Killer (NK) que atuarão na eliminação das células infectadas pelo protozoário. Além de eliminar as células infectadas, as células NK sintetizam e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, IFN- γ e TNF- α intensificando a resposta inflamatória (Figura 3) (BASSO, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A síntese e liberação de INF- γ também promove o estímulo para produção do óxido nítrico (NO). O NO é produzido nos macrófagos pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) a partir do aminoácido L-arginina. O NO sintetizado difunde-se por toda a extensão celular e penetra no *T. cruzi* fagocitado, eliminando-o (STUEHR; MARLETTA, 1987; BOGDAN, 2015). Os microrganismos podem sobrepor esses mecanismos iniciais de defesa e adentrar a corrente sanguínea desencadeando uma cascata de reação que ativa as proteínas do sistema complemento, responsáveis pela opsonização dos microrganismos para a fagocitose e lise direta dos microrganismos patogênicos (TRAVIS, 2009; LITMAN; RUDENSKY, 2010).

O combate aos microrganismos pelo sistema imune adaptativo acontece através de uma resposta imunológica celular através das células Th1 CD4+ e células TCD8+ que reconhecem antígenos específicos do parasito (BASSO, 2013). A citocina IL-12 estimula a diferenciação dos linfócitos T CD4+ auxiliares no subgrupo de células efectoras Th1. Estas células reconhecem os antígenos dos microrganismos patogênicos endocitados pelas células dendríticas e macrófagos, estimulando a destruição do microrganismo patogênico. A ativação de macrófagos

por células Th1 é mediada pela liberação de INF- γ (Figura 3) (LITTMAN et al., 2010a; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O sistema imune adaptativo também promove uma resposta através das células Th2 que estão envolvidas na resposta mediada por anticorpos. As células efectoras T CD4⁺ Th2 reconhecem antígenos produzidos pelo parasito e produzem IL-4, IL-5 e IL-13, estimulando a síntese de imunoglobulinas pelas células B (Figura 3) (ANNUNZIATO; ROMAGNANI, 2009; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Esses anticorpos bloqueiam a capacidade do *T. cruzi* infectar as células e marcam os microrganismos para fagocitose pelos macrófagos ou para morte celular mediada por células T citotóxicas, que destroem as células infectadas pelo microrganismo inacessíveis aos anticorpos e à destruição fagocítica (LITMAN; RUDENSKY, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Devido às funções desenvolvidas pelo sistema imune no combate à instalação e proliferação de microrganismos como o *T. cruzi*, a deficiência imunológica está fortemente associada com aumento de susceptibilidade às infecções (LITMAN; RAST; FUGMANN, 2010; BROWN; CLARKE, 2016).

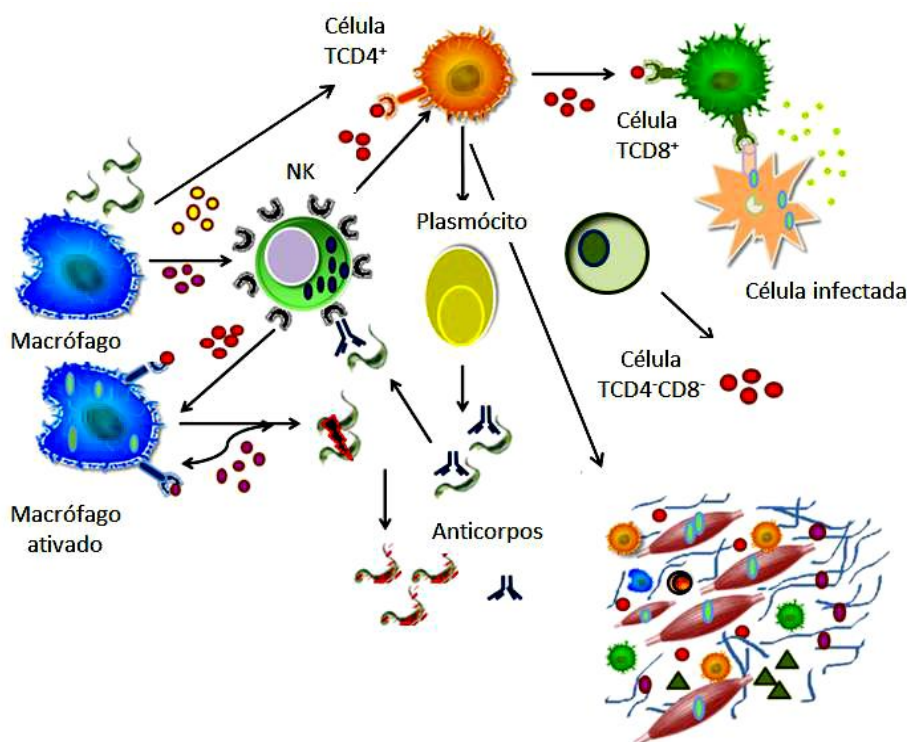
As respostas imunológicas ao *T. cruzi* apresentam alta complexidade e envolvem mecanismos efetores e reguladores. A resposta imune desenvolvida pelas células Th1 é responsável pelos mecanismos efetores através da produção de citocinas pró-inflamatórias e respostas mediadas pela imunidade celular, enquanto que as células Th2 desencadeiam uma resposta imune com perfil regulador através da síntese de citocinas anti-inflamatórias e envolvimento com resposta mediada pela imunidade humoral (DUTRA et al., 2014; RASSI JR; MARIN-NETO; RASSI, 2017).

Estudos vêm mostrando que a resposta imunológica inicial desencadeada pela entrada do parasito é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, IFN- γ , TNF- α . Essas citocinas promovem o processo inflamatório, ativação de macrófagos e resposta Th1 para eliminação do *T. cruzi*. Em contrapartida, ocorre a síntese de citocinas anti-inflamatórias e regulatórias, como IL-4 e IL-10 que regulam a resposta celular e reduzem o processo inflamatório diminuindo os danos teciduais causados pela tentativa de eliminação do parasito (BASSO, 2013; DUTRA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015).

Pesquisas demonstraram os perfis de citocinas na fase aguda e na fase crônica da DC. Na fase aguda, as citocinas Th1 pró-inflamatórias, como TNF e INF- γ

são encontradas em níveis elevados. Esse perfil decorre devido à intensa resposta inflamatória e grande síntese de anticorpos para controle da parasitemia e do parasitismo tecidual (PÉREZ – MOLINA; MOLINA, 2017; RASSI JR; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Além disso, estas citocinas estão associadas ao dano cardíaco na fase crônica da DC, uma vez que é encontrada uma correlação positiva entre o grau de dano cardíaco e os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ (LORENA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2015). Na fase crônica, as citocinas Th2 regulatórias, em especial a IL-10, são encontradas em níveis elevados, estando associadas a um perfil regulatório e anti-inflamatório. A elevação da IL-10 no sangue reduz as respostas efetoras que visam eliminar o parasito e, conseqüentemente, diminui o dano tecidual (DUTRA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015).

Figura 3 – Respostas imunológicas frente à infecção causada pelo *T. cruzi*.



Fonte: ANDRADE (2013).

Essas respostas imunológicas podem ser moduladas através da potencialização de componentes do sistema imune por meio da ativação e inibição de células e mediadores, principalmente, pelo estímulo ou supressão da produção de citocinas que desempenham papel fundamental na imunidade inata e adquirida (KASPER; REDER, 2014). Dentre as moléculas imunomoduladoras, destacam-se os

produtos de origem vegetal, microbiana, os fármacos de origem natural e sintética, além das proteínas, como as lectinas. Sendo assim, vários estudos têm sido realizados objetivando a busca de moléculas que possam modular o sistema imunológico na sua resposta frente às células tumorais, doenças autoimunes, e em especial, frente a infecções microbianas (KASPER; REDER, 2014; ARREOLA et al., 2015).

3.1.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias são organismos pertencentes ao Filo Monera e podem ser capazes de invadir, replicar-se, colonizar e causar danos aos tecidos humanos. Estes procariotos unicelulares apresentam um nucleóide formado por uma fita simples de DNA circular e parede celular rígida composta, em maior parte, por peptidoglicano. Elas podem apresentar fímbrias, e cápsula, fatores que aumentam a virulência e a capacidade infectante da bactéria (MADIGAN et al., 2016). Dentre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares destacam-se as pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, em especial *S. aureus*.

Staphylococcus aureus é um coco gram-positivo, microaerófilo, com aproximadamente 1 a 2 µm de diâmetro que forma arranjos semelhantes a "cachos de uva" e é produtor de catalase, coagulase, DNase e hemolisinas, podendo ser classificada como uma bactéria intracelular facultativa (Figura 4) (BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; STEFANI; TENOVER, 2013). Apesar desta bactéria integrar a microbiota normal de alguns indivíduos, ela pode causar infecções leves, moderadas a graves como furúnculos, pneumonia, meningite, endocardite e septicemia em pessoas saudáveis ou imunocomprometidas (TONG et al., 2015). *S. aureus* é frequentemente associado a infecções nosocomiais principalmente as de ordem cutânea, respiratória e da corrente sanguínea, sendo um fator de risco para pacientes em unidades de terapia intensiva hospitalar (UTIs) (ACEVEDO, 2015; FASIHI et al., 2017).

Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: BIOQUEEL (2017).

Com a descoberta da penicilina, um antibiótico da classe dos beta-lactâmicos, houve intensiva utilização deste medicamento para combater *S. aureus*, e, consequentemente, eliminar o processo infeccioso. Com o extenso uso da penicilina, em poucos anos, foi observado que algumas cepas de *S. aureus* apresentavam enzimas denominadas de penicilinasas que inativam a penicilina, impedindo sua ação antibacteriana. Essas cepas foram denominadas de *S. aureus* resistentes a penicilina. Com as cepas resistentes a penicilina, a meticilina, medicamento semissintético pertencente ao grupo dos beta-lactâmicos, começou a ser utilizada como antimicrobiano para combater infecções por *S. aureus*. Entretanto, com o uso intensivo deste antimicrobiano as cepas foram adquirindo resistência, sendo denominadas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (DŽIDIC; ŠUŠKOVIC; KOS, 2008; MONTAZERI et al., 2015).

A resistência de MRSA é caracterizada pela produção da proteína ligadora de penicilina (PBP) adicional, denominada de PBP2a, que tem baixa afinidade de ligação aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos. Essa proteína é sintetizada a partir da expressão do gene *mecA* que é carregado por um elemento genético móvel chamado de Cassete Cromossômico Estafilocócico (SCC*mec*) (GELATTI, 2009; CERVANTES-GARCÍA; GARCÍA-GONZÁLEZ; SALAZAR-SCHETTINO, 2014). Além da produção de PBP2a, MRSA vem desenvolvendo

outras estratégias de resistência aos agentes antimicrobianos, como, a produção das bombas de efluxo (JOHARI et al., 2012).

O aumento da incidência de MRSA representa um grave problema uma vez que infecções causadas por essas cepas apresentam taxas elevadas de morbidade e mortalidade, internação prolongada e tratamento com eficácia limitada (STRYJEWSKI; COREY, 2014; OYEDEMI et al., 2017). MRSA está amplamente associado às infecções no ambiente hospitalar (HA-MRSA), mas já foram descritas cepas associadas à comunidade (CA-MRSA). Infecções provenientes de cepas CA-MRSA estão cada vez mais frequentes em todo o mundo causando grande preocupação para os profissionais de saúde (PURRELLO et al., 2014; BEKTAS et al., 2016).

Para o tratamento das infecções por MRSA, os antimicrobianos de escolha são linezolida, daptomicina, tigeciclina, vancomicina (HOWDEN, 2010; MORAN et al., 2013). Nos últimos anos, com o aumento da incidência de infecções causadas por MRSA, a vancomicina está sendo utilizada com muita frequência, de tal maneira que, estão surgindo de forma exponencial cepas de *Staphylococcus aureus* resistência à vancomicina (VRSA) (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). Em 2002, foi isolada a primeira cepa de VRSA nos Estados Unidos da América. Nos anos seguintes também foram reportadas cepas de VRSA na Índia, Irã, Coreia do Sul, China, Reino Unido e no Brasil. O operon que confere resistência à vancomicina é o *vanA*, adquirido pelas cepas de *S. aureus* a partir de *Enterococcus faecalis* por transferência horizontal. Este operon é composto por genes *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* e *vanZ*. Estes genes permitem a incorporação de D-Ala-D-Lac modificada no peptídeoglicano produzindo uma parede celular não suscetível à vancomicina (FRIÃES et al., 2014). A crescente prevalência de VRSA representa um problema, pois cepas resistentes dessa bactéria estão associadas a infecções persistentes e com falha na antibioticoterapia (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

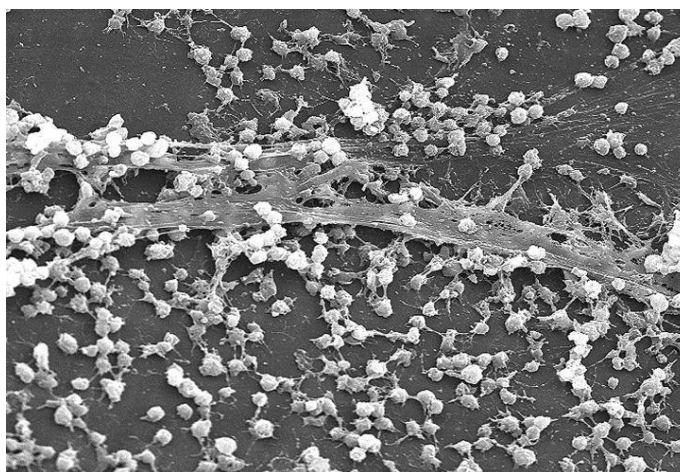
Na última década, as infecções causadas por cepas de *S. aureus* com perfil de resistência estão aumentando no ambiente hospitalar. Além disso, MRSA e VRSA estão sendo causa de infecções comunitárias e estes processos infecciosos estão progredindo de forma crescente em todo o mundo (BEKTAS et al., 2016;

CHEN et al., 2017). Assim, o problema das infecções causadas por cepas bacterianas de *S. aureus* estimula as pesquisas em busca de novas moléculas ou novas estratégias terapêuticas com potencial antimicrobiano (MULAUDZI et al., 2011; BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2013).

3.1.3.1 Biofilmes

Biofilmes bacterianos são um aglomerado sésil composto por uma mesma espécie ou por espécies diferentes de bactérias imersas numa matriz polimérica extracelular que pode ser composta por exopolissacarídeos (EPS), proteínas, lipídeos e DNA aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (Figura 5) (CORTES; CONSUEGRA; SINISTERRA, 2011; NÚÑEZ et al., 2013). As bactérias formadoras de biofilme possuem proteínas de ancoragem que permitem o movimento através do líquido e a fixação a uma superfície apropriada. A capacidade dos microrganismos produzirem biofilme é alarmante, pois estima-se que entre 65 e 80% de todas as infecções estão associadas à formação do biofilme (ACKER, DIJCK, COENYE, 2014; ORDÓÑEZ et al., 2016; GORDYA et al., 2017).

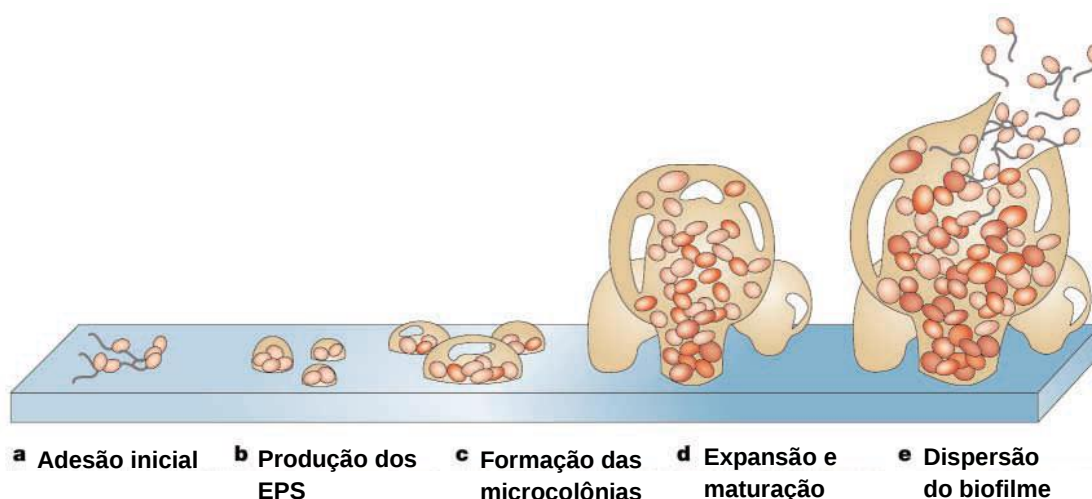
Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura de biofilme bacteriano de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: DOSLER; MATARACI (2013).

A formação do biofilme bacteriano é um processo extremamente regulado que acontece em consequência de mudanças ambientais e envolve mecanismos complexos guiados por processos químicos, físicos e biológicos. O processo de formação do biofilme apresenta uma série de fases sequenciais: a) adesão inicial das células bacterianas a superfície; b) produção de exopolissacarídeos; c) desenvolvimento da estrutura do biofilme com formação das microcolônias bacterianas; d) expansão e maturação do biofilme e e) dispersão das células bacterianas e colonização de novas superfícies (Figura 6) (NÚÑEZ et al., 2013; ORDÓÑEZ et al., 2016).

Figura 6 – Etapas do processo de formação do biofilme bacteriano.



Fonte: CHATTERJEE; OTTO (2013).

O biofilme proporciona uma colonização com maior estabilidade estrutural e longevidade destes microrganismos, assim como promove uma barreira protetora entre as bactérias e o ambiente. Desta forma, o biofilme atua como um importante fator de virulência e sobrevivência desses agentes patogênicos, contribuindo de forma significativa para a falha da terapia antimicrobiana (ABE et al., 2014; GABRILSKA; RUMBAUGH, 2015). As bactérias nos biofilmes podem ser até 1000 vezes resistentes aos antimicrobianos. Essa resistência dificulta o tratamento e a erradicação do biofilme (HOBLEY et al., 2015).

A resistência dos biofilmes aos fármacos é atribuída principalmente à dificuldade de penetração dos antimicrobianos nos biofilmes, exigindo muitas vezes

altas doses de medicamento para um tratamento eficaz. Contudo, o uso de altas doses de destes fármacos pode levar a efeitos adversos prejudiciais para a saúde do paciente (HOBLEY et al., 2015; ORDÓÑEZ et al., 2016). Com o problema da falha terapêutica, as infecções microbianas causadas por biofilmes bacterianos estão sendo consolidadas como uma das principais causas de morte em todo o mundo (WU et al., 2015; LEE, RAMASAMY, 2016). Este problema causa impacto negativo nos setores médico, causando hospitalização, sofrimento do paciente e redução da qualidade de vida (CIOFU et al., 2015).

Cepas de *Staphylococcus aureus*, incluídos as que apresentam perfil de resistência, produzem biofilmes associados a infecções com elevada morbimortalidade. Nesse cenário, a busca por novos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes e formadoras de biofilme se torna necessária (DOSLER, MATARACI, 2013).

3.2 LECTINAS

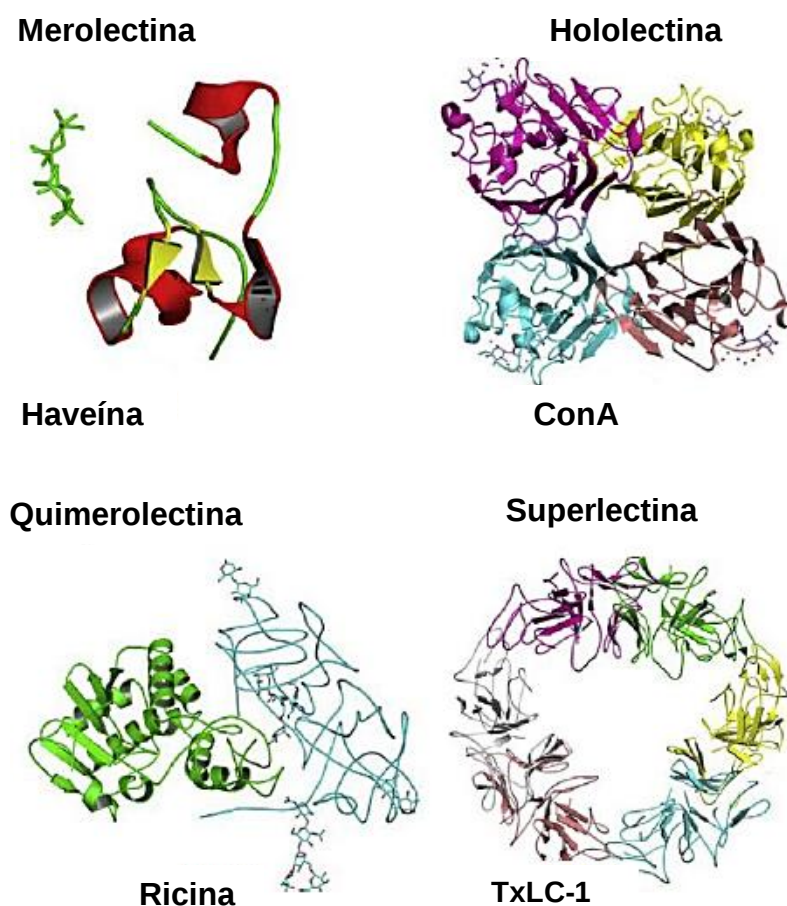
3.2.1 Classificação

Lectinas são proteínas que apresentam a capacidade de se ligar aos carboidratos de forma específica e reversível, sem promover alterações na estrutura covalente do ligante. Essas proteínas possuem um ou mais domínios não-catalíticos reconhecedores de carboidratos (DIAS et al., 2015). O domínio de reconhecimento de carboidratos interage através de ligações fracas, do tipo Van der Waals e ligações de hidrogênio, com os carboidratos simples como os monossacarídeos e dissacarídeos, e complexos como os polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, de modo a identificar as variações entre as cadeias dos açúcares e promover o reconhecimento entre elas para formar as ligações (PROCÓPIO et al., 2017).

As lectinas podem ser classificadas quanto à origem, a estrutura e a especificidade de ligação a um determinado carboidrato. Quanto à origem, as lectinas podem ser vegetais, animais, fúngicas e bacterianas (KUMAR et al., 2012). Quanto à estrutura é possível classificá-las em a) merolectinas, lectinas que apresentam um único domínio de ligação aos carboidratos e a incapacidade de aglutinação celular ou de precipitação de glicoconjugados, b) hololectinas, estas exibem dois domínios idênticos ou mais de dois domínios homólogos para ligação

com os carboidratos, sendo capazes de aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados, c) quimerolectinas, lectinas formadas pela fusão proteica de duas cadeias diferentes, onde uma cadeia expõe atividade catalítica ou alguma atividade biológica diferente da habilidade de ligação aos carboidratos, e d) superlectinas, essas proteínas possuem no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos não idênticos, exibindo a capacidade de identificar carboidratos diferentes (Figura 7) (IORDACHE et al., 2015). As lectinas também podem ser classificadas com base no tipo de monossacarídeo ligante, podendo ser lectinas ligadoras de manose, lectinas ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, lectinas ligadoras de N-acetilglucosamina, lectinas ligadoras de fucose e lectinas ligadoras de ácido N-acetilneuramínico (KUMAR et al., 2012).

Figura 7 – Classificação das lectinas quanto à estrutura.



Fonte: SILVA (2012).

As lectinas são amplamente encontradas na membrana e/ou no interior de células, podendo ser facilmente extraídas dos microrganismos, plantas e animais. Estas moléculas participam de muitos processos biológicos como reconhecimento célula-célula, interações da matriz extracelular, fertilização gamética, crescimento celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação, interação parasito-hospedeiro, indução mitogênica e homeostase (YAMANAKA et al., 2009; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

3.2.2 Atividades biológicas

As lectinas estão descritas na literatura como ferramentas de interesse terapêutico nas diversas pesquisas, pois podem apresentar diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitário, anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora e como biomarcador (SINGH; SARATHI, 2012; HASHIM et al., 2017). Elas podem inibir o crescimento de microrganismos e/ou serem agentes bactericidas e podem ser capazes de reconhecer seletivamente microrganismos que causam doenças, por isso, estão sendo estudadas como agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2013). As lectinas podem interagir com carboidratos, lipopolissacarídeos e peptideoglicano presente na parede celular bacteriana, aglutinando e inibindo o crescimento celular através da alteração da permeabilidade celular, redução da absorção de nutriente, formação de poros e extravasamento do conteúdo extracelular, e/ou através da interação com receptores de membrana que promovem respostas intracelulares (MUKHERJEE et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2017). Nesse sentido, a comunidade científica vem intensificando as pesquisas que visam analisar a atividade antibacteriana de lectinas (QU et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2017; SULCA et al., 2017).

Além de exibirem propriedade antibacteriana, elas podem apresentar atividade antibiofilme (BOSE et al., 2016). Os biofilmes são fatores de virulência importantes para o sucesso da infecção bacteriana e o reconhecimento dos carboidratos presentes na superfície celular das bactérias impede a adesão às células do hospedeiro e as superfícies, inviabilizando a formação do biofilme bacteriano (MUKHERJEE et al., 2014). Pesquisas recentes estão enfatizando a

capacidade dessas moléculas de impedir a formação dos biofilmes e de erradicar os biofilmes préformados (BOSE et al., 2016; PROCOPIO et al., 2017).

As lectinas também são estudadas pelo seu potencial antiparasitário. Esta propriedade deve-se ao fato dessas moléculas interagirem com os carboidratos de alguns parasitos provocando interferência nos processos químicos e biológicos que podem levar à morte desses microrganismos. Dentre os diversos parasitos como *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania braziliensis*, as lectinas demonstraram a capacidade de inibir e/ou eliminar o *T. cruzi* (ACOSTA-SERRANO; COLE; ENGLUND, 2000; FERNANDES et al., 2010).

Diversas lectinas também exibem atividade imunomoduladora uma vez que essas proteínas podem interagir com moléculas presentes em células do sistema imunológico promovendo a transdução de sinais para a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e outras moléculas envolvidas na defesa do hospedeiro (SOUZA et al., 2013; SINGH et al., 2017). Alguns estudos estão evidenciando a capacidade das lectinas de modular o sistema imunológico através da indução da produção de citocinas pertencentes aos perfis de respostas imunológicas inflamatórias como Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-6) e Th17 (IL-17A), e também, a habilidade para estimular a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória com papel regulador e estimular a diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ (BRITO et al., 2017; PATRIOTA et al., 2017). Assim, as lectinas são importantes moduladores da resposta imunológica, pois reconhecem os carboidratos presentes nas superfícies celulares de agentes patogênicos e promovem a ativação da defesa imunológica inata e adaptativa (VÁZQUEZ et al., 2014).

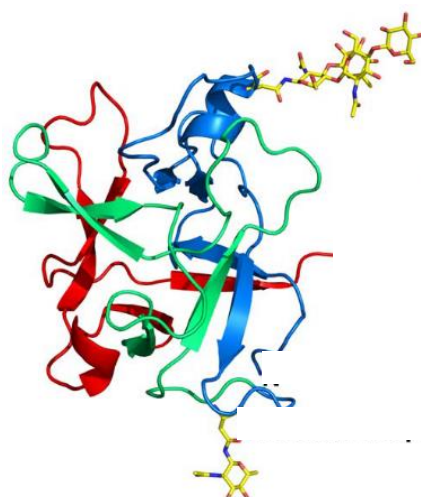
3.2.3 CrataBL

CrataBL é uma lectina extraída de *Crataeva tapia* (Capparidaceae), conhecida popularmente como Trapiá, uma árvore amplamente distribuída no Brasil, encontrada no Nordeste do país, em especial na Floresta Atlântica Tropical Pluvial (PRATISSOLI et al., 2007). Esta árvore é utilizada amplamente devido à resistência de sua madeira à putrefação, por isso ela tem sido utilizada na construção civil brasileira e construção de canoa de madeira. A casca desta planta também é

utilizada como alimento, combustível, forragem e remédios na região semiárida do Nordeste do Brasil (ARAÚJO et al., 2012).

Essa lectina pode apresentar duas isoformas distintas, possuindo diferenças nas posições dos aminoácidos 31 (Prolina/Leucina), 92 (Serina/Leucina), 93 (Isoleucina/Treonina), 95 (Arginina/Glicina) e 97 (Leucina/Serina) (Figura 8). CrataBL liga-se a carboidratos específicos como a glicose, a galactose e os glicosaminoglicanos (FERREIRA et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Esta lectina apresenta ponto isoelétrico de 10,5, peso molecular de 21 kDa, podendo formar dímeros com um peso molecular de 40 kDa, superfície eletrostática com campos positivos e fluorescência intrínseca devido à presença e organização dos aminoácidos triptofano e tirosina (ARAÚJO et al., 2012; DA ROCHA et al., 2013; LIRA et al., 2018).

Figura 8 – Estrutura tridimensional de um monômero da CrataBL.



Fonte: FERREIRA et al. (2013).

As atividades biológicas da CrataBL foram descritas, dentre elas a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (ARAÚJO et al., 2011). Esta lectina também apresentou potencial como agente inseticida frente a *Nasutitermes corniger* (ARAÚJO et al., 2012) e atividade antidiabética com redução das complicações renais e hepáticas promovidas por esta patologia (DA ROCHA et al., 2013). Em outros estudos, a CrataBL inibiu a proliferação das linhagens de células tumorais de próstata (DU145 e PC3), o mecanismo de morte foi apoptose com a liberação do

citocromo c mitocondrial que liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9 que ativa a caspase-3 que clivam outros substratos proteicos resultando no processo apoptótico (FERREIRA et al., 2013). CrataBL também mostrou eficácia no bloqueio da coagulação e da formação de trombo arterial (SALU et al., 2014).

Estudos mais recentes com esta proteína mostraram sua atividade larvívora frente a *Callosobruchus maculatus* (NUNES et al., 2015) e sua atividade na terapêutica para doença pulmonar obstrutiva crônica através da redução das mudanças na mecânica pulmonar, da inflamação e na remodelação extracelular do pulmão (OLIVA et al., 2015). Devido a essa diversidade de atividade biológica, a CrataBL é uma molécula promissora na terapêutica. Contudo, as lectinas apresentam características que dificultam sua administração como a ação em alvos não específicos, a fácil degradação pelos fluidos biológicos e a necessidade de uma frequência em suas doses para manter a concentração do composto no nível terapêutico (CLELAND; DAUGHERTY; MRSNY, 2001, CUNHA et al., 2016). Essas dificuldades podem ser ultrapassadas utilizando a nanotecnologia farmacêutica através da encapsulação de lectinas em nanocarreadores.

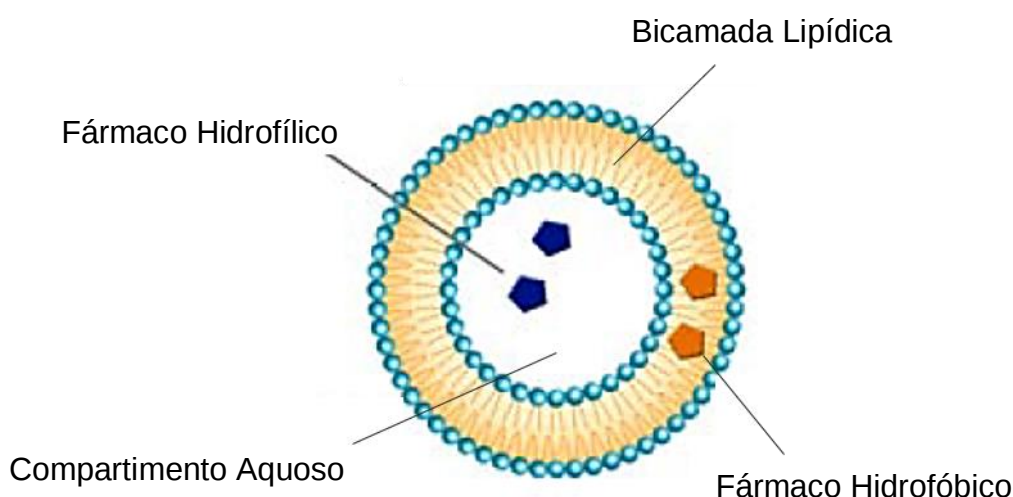
3.3 LIPOSSOMAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS

A nanotecnologia farmacêutica é uma área da ciência voltada para o design, construção e utilização de estruturas funcionais em escala nanométrica e micrométrica com foco no desenvolvimento, caracterização e aplicação desses sistemas tecnológicos (BOISSEAU; LOUBATON, 2011). Existe uma variedade de nanocarreadores para diferentes tipos de aplicações, citar dentre elas as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), nanopartículas lipídicas, micelas, lipossomas, dendrímeros, microemulsões e micropartículas. Dentre estes citados, os lipossomas destacam-se pela ampla possibilidade de aplicações e pelas vantagens apresentadas.

Lipossomas são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo e apresentam a capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas (Figura 9) (AKBARZADEH et al., 2013). Os lipossomas apresentam diversas vantagens, dentre elas pode-se destacar a liberação controlada de fármacos,

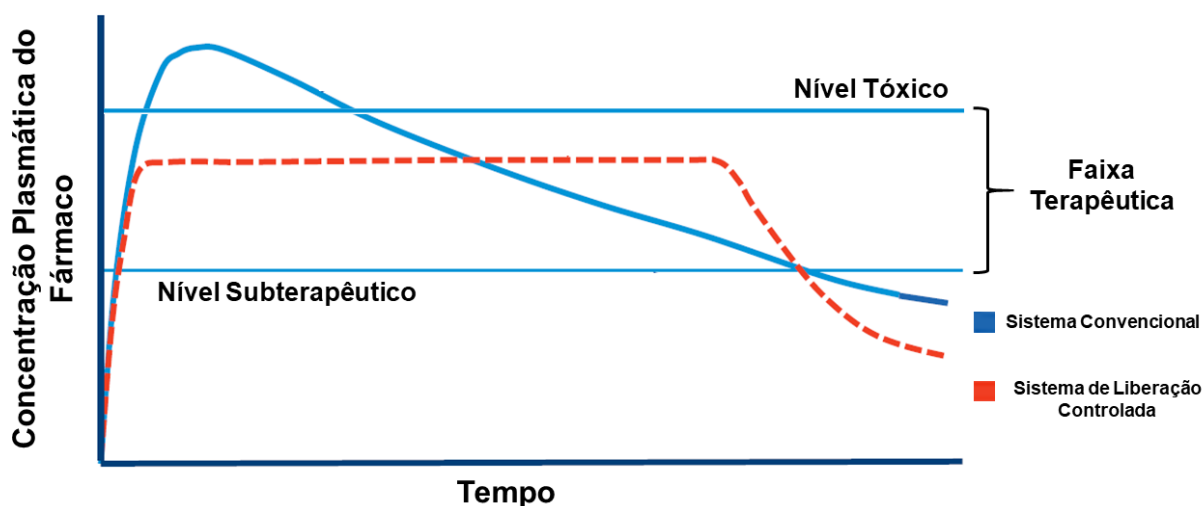
mantendo as concentrações plasmáticas do fármaco de forma constante dentro da faixa terapêutica (Figura 10), a vetorização dos fármacos, o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, a proteção dos princípios ativos da degradação, aumento da penetração celular de fármacos, alta biocompatibilidade com as membranas celulares, redução do número de administrações do fármaco, redução dos efeitos tóxicos do fármaco e consequentemente, melhor adesão do paciente à terapêutica (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SRIRAMAN; TORCHILIN, 2014; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; JANGDE; SINGH, 2016).

Figura 9 – Representação esquemática do lipossoma.



Fonte: SANCHEZ-PURRA et al. (2016).

Figura 10 – Farmacocinética de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada.

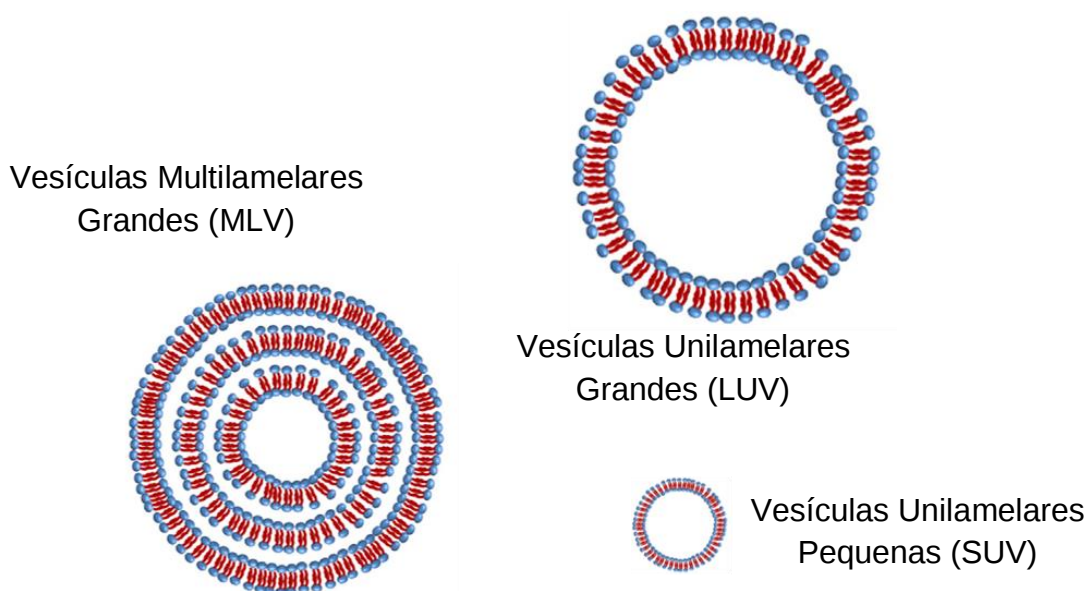


Fonte: Campos (2018) adaptado de LIRA (2007) e PARK (2014).

Os lipossomas podem ser classificados quanto ao tamanho das vesículas e ao número de lamelas em Vesículas Multilamelares Grandes (MLV), Vesículas Unilamelares Grandes (LUV) e Vesículas Unilamelares Pequenas (SUV) (Figura 11) (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Quanto à composição química eles podem ser convencionais, furtivos e sítio específicos (AKBARZADEH et al., 2013) (Figura 12).

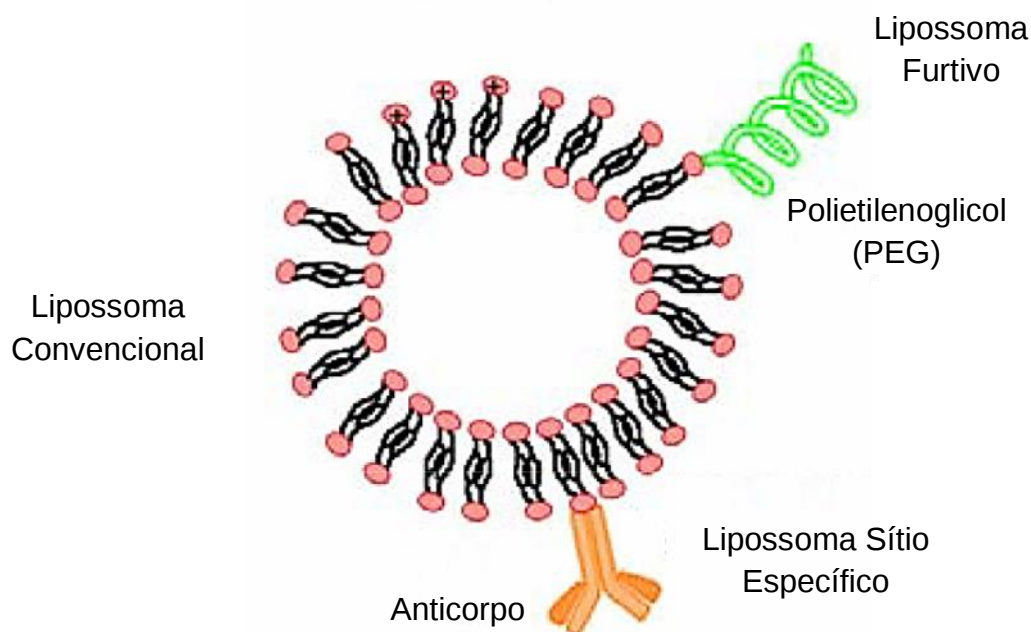
Figura 11 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho das vesículas e ao número de lamelas.



Fonte: PATIL; JADHAV (2014).

Os lipossomas convencionais apresentam em sua composição os fosfolípídeos, o colesterol e um lipídeo com carga negativa ou positiva com objetivo de evitar a agregação das vesículas lipossomais, garantindo a estabilidade da dispersão (AKBARZADEH et al., 2013; RAGINI, 2015). Estes lipossomas são facilmente reconhecidos e capturados pelo sistema fagocítico mononuclear, resultando em uma curta permanência destes nanocarreadores na circulação após o contato com componentes do sangue. Devido à alta taxa de captura desses nanocarreadores pelas células do sistema fagocitário, os lipossomas convencionais são eficientes na entrega de fármacos frente a microrganismos intracelulares, em especial os que são fagocitados pelos macrófagos (DARAEI et al., 2016).

Figura 12 – Classificação dos lipossomas quanto à composição química.



Fonte: APOLINÁRIO et al. (2017).

Os lipossomas furtivos ou de longa circulação são compostos por fosfolipídeos, colesterol e componentes hidrofílicos naturais ou sintéticos, como, por exemplo, fosfatidilinositol e polietilenoglicol (PEG). Estes lipossomas apresentam menor afinidade pelo sistema fagocítico mononuclear, além de diminuir estericamente a adsorção de opsoninas do plasma nas superfícies de lipossomas (TORCHILIN, 2005; AKBARZADEH et al., 2013). A inserção do polímero na superfície lipossomal permite um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, devido à diminuição da associação com as opsoninas do plasma, dificultando o reconhecimento e captura deste lipossoma por células do sistema fagocitário (KRAFT et al., 2016).

Os lipossomas sítio específicos são formados por lipídeos e um ligante na superfície que permite o direcionamento do fármaco encapsulado no sítio de ação desejado com objetivo de aumentar a quantidade de liberação do fármaco no alvo e diminuir os efeitos adversos (CONNIOT et al., 2014; NOBLE et al., 2014). Os principais ligantes utilizados como direcionadores dos sistemas nanotecnológicos são anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas e lectinas (NEKKANTI; KALEPU, 2015).

Os lipossomas podem encapsular princípios ativos para diversas aplicações biológicas (JANGDE; SINGH, 2016; KIELER-FERGUSON et al., 2017; POERIO et al., 2017; REIS et al., 2017). Estudos recentes apontam para a encapsulação de fármacos em lipossomas como uma estratégia promissora de liberação controlada de agentes antimicrobianos.

Pesquisas vêm mostrando a eficácia dos lipossomas na liberação de moléculas com potencial antiparasitário. Em estudo pioneiro, anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome) reduziu a toxicidade deste fármaco e manteve sua atividade tripanocida, tornando-se uma alternativa terapêutica (YARDLEY; CROFT, 1993). Em uma revisão sobre a aplicação de nanocarreadores no tratamento da doença de Chagas, Romero e Morilla (2010) retrataram estudos de benzonidazol encapsulado em lipossomas convencionais com atividade tripanocida, assim como, etanidazol encapsulados em lipossomas sensíveis ao pH também com atividade tripanocida. Os lipossomas contendo etanodazol mostraram-se menos tóxico comparado aos lipossomas que continham benzonidazol.

Em um estudo realizado por Carvalho et al. (2015) foi investigado o uso de análogos de dinitroanilina (TFL-A) encapsulados em lipossomas como alternativa para otimizar a atividade antileishmania de TFL-A. Os resultados demonstram que a molécula encapsulada apresentou melhor atividade, assim como teve sua citotoxicidade reduzida. Ortega, Giorgio e De Paula (2017) realizaram uma revisão sobre os avanços alcançados com os sistemas de administração de fármacos antileishmania contidos em lipossomas. Os resultados encontrados pelos autores indicam que os lipossomas convencionais ou funcionalizados apresentam melhores resultados na administração de fármacos utilizados para o tratamento de leishmaniose como anfotericina B, pentamidina, paromomicina e miltefosina.

Pesquisas mostram que os lipossomas podem ser utilizados como veículos de entrega de antimicrobianos em bactérias sem e com perfil de resistência. Umagiliyage et al. (2017) investigaram a atividade antimicrobiana de lipossomas unilamelares contendo D-limoneno (LipoLLA) frente a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados desse estudo demonstraram que a formulação lipossomal foi mais eficaz que a molécula livre. Encontramos resultado similar em outro estudo, Obonyo et al. (2012) que desenvolveram uma nova formulação lipossomas encapsulando ácido linolênico lipossomal (LipoLLA) e avaliaram a atividade antibacteriana frente a cepas resistentes de *Helicobacter pylori*. Os

autores evidenciaram a potente atividade bactericida de LipoLLA frente aos isolados clínicos quando comparado ao composto livre.

Em estudos recentes, publicados pelo nosso grupo de pesquisa, Cavalcanti et al. (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de β -lapachona encapsulada em lipossomas frente a cepas de MRSA e Ferraz-Carvalho et al. (2016) testaram a atividade antibacteriana de ácido úsnico encapsulado em lipossomas frente a *Mycobacterium tuberculosis* com perfil de resistência. Esses resultados confirmaram que os lipossomas são nanocarreadores eficazes para moléculas com potencial antibacteriano.

Além da atividade antibacteriana, os pesquisadores estão apresentando resultados promissores com lipossomas na entrega de compostos com atividade antibiofilme. Em estudos recentes, Cui et al. (2016) analisaram o efeito antibiofilme do óleo de canela encapsulado em lipossomas frente a MRSA. A formulação lipossomal com o composto encapsulado exibiu potencial antibacteriano e antibiofilme. Pua e Tang (2017) observaram a atividade do peptídeo Alpep7 encapsulado em lipossomas com foco na inibição da formação do biofilme de *Listeria monocytogenes*. Os resultados demonstraram que o Alpep7 em lipossomas apresentou potencial antibiofilme para aplicação na indústria de alimentos. Dias-Souza, Soares e Santos (2017) investigaram a eficácia de lipossomas contendo cloranfenicol frente a biofilmes bacterianos de *Bacillus* sp., *Acinetobacter haemolyticus*, *Enterobacter hormaechei* e *Acinetobacter junii*. Os autores concluíram que o uso de moléculas antimicrobianas encapsuladas em lipossomas é vantajoso em relação às moléculas livres para impedir a formação de biofilmes. Estes estudos vêm enfatizando que os lipossomas são veículos indicados para entrega de compostos em biofilmes.

Diante de todos os estudos, pode-se afirmar que os lipossomas são sistemas de liberação controlada de antimicrobianos promissores para o tratamento de infecções (CUI et al., 2016; UMAGILIYAGE et al., 2017; ORTEGA, GIORGIO E DE PAULA, 2017).

4 METODOLOGIA

4.1 PURIFICAÇÃO DA CrataBL

A purificação da CrataBL foi realizada de acordo com Araújo et al. (2012). Inicialmente, a entrecasca de *Crateva tapia* foi suspensa em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v) gerando o extrato bruto. O extrato bruto foi filtrado através de gaze e centrifugado a $4000 \times g$ por 15 min, em seguida, foi submetido ao fracionamento proteico em duas frações (0-30% e 30-60%) de sulfato de amônio. A fração de 30-60% contendo a lectina foi submetida à diálise com água destilada, em seguida, foi dialisada em tampão citrato 10mM pH 5,5 e aplicada em coluna de CM-celulose equilibrada com o mesmo tampão fosfato. A lectina adsorvida foi eluída com um tampão fosfato de equilíbrio e uma solução de NaCl a 0,5 M.

4.2 PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO CrataBL

Os lipossomas contendo CrataBL (CrataBL-Lipo) foram preparados pelo método de congelamento-descongelamento de acordo com Pick et al. (1981). Inicialmente, os lipídeos, fosfatidilcolina, colesterol e esterilamina (razão molar 80 mM, 7: 2: 1, respectivamente) foram solubilizados em solvente orgânico, clorofórmio e metanol (3: 1, v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos sob pressão durante 60 min (37 ± 1 °C, 80 rpm), formando um filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com uma solução de CrataBL solubilizada em tampão fosfato pH 7,4 (1 mg/ml) e submetida a dois ciclos de congelamento e descongelamento para a formação de lipossomas multilamelares. Em seguida, os lipossomas multilamelares foram reduzidos a lipossomas unilamelares através de extrusões em membranas de policarbonato de 600 nm (quatro vezes) e 200 nm (dez vezes) utilizando um sistema de seringa de extrusão de 2 ml. Os Lipossomas sem CrataBL foram preparados para análise comparativa.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram caracterizados através do tamanho de partícula ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH como previamente descrito por

Cunha et al. (2016). As dispersões de lipossomas foram dimensionadas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do tamanho de partícula, trezentos microlitros da dispersão lipossomal foram diluídos em setecentos microlitros de água purificada. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (nm). O potencial zeta dos lipossomas foi medido após a diluição de cinquenta microlitros da dispersão de lipossomas em novecentos e cinquenta microlitros de uma solução de NaCl (1 mM). A carga superficial dos lipossomas (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH do lipossoma foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnopon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE CrataBL EM LIPOSSOMAS

Para determinar o teor de CrataBL, uma alíquota da formulação lipossomal contendo CrataBL (150 µl) foi diluído em 50 µl de CH₃OH, sonificada durante 10 minutos e a lectina foi mensurada por método colorimétrico de Peterson-Lowry (PETERSON, 1997).

A eficiência de encapsulação (%EE) de CrataBL foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de lipossomas (1000 µl) foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.792 g por 1h. Cento e cinquenta microlitros da amostra foi filtrada (filtrado de CrataBL) e foram diluídos em água deionizada. O teor de proteína foi mensurado pelo método colorimétrico de Peterson-Lowry. Os dados de eficiência de encapsulação de lectina são calculados usando a equação descrita abaixo e são apresentados como a percentagem da lectina utilizada para preparar os lipossomas.

$$\% EE = \frac{\text{Total de CrataBL} - \text{filtrado de CrataBL}}{\text{Total de CrataBL}} \times 100$$

Total de CrataBL

4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

4.5.1 Cultura de fibroblastos e macrófagos

Fibroblastos L929 e linhagem de macrófagos J774A.1 foram cultivados em meios RPMI- 1640 e DMEM, respectivamente, a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Os meios continham 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina G e 2 mM de L-glutamina. O meio de cultura foi removido e repostado após 2 a 3 dias e subcultivado quando a densidade da população celular atingiu 70-80% de confluência.

4.5.2 Citotoxicidade de fibroblastos

A citotoxicidade de CrataBL, CrataBL-Lipo, lipossomas sem CrataBL e BZN em células L929 foi avaliada através do ensaio de redução de resazurina. As células ($0,7 \times 10^5$ células/ml) foram semeadas em uma microplaca de 96 poços com fundo plano por 24 h para adesão (37 °C, 5% de CO₂), em seguida, os compostos foram adicionados na faixa de concentração de 0,39 a 50 µg/ml e as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂. Após 68h da incubação com os compostos, adicionou-se 20 µl de solução de Alamar Blue (resazurina, 0,312 mg/ml) em cada poço e as placas foram incubadas novamente por 4h. A leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de 570 nm e 600 nm através de leitor de microplacas (Multiskan FC Microplate Photometer, ThermoFisher Scientific). A concentração citotóxica de 50% das células (CC₅₀) foi calculada por análise de regressão com o GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, EUA). Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.5.3 Citotoxicidade de macrófagos

A citotoxicidade de CrataBL, CrataBL-Lipo, lipossomas sem CrataBL e BZN em células J774A.1 foi avaliada através do ensaio de redução de MTT-tetrazólio. As células ($0,7 \times 10^5$ células/ml) foram semeadas em uma microplaca de 96 poços com fundo plano por 24 h para adesão (37 °C, 5% de CO₂), em seguida, os compostos foram adicionados na faixa de concentração de 1 a 100 µg/ml e as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 72 h. Após a incubação, a solução de MTT

(brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) foi adicionada a cada poço e as placas foram novamente incubadas por 2 h. O meio de cultura e o MTT não reduzido foram removidos e 100 µl de DMSO foram adicionados para remoção dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de 570 nm através de leitor de microplacas (Multiskan FC Microplate Photometer, ThermoFisher Scientific). A concentração citotóxica de 50% das células (CC₅₀) foi calculada por análise de regressão com o GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, EUA). Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.6 ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE CrataBL E CrataBL-Lipo

Tripomastigotas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células Vero infectadas e distribuídas em placas de 96 poços a uma densidade final de 4×10^5 células por poço em meio RPMI-1640. CrataBL, CrataBL-Lipo e lipossomas sem CrataBL foram adicionados aos poços em duplicata nas concentrações de 0,19 a 100 µg/ml. O BZN foi utilizado como fármaco de referência. A placa foi incubada a 37°C, 5% de CO₂ por 24h. Após esse período, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitos viáveis foi contado em uma câmara de Neubauer. Os poços que não receberam os compostos foram considerados como 100% do número de parasitos viáveis. A concentração de inibição de 50% do crescimento do parasita (IC₅₀) foi determinada e calculada por regressão linear (GraphPad Prism, versão 5.0) (DA SILVA et al., 2017). O experimento com lipossomas sem CrataBL foi realizado para analisar se os constituintes dos lipossomas apresentavam atividade tripanocida. Dois experimentos independentes foram realizados para cada condição em dia diferente.

Após a avaliação da citotoxicidade e atividade tripanocida de CrataBL e CrataBL-Lipo, o índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre o CC₅₀ e o IC₅₀ (CARDOSO et al., 2014).

4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE DO PARASITO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Tripomastigotas (4×10^5 células/mL) foram ressuspensos em meio RPMI-1640 e tratados com CrataBL-Lipo ou BZN na IC_{50} a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Os parasitos foram marcados com 7-Aminoactinomicina D (7AAD) e anexina V utilizando o kit de detecção de apoptose anexina V-FITC (Ebioscience, San Diego, EUA). Os experimentos foram realizados usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (San Jose, EUA), com 20.000 eventos da região do parasito. Os dados foram analisados utilizando FlowJo (Tree Star Inc. ©, Ashland, EUA) e expressos como a percentagem de células em cada fenótipo da população (não marcado, marcado apenas com 7AAD, marcado apenas com AV ou marcado com ambos os marcadores) em comparação com o controle (células sem tratamento). Dois experimentos independentes, em duplicata, foram realizados (DA SILVA et al., 2017).

4.8 ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO

A linhagem celular de macrófagos J774A.1 (1×10^5 células/ml) foi semeada em placas de 96 poços contendo meio RPMI a 37 °C, 5% de CO₂ por 6 h para a aderência. As células foram tratadas na IC_{50} de CrataBL-Lipo e as placas foram mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ por 24, 48 e 72h. O fármaco de referência utilizado foi o BZN na IC_{50} e o controle não tratado foi denominado basal. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e armazenados a -20 °C para posterior utilização na quantificação de citocinas por citometria de fluxo. As citocinas TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram quantificadas no sobrenadante da cultura dos macrófagos de linhagem tratados com ou sem os compostos. O CBA Th1/Th2/ Th17 mouse kit (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catalog#560485, BD Bioscience, San Jose, CA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os limites de detecção de citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2 - 0,1 pg / ml; IL-4 - 0,03 pg / ml; IL-6 - 1,4 pg / ml; IL-10 - 16,8 pg / ml; TNF - 0,9 pg / ml; IFN- γ - 0,5 pg / ml; IL-17A - 0,8 pg / ml. Os dados foram adquiridos através do citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) e a análise foi feita com o software FACSArray v3 (Soft Flow Inc).

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE CrataBL E CrataBL-Lipo

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada usando o método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Inicialmente, o MHC foi adicionado em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida, CrataBL e CrataBL-Lipo foram adicionados por diluição seriada nas concentrações de 0,05 a 0,72 mg/ml. As suspensões bacterianas de MSSA ATCC 29213, cinco isolados clínicos de MSSA, MRSA ATCC 33591, cinco isolados clínicos de MRSA, cinco isolados clínicos de VRSA foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de McFarland, em seguida, foram depositadas nos poços para obter uma concentração final de 10^5 UFC/poço. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e após a incubação houve a leitura espectrofotométrica a 620 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A CMI foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. Os experimentos com lipossomas sem CrataBL foram realizados para analisar se os constituintes dos lipossomas apresentavam atividade antibacteriana. Três experimentos independentes foram realizados para cada condição em diferentes dias.

4.10 ENSAIO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Inicialmente, TSB + 1% de glicose foram distribuídos em cada poço das placas de fundo plano de microdiluição. Em seguida, CrataBL e CrataBL-Lipo foram adicionados nas CMI, CMI/2 e CMI/4 e, posteriormente, as bactérias foram ajustadas (10^8 UFC/poço) e plaqueadas. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato (pH 7,4) e a quantificação da produção de biofilme foi realizada pelo método de coloração por cristal violeta. As placas foram secas à temperatura ambiente e as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99% durante 15 min. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram incubadas para secar novamente. Em seguida, as bactérias aderidas às placas foram coradas com cristal violeta. O excesso de corante foi removido e adicionou-se ácido acético glacial a 30% em cada poço. Os resultados foram obtidos por espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC,

Thermo Scientific, Madrid, Espanha). O controle de crescimento foi o biofilme formado a partir de bactérias sem o tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da formação de biofilme (PEETERS et al., 2016). Os experimentos com lipossomas sem CrataBL foram realizados para analisar se os constituintes dos lipossomas apresentavam atividade de inibição da formação do biofilme. Experimentos independentes foram realizados para cada condição em diferentes dias.

4.11 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO PRÉ-FORMADO DE BIOFILME

Inicialmente, os inóculos bacterianos foram ajustados (10^8 UFC/poço) em TSB + 1% de glicose e distribuídos em placas de microdiluição de fundo plano. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h para formação de biofilme. Após a incubação, o meio foi removido e um novo meio foi repostado. Em seguida, CrataBL e CrataBL-Lipo foram adicionados nas CMI, CMI/2 e CMI/4. As placas foram então incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Em seguida, os poços foram lavados com tampão fosfato (pH 7,4) e corados utilizando o método de coloração por cristal violeta como descrito anteriormente. O controle de crescimento foi o biofilme formado a partir de bactérias sem o tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do biofilme pré-formado (DAS; YANG; MA, 2014). Os experimentos com lipossomas sem CrataBL foram realizados para analisar se os constituintes dos lipossomas apresentavam atividade de erradicação do biofilme formado. Três experimentos independentes foram realizados para cada condição em dias diferentes.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de testes não paramétricos. Um teste de regressão linear simples foi realizado para obter CC_{50} e IC_{50} . Para medir a variabilidade entre os grupos tratados foi utilizado o teste de Wilcoxon e entre os grupos tratado e controle foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Análises de regressão linear e significância foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

Os dados da atividade antibacteriana e antibiofilme foram analisados estatisticamente no programa Origin 5.0 e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para comparar as médias de múltiplos grupos, a análise de variância one-way (ANOVA) foi aplicada usando o procedimento de comparação múltipla de Tukey. Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS

CrataBL-Lipo apresentou tamanho de partícula de $101,9 \pm 1,3$ nm, PDI de 0,245, potencial zeta de $+33,8 \pm 1,3$ mV e pH 7,41. A eficiência de encapsulação de CrataBL nos lipossomas foi de $80 \pm 0,84\%$. Os lipossomas sem a CrataBL apresentaram tamanho de partícula de $119,1 \pm 1,3$ nm, PDI de 0,173, potencial zeta de $+31,0 \pm 1,8$ mV e pH 7,42 (tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização de lipossomas contendo CrataBL.

	Ø (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
CrataBL-Lipo	$101,9 \pm 1,3$	0,245	$+33,8 \pm 1,3$	7,41
Lipossomas sem CrataBL	$119,1 \pm 1,3$	0,173	$+31,0 \pm 1,8$	7,42

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas.

Fonte: Campos, 2018.

Estudos atuais têm proposto a encapsulação de moléculas ativas, como possíveis agentes antimicrobianos, em lipossomas para aplicação no tratamento de doenças infecciosas, com o objetivo de eliminar microrganismos, sobrepor a resistência, impedir a formação e erradicar de biofilmes bacterianos e atuar como imunomoduladores (CAVALCANTI et al., 2015; KHATIBI et al., 2017; ENGEL et al., 2017).

No presente trabalho, a lectina CrataBL foi encapsulada em lipossomas com o objetivo de obter um sistema de liberação controlada de fármacos para futura aplicação *in vivo*. Nanocarreadores com tamanhos de partícula variando de 50 a 200 nm são apropriados para aplicações intravenosas (PATIL; JADHAV, 2014). Adicionalmente, a carga superficial dos lipossomas indica estabilidade quando o potencial zeta é menor que -30 mV ou maior que +30 mV, pois as cargas presentes na superfície impedem a agregação dos nanocarreadores (LU et al., 2014). Quanto à eficiência de encapsulação de lectinas em lipossomas, estudos demonstraram

uma eficiência em torno de 50% a 70% (ANDRADE et al., 2004; CUNHA et al., 2016). Assim, estes resultados da caracterização de CrataBL-Lipo indicam que a encapsulação desta lectina em nanocarreadores é adequada para uma futura aplicação *in vivo*.

5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A CrataBL, CrataBL-Lipo e os lipossomas sem CrataBL não apresentaram citotoxicidade para a linhagem celular de fibroblastos L929 nas concentrações testadas ($CC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$), enquanto que BZN apresentou citotoxicidade ($CC_{50} = 4,322 \mu\text{g/ml}$). Para a linhagem de macrófagos J774A.1, CrataBL e BZN apresentaram citotoxicidade ($CC_{50} = 56,8 \mu\text{g/ml}$ e $11,62 \mu\text{g/ml}$, respectivamente), enquanto que CrataBL-Lipo e os lipossomas sem CrataBL não exibiram atividade citotóxica ($CC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 2).

5.3 ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE CrataBL E CrataBL-Lipo

A CrataBL e lipossomas sem CrataBL não apresentaram atividade tripanocida, diferentemente dos CrataBL-Lipo que exibiram atividade tripanocida com IC_{50} de $1,1 \mu\text{g/ml}$. O BZN, fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas, apresentou atividade tripanocida com IC_{50} de $10,1 \mu\text{g/ml}$. Os dados obtidos a partir de atividade tripanocida e citotoxicidade de CrataBL-Lipo resultaram em um índice de seletividade $> 90,9$ para macrófagos (J774A.1) e fibroblastos (L929) (Tabela 2).

A doença de Chagas acomete em torno de 7 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente na América Latina. O aspecto mais relevante desta doença é sua capacidade de causar morte prematura (DA SILVA et al., 2017). As opções antimicrobianas usadas na terapia desta infecção são limitadas a dois fármacos tripanocidas, o nifurtimox e o benznidazol. A terapia com esses fármacos apresenta efeitos adversos graves que podem levar à interrupção do tratamento e à sua ineficácia na fase crônica da doença (VILLATA et al., 2013; DA SILVA et al., 2017). Assim, pesquisadores estão buscando novos compostos tripanocidas para tratar

pacientes chagásicos a fim de minimizar este problema de saúde global (URBINA, 2015).

Tabela 2 – Citotoxicidade e atividade tripanocida de CrataBL e CrataBL-Lipo.

Compostos	IC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml) ^a	IS	CC ₅₀ (µg/ml) ^b	IS
CrataBL	> 100	> 100	-	56.8	-
CrataBL-Lipo	1.1	> 100	> 90.9	>100	> 90.9
Benznidazole	10.1	4.33	0.42	11.62	1.15
Lipossomas sem CrataBL	> 100	> 100	-	> 100	-

IC₅₀: concentração de inibição de 50% do crescimento do parasito; CC₅₀: concentração citotóxica de 50%; IS: índice de seletividade, razão CC₅₀/IC₅₀. CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas; ^a: citotoxicidade nos fibroblastos L929; ^b: citotoxicidade nos macrófagos J774A.1.

Fonte: Campos, 2018.

Em nosso estudo, CrataBL não apresentou atividade tripanocida, enquanto que CrataBL-Lipo apresentou atividade tripanocida em uma concentração dez vezes menor que o BZN, demonstrando que a encapsulação desta lectina em lipossomas potencializou a atividade biológica. Algumas lectinas não são endocitadas devido ao seu tamanho, apresentando dificuldade em atingir seu alvo, de forma a impossibilitar a sua ação antimicrobiana (IORDACHE et al., 2015), como foi observada com o CrataBL quando foi testado isoladamente. No entanto, a encapsulação de CrataBL em lipossomas é capaz de superar este problema e permitir a ação tripanocida de CrataBL. Portanto, nossos resultados sugerem que os lipossomas podem entregar CrataBL em um alvo no parasita, causando sua morte.

Além disso, sugere-se que houve uma possível interação eletrostática entre os lipossomas e o parasito, uma vez que os lipossomas desenvolvidos neste estudo apresentam carga superficial positiva, enquanto o patógeno *Trypanosoma cruzi* apresenta carga negativa na superfície celular (SOUTO-PADRON et al., 1984). A carga superficial positiva de lipossomas e a carga superficial negativa das células poderia promover a interação dos lipossomas com as células, otimizando a

endocitose dos nanocarreadores (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Portanto, CrataBL encapsulada em lipossomas é uma possível estratégia terapêutica no tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

A biocompatibilidade com as membranas biológicas apresentada pelos lipossomas permite a interação efetiva com células e a entrega do fármaco ao alvo desejado (AKBARZADEH et al., 2013). CrataBL-Lipo não apresentou efeito citotóxico nas células dos fibroblastos L929 e macrófagos J774A.1 nas concentrações testadas. Esse resultado pode ser explicado devido à similaridade da composição lipídica dos lipossomas e das membranas celulares (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Segundo Romanha (2010), uma molécula ou sistema classificado como seletivo deve apresentar $IS \geq 50$. O IS permite analisar a seletividade do composto para microrganismos, fornecendo uma indicação de segurança para a administração de fármacos no controle de infecções microbianas em humanos (SANTOS et al., 2016). Além disso, os compostos que apresentam IS dentro dos parâmetros anteriormente citados, são apontados para a avaliação de atividades biológicas *in vivo* em modelos experimentais (ROMANHA et al., 2010; BAGLA et al., 2014). Assim, podemos sugerir que a CrataBL encapsulada em lipossomas apresenta um alto grau de seletividade com $IS > 90,9$ para o parasito, sendo um composto promissor no tratamento da doença de Chagas.

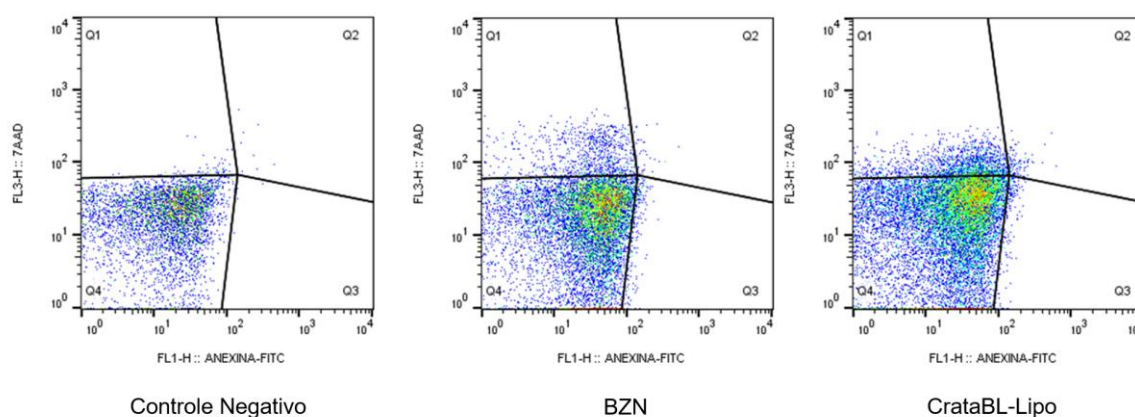
5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE DO PARASITO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicaram que o CrataBL-Lipo diminuiu a viabilidade celular do *T. cruzi*, sendo efetivo na indução da morte celular do parasita (Figura 13).

Os parasitos tratados com CrataBL-Lipo na IC_{50} foram aproximadamente 23 vezes mais marcados positivamente para 7AAD, aproximadamente 5 vezes mais marcados para 7AAD e Anexina V e aproximadamente 2 vezes mais marcados para anexina V em comparação ao controle (Figura 13). Foi observado que 12,26% dos parasitos tratados com CrataBL-Lipo no valor de IC_{50} tiveram morte induzida por

alteração da membrana celular. Dentre os 12,26% de células marcadas, 1,25% sofreram apoptose inicial (Anexina V positiva), 0,80% sofreram apoptose tardia (7AAD e anexina V positiva) e 10,55% sofreram o necrose (7AAD positivas) (Figura 13). A indução de apoptose tardia e necrose por CrataBL-Lipo e BZN foi estatisticamente significativa quando comparada ao controle (Tabela 3).

Figura 13 – Análise por citometria de fluxo de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com CrataBL-Lipo e marcados com Anexina V/7AAD.



7AAD: 7-aminoactinomicina D; ANEXINNA-FITC: anexinn V conjugado com fluoresceína isotiocianato; BZN: benznidazol; CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas.

Fonte: Campos, 2018.

CrataBL-Lipo apresentou alto potencial tripanocida, sendo necessário entender o perfil de morte celular dos parasitos. A morte celular programada apresenta dois mecanismos principais: apoptose e necrose, essas vias de morte celular estão diretamente relacionadas à ação, tipo, tempo e intensidade do estímulo (GREEN; LLAMBI, 2015). Apoptose é uma morte celular programada caracterizada por clivagem proteolítica de caspases, encolhimento celular, fragmentação nuclear, formação de bolhas e exposição a fosfatidilserina na camada externa da membrana celular, formação de corpos apoptóticos ligados a membrana e perda de potencial de membrana mitocondrial com liberação de citocromo para o citosol (SANDES et al., 2014). A necrose é um processo de colapso celular com aumento da vacuolização citoplasmática, despolarização mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), perda da homeostase do cálcio e ruptura da membrana celular com extravasamento dos compartimentos celulares (MENNA-BARRETO et al., 2009).

Tabela 3 – Análise por citometria de fluxo de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com CrataBL-Lipo e marcados com Anexina V/7AAD.

Compostos	Necrose	Apoptose Tardia	Apoptose Inicial
Controle	0.47%	0.16%	0.83%
Benznidazol	7.16% ^a	0.39%	2.66% ^a
CrataBL-Lipo	10.55% ^{a,b}	0.8% ^a	1.25% ^{a,b}

CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas; ^a: diferente estatisticamente significativo em relação ao controle; ^b: diferente estatisticamente significativo em relação ao benznidazol ($p < 0,05$).

Fontes: Campos, 2018.

Em nosso estudo, CrataBL-Lipo eliminou as células do *T. cruzi* por meio de apoptose tardia e necrose, assim como, o benznidazol. A necrose não é considerado um tipo interessante de morte celular uma vez que a perda de integridade da membrana e extravasamento de componentes intracelulares conduz à inflamação e pode levar a um aumento de danos de tecidos (GREEN; LLAMBI, 2015). No entanto, a necrose não é o principal mecanismo de morte celular, uma vez que essa indução de morte ocorreu em torno de 10%. Desta forma, a investigação de outros mecanismos de indução da morte por CrataBL-Lipo deve ser realizada.

As lectinas podem desenvolver sua ação tripanocida através da inibição de receptores para proteína quinase ativada (RACK), estresse oxidativo, interferência na atividade mitocondrial, alteração no influxo de Ca^{2+} mitocondrial e indução de poliamina (DEBRABANTA et al., 2003). Em um estudo recente, a pCramoll 1,4 lectina induziu a morte do *T. cruzi* por necrose e afetou a fosforilação oxidativa, causando acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (FERNANDES et al., 2010; FERNANDES et al., 2014). Em outro estudo recente, *Urtica dioica* liga-se principalmente à glicoproteína de superfície da membrana de *T. brucei*, induzindo a morte do parasito (CASTILLO-ACOSTA et al., 2015). Sabe-se que os agentes ligantes de carboidratos, como as lectinas, podem ligar-se as estruturas dos glicanos na superfície dos parasitos, impedindo a endocitose de moléculas importante e induzindo a lise celular (CASTILLO-ACOSTA; BALZARINI, 2017). Assim, sugere-se que CrataBL encapsulada em lipossomas têm

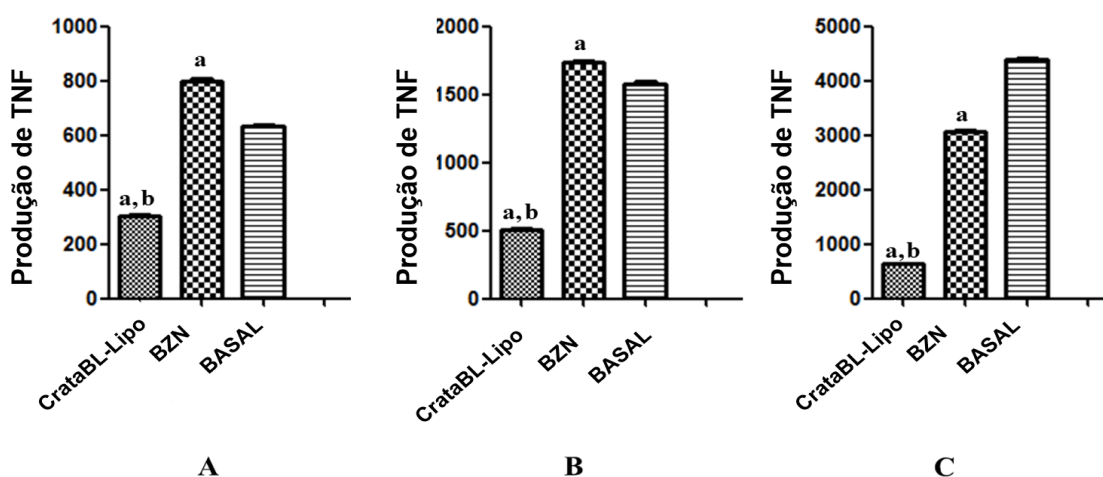
efeitos sobre a membrana celular porque induziu a morte por apoptose tardia e necrose.

5.5 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO

CrataBL-Lipo não apresentou atividade imunomoduladora para as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A, entretanto, exibiu efeito imunomodulador estatisticamente significativo para TNF e IL-10 (Figuras 2 e 3). A redução da síntese de TNF e IL-10 por macrófagos após tratamento com CrataBL-Lipo foi estatisticamente significativa no período de 24h, 48h e 72h em relação ao tratamento basal e BZN ($p < 0,05$) (Figuras 14 e 15).

O sistema imunológico combate os agentes infecciosos, contudo sua capacidade adaptativa deve ser explorada com foco em estimular o seu potencial para neutralizar as infecções. Nesse sentido, os sistemas de liberação controlada de fármacos podem melhorar a entrega de moléculas com potencial para ativar e modular o sistema imunológico (LOOK et al., 2010).

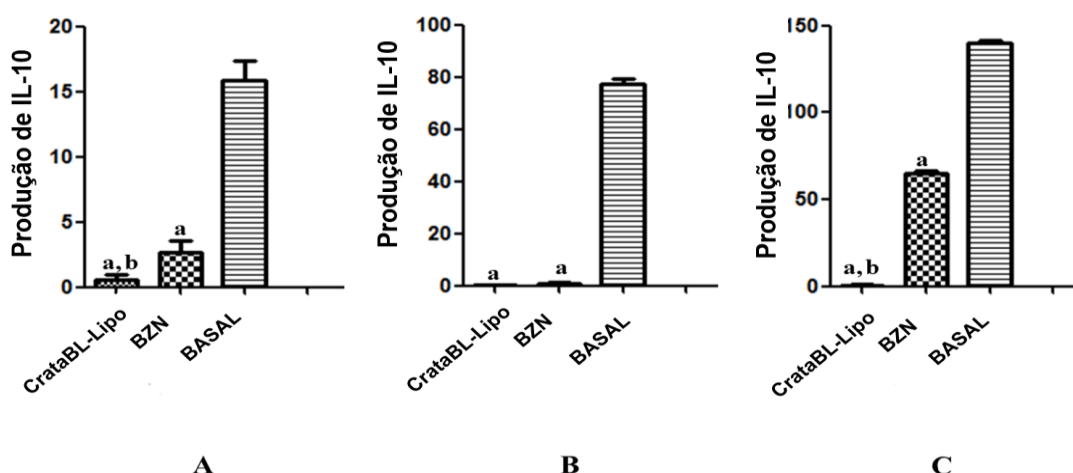
Figura 14 – Produção de TNF por macrófagos J774A.1 após tratamento com CrataBL encapsulada em lipossomas e benznidazol.



CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas; BZN: benznidazol; TNF: fator de necrose tumoral; A: resultados de 24h; B: resultados de 48h; C: resultados de 72h; (^a) Diferenças significativas em comparação com os níveis basais; (^b) diferenças significativas em relação ao tratamento com benznidazol ($p < 0,05$).

Fonte: Campos, 2018.

Figura 15 – Produção de IL-10 por macrófagos J774A.1 após tratamento com CrataBL encapsulada em lipossomas e benznidazol.



CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas; BZN: benznidazol ; IL-10: interleucina dez; A: resultados de 24h; B: resultados de 48h; C: resultados de 72h; (^a) Diferenças significativas em comparação com os níveis basais; (^b) diferenças significativas em relação ao tratamento com benznidazol ($p < 0,05$).

Fonte: Campos, 2018.

CrataBL-Lipo reduziu significativamente a produção de IL-10, uma citocina com perfil regulatório encontrada em níveis altos na forma indeterminada da DC (VASCONCELOS et al., 2015). Estudos pioneiros demonstraram que níveis elevados de IL-10 são capazes de inibir o efeito tripanocida de macrófagos ativados por IFN- γ , enquanto níveis reduzidos de IL-10 podem diminuir a parasitemia e mortalidade de animais com infecção chagásica (SILVA et al., 1992 REED et al., 1994). A IL-10 regula o processo inflamatório e facilita o escape do parasita em altas concentrações, uma vez que inibe as citocinas pró-inflamatórias. Esse processo favorece o desvio do perfil Th2, que resultaria na manutenção do parasito, levando ao desenvolvimento de lesões de fase crônica (PISSETTI et al., 2009). Assim, a imunomodulação dessa citocina é importante como forma de regular a ação do sistema imunológico na eliminação do *T. cruzi*.

Nesse estudo também foi observada que CrataBL-Lipo reduziu a produção de TNF. Sabe-se que essa citocina está relacionada com o perfil inflamatório e seus altos níveis estão associados à forma cardíaca da DC (DUTRA et al., 2014). Esta citocina pró-inflamatória é produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos e está associada a danos cardíacos na DC crônica. Existe uma correlação positiva entre o

grau de dano cardíaco e os níveis de TNF. Assim, a imunomodulação do TNF é necessária para diminuir o dano cardíaco e minimizar ou evitar a cardiomiopatia (VASCONCELOS et al., 2015).

Nesse sentido, CrataBL-Lipo pode imunomodular a produção de IL-10 e TNF favorecendo a eliminação do parasito. Portanto, o efeito imunomodulador do CrataBL-Lipo é uma abordagem inovadora no tratamento da doença de Chagas.

5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CrataBL E CrataBL ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS

Os resultados demonstraram que a CrataBL não apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias testadas (MIC > 0,72 mg/ml). CrataBL-Lipo apresentou um efeito bacteriostático frente a todas as bactérias. Os valores de CMI de CrataBL-Lipo frente a MSSA ATCC 29213, isolados clínicos de MSSA, MRSA ATCC 33591, isolados clínicos de MRSA e isolados clínicos de VRSA variaram entre 0,56 e 0,72 mg/ml (Tabela 4). Como esperado, os lipossomas sem CrataBL não exibiram atividade antibacteriana.

Tabela 4 – Atividade antibacteriana de CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.

	Bactérias	CrataBL	CrataBL-Lipo
		CMI (mg/ml)	
MSSA:	MSSA ATCC 29213	> 0.72	0.56
	Isolados clínicos de MSSA	> 0.72	0.56
	MRSA ATCC 33591	> 0.72	0.72
	Isolados clínicos de MRSA	> 0.72	0.72
	Isolados clínicos de VRSA	> 0.72	0.72

Staphylococcus aureus sensível à metilicina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina; ATCC: American Type Culture Collection; CMI: Concentração Mínima Inibitória; CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulada em lipossomas.

Fonte: Campos, 2018.

Cepas de *S. aureus*, em especial MSSA, MRSA e VRSA produtores de biofilme, são responsáveis por infecções graves, com forte impacto na saúde pública e na economia. Estas bactérias são difíceis de tratar e podem causar infecções nosocomiais e comunitárias com altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (RAGHUNATHAN; DHALIWAL; MOHAN, 2015; BRAMBILLA et al., 2017).

Em nosso estudo, CrataBL não apresentou atividade antibacteriana, por outro lado, o CrataBL-Lipo apresentou atividade inibindo o crescimento bacteriano. Em estudos recentes, Procópio et al. (2017) analisaram o efeito antibacteriano do CasuL, uma lectina extraída de folhas de *Calliandra. surinamensis*. Os resultados deste estudo mostraram que CasuL, na concentração de 0,1 mg/ml, inibe menos de 50% do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus saprophyticus* e MRSA. Bose et al. (2016) avaliaram a atividade antibacteriana do Litchi, lectina extraída da planta *Litchi chinensis*, e os resultados indicaram a ausência de atividade antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488.

É notável que algumas lectinas não conseguem desenvolver sua atividade antibacteriana quando não encapsuladas, como a CrataBL. Esse fato pode ser explicado uma vez que estas lectinas não são internalizadas devido ao seu tamanho, e, portanto não são capazes de atingir seu alvo de ação e promover sua atividade antibacteriana (IORDACHE et al., 2015). Assim, em nosso estudo é sugerido que os lipossomas podem auxiliar na internalização da CrataBL, e como consequência, esta lectina encontra seu alvo, interferindo na viabilidade celular destes microrganismos (AKBARZADEH et al., 2013; FANG et al., 2016).

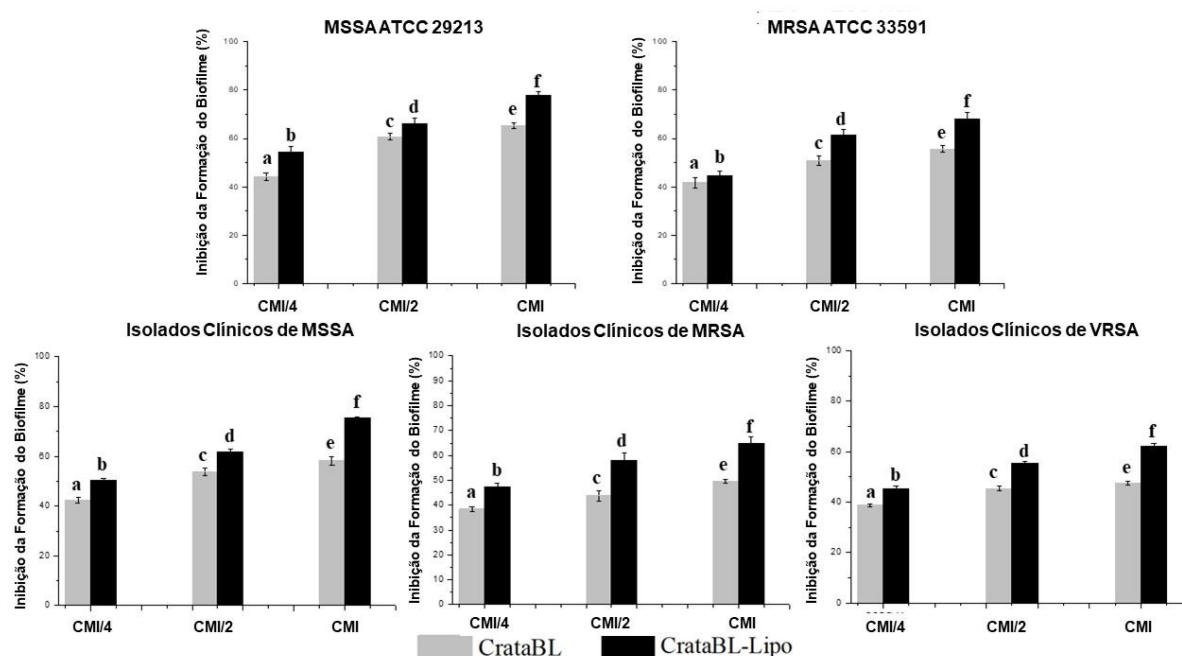
5.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os resultados mostraram que CrataBL e CrataBL-Lipo inibiram a formação de biofilme bacteriano em CMI, CMI/2 e CMI/4 (Figura 16). CrataBL mostrou uma inibição da formação de biofilme de 44,3 a 65,2% frente a MSSA ATCC 29213, 42,3 a 58,3% frente a isolados clínicos de MSSA, 41,3 a 55,4% frente a MRSA ATCC 33591, 38,4 a 49,6% frente a isolados clínicos de MRSA e 38,8 a 47,6% frente a isolados clínicos de VRSA, enquanto CrataBL-Lipo exibiu inibição de biofilme de 54,5 a 77,9%, 50,5 a 75,6%, 50,1 a 70,6%, 47,3 a 64,9% e 45,4 a 62,2%, respectivamente. Como esperado, os lipossomas sem CrataBL não exibiram

atividade antibiofilme. Os resultados estatísticos demonstraram que o tratamento com CrataBL-Lipo foi mais efetivo e dose dependente comparado ao tratamento com CrataBL em todas as concentrações testadas, bem como em todas as bactérias analisadas.

As bactérias podem apresentar alguns fatores de virulência que promovem o estabelecimento e colonização, como os biofilmes. O biofilme é uma comunidade microbiana sésil complexa incorporada em uma matriz polissacarídica autoproduzida. A formação de biofilmes é um fator extremamente importante para a virulência e sobrevivência das bactérias (PARSEK; SINGH, 2003; RABIN et al., 2015). As comunidades microbianas nos biofilmes são resistentes aos antimicrobianos e aos fatores de estresse (HOIBY et al., 2010; HOBLEY et al., 2015). As infecções por biofilmes causam problemas em diversos setores da economia, além de causarem hospitalização por tempo prolongado e redução da qualidade de vida, sendo considerado como um problema socioeconômico (CIOFU et al., 2015). MSSA, MRSA e VRSA foram escolhidos para os testes uma vez que o gênero *Staphylococcus* agrupa os maiores produtores de biofilmes associados a infecções com morbidade e morte (DOSLER; MATARACI, 2013).

Figura 16: Inibição da formação de biofilme pelo tratamento com CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.



CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulado em lipossomas. CMI: concentração mínima inibitória; Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Fonte: Campos, 2018.

CrataBL e CrataBL-Lipo inibiram significativamente a formação de biofilme de MSSA, MRSA e VRSA. Poucos estudos consideraram o potencial das lectinas na inibição da formação de biofilme bacteriano. Procópio et al. (2017) constataram que CasuL a 0,1 mg/ml e 0,4 mg/ml foi capaz de inibir 50% da formação de biofilme de *S. saprophyticus* e MRSA, respectivamente. CasuL em 0,8 µg/ml inibe 72%, 53% e 32% da formação de biofilme de *S. saprophyticus*, MRSA e *S. aureus*. Em nosso estudo, CrataBL e CrataBL-Lipo inibiram a formação de biofilme em percentuais superiores à CasuL. A atividade antibiofilme de CrataBL e CrataBL-Lipo frente às bactérias gram positivas pode ser explicada pela interação de lectinas com o peptidoglicano, impedindo a adesão das células bacterianas a superfície, inibindo a formação do biofilme (AYOUBA; CHATELAIN; ROUGÉ, 1991; NUNES et al., 2011; SILVA et al., 2016).

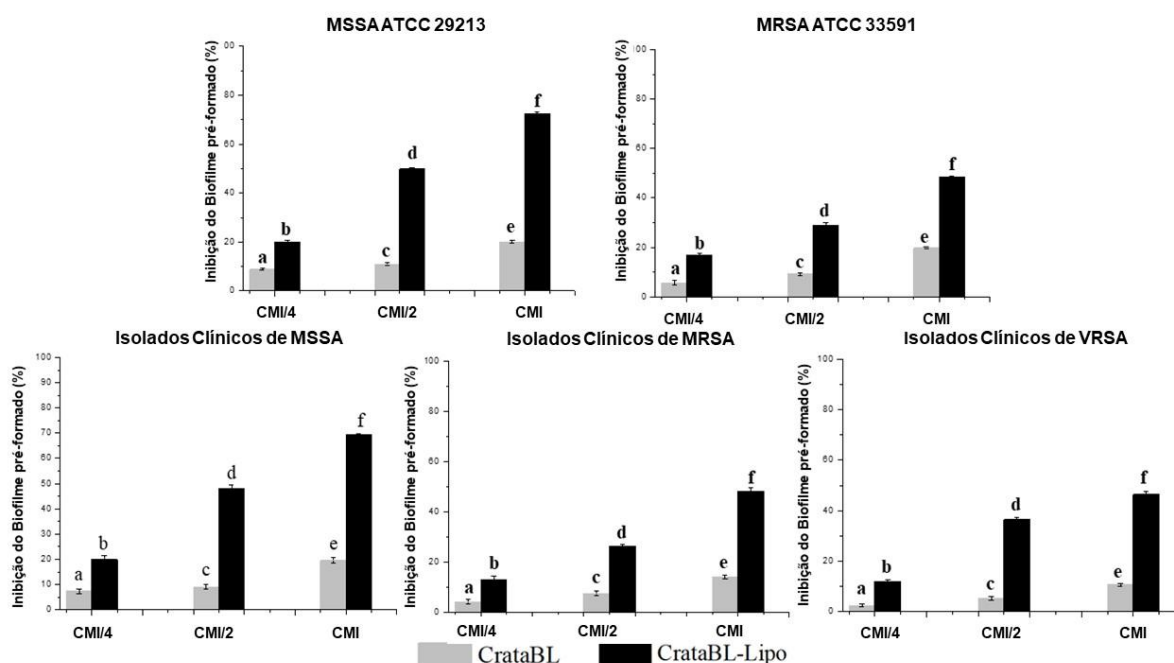
5.8 INIBIÇÃO DO BIOFILME PRÉ-FORMADO

CrataBL e CrataBL-Lipo inibiram o biofilme bacteriano pré-formado na CMI, CMI/2 e CMI/4 (Figura 17). O biofilme pré-formado de MSSA ATCC 29213 foi inibido por CrataBL de 8,8 a 20,0%, isolados clínicos de MSSA de 7,4 a 19,6%, MRSA ATCC 33591 de 5,7 a 19,8%, isolados clínicos de MRSA de 4,1 a 13,3% e isolados clínicos de VRSA de 2,5 a 11,2% enquanto CrataBL-Lipo inibiu o biofilme pré-formado de 20,0 a 72,5%, 20,0 a 69,2%, 16,8 a 48,4%, 12,7 a 48,0% e 12,1% a 45,4%, respectivamente. Os lipossomas sem CrataBL não apresentaram atividade antibiofilme e o tratamento com CrataBL-Lipo novamente foi dose dependente e apresentou resultados estatisticamente diferentes e significantes em relação a CrataBL.

A comunidade científica busca por novas moléculas com potencial antibiofilme ou desenvolvimento de novas estratégias, pois há uma dificuldade em erradicar o biofilme por agentes antimicrobianos convencionais (KHAN; AHMAD, 2012; RYBTKE et al., 2015). Em nosso estudo, CrataBL-Lipo apresentou atividade significativa e dose dependente na eliminação do biofilme pré-formado, enquanto o CrataBL

mostrou pouca atividade na inibição biofilme. Foi possível concluir que a encapsulação de lipossomas em CrataBL potencializa a atividade antibiofilme de CrataBL, pois os lipossomas podem penetrar no biofilme e liberar a lectina causando o desarranjo da estrutura deste biofilme (AKBARZADEH et al., 2013).

Figura 17: Inibição do biofilme pré-formado pelo tratamento com CrataBL e CrataBL encapsulada em lipossomas.



CrataBL-Lipo: CrataBL encapsulado em lipossomas. CMI: concentração mínima inibitória. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Fonte: Campos, 2018.

Um aspecto relevante em nosso estudo foi o uso de concentrações subinibitórias na avaliação da atividade antibiofilme. O uso de fármacos em concentrações subinibitórias pode levar ao aumento da expressão de genes relacionados à formação de biofilme (HATHROUBI et al., 2015; SCHILCHER et al., 2016). Estudos atuais relataram o estímulo à produção de biofilmes por bactérias patogênicas devido à exposição aos antimicrobianos em concentrações subinibitórias (COBRADO et al., 2013; BALAJI; THENMOZHI; PANDIAN, 2013; KULSHRESTHA; QAYYUM; KHAN, 2017). Estes relatos são preocupantes, pois representam um risco para o desenvolvimento da resistência bacteriana (BUZÓN-DURÁN et al., 2017; HE et al., 2017). Portanto, mais estudos sobre a influência de concentrações subinibitórias de fármacos na produção de biofilme bacteriano devem

ser realizados. Assim, CrataBL-Lipo pode ser uma nova abordagem terapêutica para as infecções bacterianas com a formação de biofilme.

6 CONCLUSÃO

- Os lipossomas contendo a CrataBL foram desenvolvidos e caracterizados quanto ao tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, e eficiência de encapsulação, sendo considerados apropriados para aplicações *in vitro* e *in vivo*;
- Os lipossomas contendo a CrataBL não apresentaram citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares de fibroblastos L929 e macrófagos J774A.1;
- CrataBL encapsulada em lipossomas apresentou atividade tripanocida *in vitro*, sendo mais potente que o fármaco padrão utilizado na clínica;
- CrataBL encapsulada em lipossomas apresentou alto índice de seletividade para *Trypanosoma cruzi*;
- CrataBL encapsulada em lipossomas promoveu a indução de morte de *T. cruzi* por apoptose tardia e necrose;
- CrataBL encapsulada em lipossomas apresentou atividade imunomoduladora *in vitro*, reduzindo a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e da Interleucina 10 (IL-10);
- CrataBL encapsulada em lipossomas apresentou atividade antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA);
- CrataBL encapsulada em lipossomas apresentou potencial antibiofilme *in vitro*, mesmo em concentrações subinibitórias;
- CrataBL encapsulada em lipossomas é uma opção terapêutica promissora para infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, MSSA, MRSA e VRSA produtoras de biofilme, bem como apresenta potencial imunomodulador.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABE, C. M. et al. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells. **BioMed Research International**, Nova York, p. 1-10, 2014.
- ACEVEDO, J. Multiresistant bacterial infections in liver cirrhosis: Clinical impact and new empirical antibiotic treatment policies. **World Journal of Hepatology**, Beijing, v. 7, n. 7, p. 916-921, 2015.
- ACKER, H. V.; DIJCK, P. V.; COENYE T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, Trivandrum, v. 22, n. 6, p. 1-8, 2014.
- ACOSTA-SERRANO, A.; COLE, R.N.; ENGLUND, P.T. Killing of *Trypanosoma brucei* by concanavalin A: structural basis of resistance in glycosylation mutants. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 304, n. 4, p. 633-644, 2000.
- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, Nova York, v. 8, n. 102, p. 1-9, 2013.
- ALLISON, D. et al. Synthesis and antimicrobial studies of novel derivatives of 4-(4-formyl-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl) benzoic acid as potent anti-*Acinetobacter baumannii* agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2017.
- ALMEIDA, Z. G.; FARIAS, L. R. Epidemiological Investigations of Principal Nosocomial Infections in Brazil and Identification of Pathogens Responsible: A Bibliographic Approach. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 49-53, 2014.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 11, n. 6, p. 1-8, 2009.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Polimerossomos versus lipossomos: A evolução da “bala mágica”. **Química Nova**, São Paulo, v.40, n. 7, p. 810-817, 2017.
- ARAÚJO R. M. S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, Irvine, v. 183, n. 1, p. 20–26, 2012.

ARAÚJO, R. M. S. et al. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, Heidelberg, v. 1, n. 2, p. 97–100, 2011.

ARREOLA, R. et al. Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Compounds. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 14, n. 2, p. 233-240, 2014.

AUMEERUDDY-ELALFIA, Z.; GURIB-FAKIMB, A.; FAWZI MAHOMOODALLYA, M. Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius. **Journal of Herbal Medicine**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 88-95, 2016.

AYOUBA, A.; CHATELAIN, C.; ROUGÉ, P. Legume lectins interact with muramic acid and N-acetylmuramic acid. **FEBS Letters**, Alemanha, v. 289, n. 1, p. 102–104, 1991.

BAGLA, V. P. et al. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 14, n. 383, p. 1-6, 2014.

BALAJI, K.; THENMOZHI, R.; PANDIAN, S. K. Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 137, n. 5, p. 963–971, 2013.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, Hong Kong, v. 20, n. 3, p. 1-10, 2013.

BEKTAS, S. et al. The frequency of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) among samples in institute for public health in canton Sarajevo. **Materia Socio-Medica**, Sarajevo, v. 28, n. 1, p. 61-65, 2016.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 1-16, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England journal of medicine**, Boston, v.373, n.1, p. 456-466, 2015.

BJARNSHOLT, T. et al. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nature Review Drug Discovery**, London, v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 1-18, 2015.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomédecine et nanotechnologies pour la médecine. **Comptes Rendus Physique**, Paris, v.12, n. 1, p.620-636, 2011.

BONESSO, M.F.; MARQUES, S.A.; CUNHA, M.L.R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA): molecular background, virulence, and relevance for public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.17, n. 4, p.378-386, 2011.

BONNEY, K.M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, Londres, v. 21, n.11, p. 1-9, 2014.

BOSE, P. P. et al. A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**, Roterdã, v. 6, n. 1, p. 242–252, 2016.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; SLIMANI, S.; MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 85–89, 2013.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical device. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, n. 1, p. 975–999, 2015.

BRAMBILLA, L. Z. S. et al. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v.27, n. 1, p. 112–117, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRITO, J. S. et al. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Nova York, v. 94, n. 1, p. 865-872, 2017.

BROWN, R.; CLARKE, T. B. The regulation of host defences to infection by the microbiota. **Immunology**, Oxford, v. 150, n. 1, p. 1-6, 2017.

BUZÓN-DURÁN, L. et al. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**, Londres, v. 65, n. 1, p. 294-301, 2017.

CALDERANO, S. G. et al. The Cellular Organization os Trypanosomatids During Life Cycle. In: Silva, M.S.; Cano, M.I.N. editores. **Frontiers in Parasitology: Molecular and Cellular Biology of Pathogenic**. 1ª Edição. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2017. Capítulo 2, p. 61-103.

CARREA, A; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2016.

CARVALHEIRO, M. et al. Hemisynthetic trifluralin analogues incorporated in liposomes for the treatment of leishmanial infections. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 93, n.1, p. 346-352, 2015.

CASTILLO-ACOSTA V. M. et al. Exposure of *Trypanosoma brucei* to an Nacetylglucosamine-Binding Lectin Induces VSG Switching and Glycosylation Defects Resulting in Reduced Infectivity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-21, 2015.

CASTILLO-ACOSTA, V. M.; BALZARINI, J.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. Surface Glycans: A Therapeutic Opportunity for Kinetoplastid Diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 775- 787, 2017.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. Antimicrobial activity of β -lapachone encapsulated into liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 103–108, 2015.

CERVANTES-GARCÍA, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, México, v. 61, n. 1, p. 28–40, 2014.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, Larchmont, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHATTERJEE, S.S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 205-17, 2013.

CHEN, B. J. et al. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Londres, v. 16, n. 28, p. 1-10, 2017.

CIOFU O. et al. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 7- 23, 2015.

CLELAND, J.L.; DAUGHERTY, A.; MRSNY, R. Emerging protein delivery methods. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v.12, n. 2, p. 212-219, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2016.

COBRADO, L. et al. *In vivo* antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 68, n.1, p. 126-130, 2013.

CONNIOT, J. et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. **Frontiers in chemistry**, Lausanne, v. 2, n. 1, p. 1-27, 2014.

CORTES, M.E.; CONSUEGRA, J.; SINISTERRA, R.D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, Badajoz, v.2, n.1 p.896-905, 2011.

CUI, H. et al. Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, Oxford, v.32, n. 2, p. 215-225, 2016.

CUNHA, C. R. et al. Encapsulation into stealth liposomes enhanced the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 1355, p. 1-11, 2016.

DA ROCHA, A. A. et al. Lectin from *Crataeva tapia* Bark Improves Tissue Damages and Plasma Hyperglycemia in Alloxan-Induced Diabetic Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, n. 1, p. 1-9, 2013.

DA SILVA, E. B. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 16, n. 130, p. 39-50, 2017.

DARAEI, H. et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, Londres, v. 44, n. 1, p.381-391, 2016.

DAS, P.; YANG, X.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 696, p. 1-8, 2014

DEBRABANT, A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 257-267, 2003.

DIAS J. C; COURA J. R.; YASUDA, M.A.S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 123-125, 2014.

DIAS, J. C. P. et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 7-86, 2016.

DIAS, R.O. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DIAS-SOUZA, M. V.; SOARES, D. L.; DOS SANTOS, V. L. Comparative study of free and liposome-entrapped chloramphenicol against biofilms of potentially pathogenic bacteria isolated from cooling towers. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, n. 25, v. 7, p. 999-1004, 2017.

DOSLER, S.; MATARACI, E. In vitro pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Peptides**, Fayetteville, v. 49, n. 1, p. 53-8, 2013.

DUTRA, W. O. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.

DŽIDIC, S.; ŠUŠKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 46, n. 1, p. 11-21., 2008.

ENGEL, J. B. et al. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 252, n. 1, p. 18-23, 2017.

FANG, Z.Y. et al. A single CRD C-type lectin from *Eriocheir sinensis* (EsLecB) with microbial-binding, antibacterial prophenoloxidase activation and hem-encapsulation activities. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 50, n. 1, p. 175–190, 2016.

FASIHI, Y. et al. The emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit in Kerman, Iran. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, Wien, v.1, n. 1, p. 1-4, 2017.

FERNANDE, S M. P et al. The *Cratylia mollis* Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 61, n. 1, p. 381–388, 2014.

FERNANDES M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Nova York, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.

FERRAZ-CARVALHO, R. S et al. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.111, n. 5, p. 330-334, 2016.

FERREIRA, R. S. et al. Crystal Structure of *Crataeva tapia* Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. 1-14, 2013.

FRIÃES, A. et al. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 143, n. 4, p. 745-748, 2015.

GABRILSKA and RUMBAUGH. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future Microbiology**, Londres, v. 10, n. 12, p. 1997-2015, 2015.

GELATTI, L. C. et al, *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação

emergente na comunidade. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, São Paulo, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemical**, Germany, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.

GORDYA et al. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. **Plos one**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. 1-19, 2017.

GREEN, D.R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 7, n. 12, p. 1-25, 2015

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **Peer J.**, Corte Madera, v. 5, n. 1, p. 1-30, 2017.

HATHROUBI, S. et al. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 179, n. 3-4, p. 277-86, 2015.

HE, X. et al. Vancomycin-induced biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with the secretion of membrane vesicles. **Microbial Pathogenesis**, Londres, v. 110, n. 1, p. 225-231, 2017.

HEGGENDORNN, L. H. et al. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Três Lagoas, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2016.

HENRY B. D. et al. Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice. **Nature Biotechnology**, Nova York, v. 33, n. 1, p. 81–88, 2015.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova York, v. 1, n. 3, p. 147-155, 2001.

HOBLEY et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 39, n. 5, p. 649-669, 2015.

HOIBY, N. et al Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

IODACHE, F. et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Nova York, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, Nova York, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015.

JANGDE, R.; SINGH, D. Preparation and optimization of quercetin-loaded liposomes for wound healing, using response surface methodology. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, Londres, v.44, n. 2, p.635-641, 2016.

JOHARI, S. A. et al. Efflux inhibitory activity of flavonoids from *Chromolaena odorata* against selected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates. **African Journal of Microbiology Research**, Nigéria, v. 6, n. 27, p. 5631–5635, 2012.

JUNQUEIRA, C. et al., The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, n. 29, p. 1-23, 2010.

KASPER, L. H.; REDER, A. Immunomodulatory activity of interferon-beta. **Annals of clinical and translational neurology**, Hoboken, v. 1, n. 8, p. 622-631, 2014.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 67, n. 3, p. 618–621, 2012.

KHATIBI, S. A. et al. Encapsulation of *Zataria multiflora* Bioss. Essential Oil into Nanoliposomes and in Vitro Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 41, n. 3, p.1-8, 2017.

KELSO, A. Cytokines: Principles and prospects. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 76, n. 4, p. 300-3017, 1998.

KIELER-FERGUNSON, H. M. Encapsulation, controlled release, and antitumor efficacy of cisplatin delivered in liposomes composed of sterol-modified phospholipids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 103, p. 85-93, 2017.

KRAFT, J. C. et al. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.103, n. 1, p.29-52, 2014.

KULSHRESTHA, S.; QAYYUM, S.; KHAN, A. U. Antibiofilm efficacy of green synthesized graphene oxide-silver nanocomposite using *Lagerstroemia speciosa* floral extract: A comparative study on inhibition of gram-positive and gram-negative biofilms. **Microbial Pathogenesis**, Londres, v. 103, n.1, p. 167-177, 2017.

KUMAR, K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, Guntur, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2012.

LEE, J.; RAMASAMY, M. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. **BioMed Research International**, Nova York, n. 1, p. 1-17, 2016.

LITMAN, D. R.; RUDENSKY, A. Y. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 845-858, 2010.

LITMAN, G. W.; RAST, J.; FUGMANN, S. D. The origins of vertebrate adaptive immunity. **Nature Review Immunology**, Londres, v. 10, n. 8, p. 543-553, 2010.

LIRA, R. F. et al. Binding kinetics of ultrasmall gold nanoparticles with proteins. **Nanoscale**, 2018, DOI:10.1039/C7NR06810G.

LOOK, M. et al. Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 5, p. 378-393, 2010.

LORENA, V. M. B. et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 72, n. 6, p. 529-539, 2010.

LU, Q. et al. Preparation and physicochemical characteristics of anallicin nanoliposome and its release behavior. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 686-695, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARÍN, C. et al. Antitrypanosomatid activity of flavonoid glycosides isolated from *Delphinium gracile*, *D. staphisagria*, *Consolida oliveriana* and from *Aconitum napellus* subsp. *Lusitanicum*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 196–209, 2017.

MARTINS-MELO F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2012.

MARTINS-MELO F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropical**, Basel, v. 130, n.1 p. 167-174, 2014.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 90, n. 2, p. 269-281, 2017.

MENEZES, J. M. R.; PORTO, M. L. S.; PIMENTA, C. L. R. Profile of bacterial infection in a hospital environment. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2016.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

- MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 1, p. 6125–6131, 2015.
- MONTAZERI, E. F. et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. **Burns**, Guildford, v.41, n. 3, p.590-594, 2015.
- MORAN, G. et al. Acute bacterial skin infections: developments since the 2005 infectious diseases society of America (IDSA) Guidelines. **The Journal of Emergency Medicine**, Estados Unidos, v. 44, n. 6, p. 397–412, 2013.
- MUKHERJEE, S. et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. **Nature**, Londres, v. 505, n. 7481, p. 103–107, 2014.
- MULAUDZI, R. B. et al. Antimicrobial properties and phenolic contents of medicinal plants used by the Venda people for conditions related to venereal diseases. **Journal Ethnopharmacology**, Limerick, v. 135, n. 2, p. 330–337, 2011.
- MÜLLER, L. K.; LANDFESTER, K. Natural liposomes and synthetic polymeric structures for biomedical applications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 468, n.3, p. 411–418, 2015.
- NEKKANTI, V.; KALEPU, S. Recent Advances in Liposomal Drug Delivery: A Review. **Pharmaceutical Nanotechnology**, Londres, v.3, p.35-55, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NOBLE, G. T. Ligand-targeted Liposome Design: Challenges and Fundamental Considerations. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.32, n. 1, p.32-45, 2014.
- NUNES, E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 159, n. 1, p. 57–63, 2011.
- NUNES, M. C. P. et al. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova York, v. 62, n. 9, p. 767- 776, 2013.
- NUNES, N. N. et al. Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 48, p. 10431-10436, 2015.
- NÚÑEZ et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

- OBONYO, M. et al. Antibacterial activities of liposomal linolenic acids against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v.9, n.1, p. 2677– 2685, 2012.
- OLIVA, L. V. et al. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. **Process Biochemistry**, Barking, v. 50, n. 11, p.1958–1965, 2015.
- ORDÓÑEZ, A. A et al. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2016.
- ORTEGA, V.; GIORGIO, S.; DE PAULA, E. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 7, n. 3, p. 234-248, 2017.
- OTEO, J.; ARACIL, M. B. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 33, n. 2, p. 27-33, 2015.
- OYEDEMI, S. O. et al. Antibacterial and norfloxacin potentiation activities of *Ocimum americanum* L. against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 109, p. 308-314, 2017.
- PARK, K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 190, n.1, p. 3–8, 2014.
- PARSEK, M. R; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 677–701, 2003.
- PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 8-18, 2014.
- PATRIOTA, L. L. S. et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 103, n. 1, p. 36-46, 2017.
- PEETERS, E. ET al. Modulation of the Substitution Pattern of 5-Aryl-2-Aminoimidazoles Allows Fine-Tuning of Their Antibiofilm Activity Spectrum and Toxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 11, p. 6483-6497, 2016.
- PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, England, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2017.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 83, n. 2, p. 36-356, 1977.

PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova York, v. 212, n. 1, p. 186-194, 1981.

PINAZO, M. J. et al. Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 1, p. 390-395, 2013.

PISSETTI, C. W. et al. Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- α , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 425-430, 2009.

POERIO, N. et al. Liposomes loaded with bioactive lipids enhance antibacterial innate immunity irrespective of drug resistance. **Scientific Reports**, Londres, n. 1, p. 1-14, 2017.

PRATISSOLI, D. et al. Ocorrência de *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera: Pieridae) danificando mudas de *Crataeva tapia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 874-875, 2007.

PROCHNOW, E. P. et al. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 291-296, 2016.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial Lectins: Action Mechanisms, Defensive Roles and Biotechnological Potential. In: Erika Collins, editor. **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. 1ª edição. Nova York: Nova Science Publishers, 2017, Capítulo 3, p. 69 – 90.

PROCOPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 5, n. 98, p. 419-429, 2017.

PU, C; TANG, W. The antibacterial and antibiofilm efficacies of a liposomal peptide originating from rice bran protein against *Listeria monocytogenes*. **Food & Function**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 4159-4169, 2017.

PURRELLO, S. M. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 61-69, 2014.

QU, M. et al. Purification of a secreted lectin from *Andrias davidianus* skin and its antibacterial activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 140-146, 2015.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, London, v. 7, n. 4, p. 7493–7512, 2015.

RAGHUNATHAN, V.; DHALIWAL, M. S.; MOHAN, N. Disseminated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infection – A case report and review. **Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 107-111, 2015.

RAGINI, S. A Review on Liposome. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, Chhattisgarh, v.7, n.1, p 226-231, 2015.

RASSI, A. JR., MARIN-NETO, J. A., RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of a etiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio Janeiro, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

REED, S. G.; et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, Londres, v. 153, n. 7, p. 3135-3140, 1994.

REIS, L. E. S. et al. Mixed Formulation of Conventional and Pegylated Meglumine Antimoniate-Containing Liposomes Reduces Inflammatory Process and Parasite Burden in Leishmania infantum-Infected BALB/c Mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 11, 2017.

ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 4-5, p. 576-588, 2010.

RYBTKE, M. et al. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, 2015.

SALU, B. S. et al. CrataBL, a lectin and factor Xa inhibitor, plays a role in blood coagulation and impairs thrombus formation. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 395, n. 9, p. 1027-1035, 2014.

SANCHEZ-PURRÀ, M. et al. Double-targeted polymersomes and liposomes for multiple barrier crossing in câncer. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.511, n. 2, p. 946-956, 2016.

SANDES, J. M. et al. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the morita-baylis-hillman adduct 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). **PLoS ONE**, São Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2014.

SANTOS, G. B. et al. Semisynthesis of new aphidicolin derivatives with high activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 1205-1208, 2016.

SCHILCHER, K. et al. Modulation of *Staphylococcus aureus* Biofilm Matrix by Subinhibitory Concentrations of Clindamycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 1, p.5957–5967, 2016.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.122, n. 3, p. 787–795, 2012.

SILVA, J. S.; et al. IL-10 and IFN- α regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

SILVA, M. B. A. et al. Vigilância Entomológica dos Vetores da Doença de Chagas no Agreste Pernambucano. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, Paraná, v. 11, n. 7, p.229-244, 2017.

SILVA, P.M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, London, v. 27, n. 1, 695-702, 2016.

SILVA-JUNIOR, G. B. et al. Chagas disease-associated kidney injury – A review. **Nefrología Latinoamericana**, Caracas, v. 14, n. 1, p. 22–26, 2017.

SINGH, H.; SARATHI, S.P. Insight of Lectins - A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, Gurgaon, v. 3, n. 4, p. 1-9, 2012.

SINGH, R. S. et al. Immunomodulatory and therapeutic potential of a mucin-specific mycelial lectin from *Aspergillus panamensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.96, n. 1, p.241-248, 2017.

SOARES, S. G. C. et al. Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. **Revista de Enfermagem da UFPI**, Teresina, v.6, n. 2, p. 37-43, 2017.

SOUTO-PADRON, T. et al. Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Basileia, v. 41, n. 1, p. 215-225, 1984.

- SOUZA, M. A. et al. The Immunomodulatory Effect of Plant Lectins: A Review with Emphasis on ArtinM Properties. **Glycoconjugate Journal**, Lund, v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.
- SRIRAMAN, S. K.; TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as drug carriers. In: **Advanced Biomaterials and Biodevices**, 1. ed. USA: Scrivener/Wiley, 2014. p.79-120.
- STEFANI, S., TENOVER, F.C. Vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: end of an Era?. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Asterdam, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2013.
- STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. **Clinical infectious diseases**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 10-19, 2014.
- STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, n. 2, p 518-525, 1987.
- SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SULCA, M. A. et al. Venom of the Peruvian snake *Bothriopsis oligolepis*: Detection of antibacterial activity and involvement of proteolytic enzymes and C-type lectins in growth inhibition of *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, v. 134, n. 1, p. 30-40, 2017.
- TONG, S. Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.
- TORCHILIN V.P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.64, n.1, p. 302-315, 2012.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Reviews | Drug Discovery**, Londres, v.4, n. 2, p. 145-160, 2005.
- TRAVIS, J. On the origin of the immune system. **Science**, Nova York, v. 324, n. 5927, p. 580-582, 2009.
- UMAGILIYAGE, A. L. et al. Antimicrobial efficacy of liposomes containing d-limonene and its effect on the storage life of blueberries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 130-137, 2017
- URBINA J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 62, n. 1, p. 149-156, 2015.

VASCONCELOS, R. H. et al. Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 376-379, 2015.

VÁZQUEZ A. et al. Mouse Macrophage Galactose-type Lectin (mMGL) is Critical for Host Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v.10, n. 8, p. 909-920, 2014.

VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1543-1555, 2017.

VILLALTA, F. et al. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 208, n. 3, p. 504-511, 2013.

VIOTTI, R. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58 n. 2, p. 635–639, 2014.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, Chengdu, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2015.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.

YAMANAKA, M. et al. Deletion polymorphism in *siglec14* and its functional implications. **Glycobiology**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 841–846, 2009.

YARDLEY, V.; CROFT, S.L. *In vitro* and *in vivo* activity of amphotericin b-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore., v. 61, n.1 , p. 193–197, 1999.

ZHANG, F. et al. Structural studies of the interaction of *Crataeva tapia* bark protein with heparin and other glycosaminoglycans. **Biochemistry**, Washington, v. 52, n. 12, p. 2148-2156, 2013.