

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**CAMILA DOS SANTOS OLIVEIRA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS DE  
BIOSURFACTANTE ITURINA-NAFAMOSTAT, AÇÃO EM MEMBRANAS  
BIOMIMÉTICAS, MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA E REDUÇÃO DA INFECÇÃO  
VIRAL *IN VITRO* EM ASTRÓCITOS**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**CAMILA DOS SANTOS OLIVEIRA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS DE  
BIOSURFACTANTE ITURINA-NAFAMOSTAT, AÇÃO EM MEMBRANAS  
BIOMIMÉTICAS, MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA E REDUÇÃO DA INFECÇÃO  
VIRAL *IN VITRO* EM ASTRÓCITOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flavia Chiva Carvalho.  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira.  
Coorientador: Prof. Dr. George Augusto Veloso de Oliveira.

**ALFENAS/ MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Oliveira, Camila dos Santos.

Síntese e caracterização de nanopartículas multifuncionais de biossurfactante iturina-nafamostat, ação em membranas biomiméticas, modulação inflamatória e redução da infecção viral in vitro em astrócitos. / Camila dos Santos Oliveira. - Alfenas, MG, 2024.

82 f. : il. -

Orientador(a): Flavia Chiva Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Iturina. 3. Nafamostat. 4. Neuinflamação. 5. Neuroinvasão. I. Carvalho, Flavia Chiva , orient. II. Título.

CAMILA DOS SANTOS OLIVEIRA

"NANOPARTÍCULAS DE BIOSURFACTANTE NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E INFECÇÃO VIRAL EM MODELO IN VITRO DE CÉLULAS GLIAIS: UMA POSSÍVEL ABORDAGEM PARA O TRATAMENTO DAS CONSEQUÊNCIAS NEUROLÓGICAS DA COVID-19"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 05 de dezembro de 2024.

Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. José Mauricio Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto



Documento assinado eletronicamente por **Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2024, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1405333** e o código CRC **0EDD77F1**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo Seu amor incondicional, por me fortalecer diante das dificuldades, por todas as oportunidades concedidas e por cada pessoa colocada em meu caminho para me auxiliar.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, pela oportunidade de realizar este mestrado, pela paciência, dedicação e comprometimento com a pesquisa, bem como por todos os ensinamentos e orientações ao longo dessa jornada.

À minha segunda orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Chiva Carvalho, por aceitar me orientar ao longo do mestrado e por suas valiosas contribuições, sugestões e dedicação, que enriqueceram significativamente esta pesquisa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. George Augusto Veloso de Oliveira, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos essenciais à execução dos experimentos. Sua orientação foi indispensável para o desenvolvimento deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kris Simone Tranches Dias, pela dedicação, pela disposição em ensinar e pelo auxílio nos cultivos celulares e nos ensaios de viabilidade celular.

Ao Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, pelo tempo dedicado a me auxiliar nos ensaios de voltametria cíclica, pelas valiosas sugestões e correções que aprimoraram esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Flávio Protásio Veras, pela atenção, dedicação e ensinamentos essenciais durante os ensaios de inflamação, imunofluorescência e infecção viral in vitro.

Aos meus amigos de laboratório e pesquisa, a doutoranda Jéssica Rodrigues Pedro, o Dr. Milton Kennedy Aquino Júnior, a Dr<sup>a</sup>. Marina Prado Rubinho, a Ms<sup>a</sup>. Letícia Cruz de Almeida Lima e o discente João Augusto Ferreira Gonzaga, pelo apoio, troca de conhecimentos e parceria ao longo dos experimentos.

À minha amiga mestranda Layra Magalhães Arantes, pela amizade e auxílio na minha preparação para as apresentações realizadas durante as atividades do mestrado.

Aos pesquisadores da Universidade Federal de São João Del-Rei, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues, Prof. Dr. Diego Fernandes Lívio, Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro e Prof. Dr. José Antônio da Silva, por suas contribuições à pesquisa e pela síntese do biossurfactante.

À minha família, especialmente aos meus pais, Darci de Oliveira e Nair dos Santos de Oliveira, por sempre confiarem em mim, pelo apoio incondicional e pelos ensinamentos que levarei para toda a vida.

Aos meus irmãos, Eder Santos de Oliveira, Ebert dos Santos de Oliveira e Gabriela Santos de Oliveira, por todo incentivo, apoio e suporte em minhas decisões.

À minha cunhada, Marina Sarto Carlota, pelo apoio, suporte em minhas decisões e por me presentear com o meu afilhado, Gabriel Sarto de Oliveira, que trouxe ainda mais alegria à minha vida.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), que, por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), possibilitou a realização deste mestrado e o desenvolvimento de minhas atividades. Também agradeço à Universidade Federal de São João Del-Rei, pela parceria e pelo suporte à minha pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Speroni Ceron e Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, pelas valiosas observações e contribuições que enriqueceram esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Este trabalho também contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Universidade Federal de Alfenas (Edital PRPPG 02/2020).

A todos, minha mais sincera gratidão. Que Deus abençoe cada um de vocês.

## RESUMO

A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) causada pelo SARS-CoV-2 e suas complicações neurológicas representam um desafio significativo para a saúde pública global. Apesar dos avanços alcançados desde o início da pandemia, a identificação de terapias multifuncionais que possam abordar simultaneamente as manifestações pulmonares e neurológicas da COVID-19 permanece limitada. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que biossurfactantes associados a inibidores de protease exibem potencial antiviral contra o SARS-CoV-2 (patente pendente). Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas (NPs) de biossurfactante iturina contendo o inibidor de protease nafamostat (NPN), avaliar sua interação com o modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM) e investigar seus efeitos em modelos *in vitro* de inflamação e infecção viral em astrócitos. As NPN e NPs de biossurfactante iturina controle (NPC) foram obtidas por microemulsão dupla do tipo água/óleo/água (A/O/A). O tamanho hidrodinâmico e a polidispersão foram analisados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A eficiência de encapsulamento do nafamostat foi calculada através da equação:  $EE (\%) = [(Ct - Cs)/Ct] \times 100$ . O perfil de liberação das NPN foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em intervalos de até 1 à 72 horas. A Interação das NPC com a s-BLM foi investigada por voltametria cíclica. A citotoxicidade foi avaliada em culturas primárias de astrócitos e microglia utilizando o ensaio MTT. Nos ensaios de inflamação, astrócitos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados com NPC e NPN. A liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) foi quantificada por ELISA, enquanto a imunofluorescência foi empregada para avaliar a expressão da proteína fibrilar glial ácida (GFAP). Adicionalmente, a infectividade viral foi avaliada por um modelo pseudotipado de vírus (VSV-SARS-CoV-2-S) em astrócitos tratados, com quantificação da porcentagem (%) de células infectadas pela fluorescência da proteína mCherry. Os resultados indicaram uma eficiência de encapsulamento de nafamostat de 85%, com liberação controlada de 22% a 47% ao longo de 72 horas. As análises de voltametria cíclica sugeriram que as NPC apresentam ação sobre a membrana s-BLM, permitindo a passagem de íons ferricianeto de potássio  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  após 4 à 5 horas de interação com as NPC. A viabilidade celular manteve-se superior a 70% em todas as concentrações testadas. Nos modelos inflamatório, apenas as NPN reduziram a produção de TNF- $\alpha$ , enquanto que para IL-6 tanto NPC e NPN reduziu a citocina. No modelo viral, as NPC reduziram a infectividade do VSV-SARS-CoV-2-S (mCherry) *in vitro* em astrócitos. Conclui-se que, as NPC e NPN de biossurfactante iturina apresentam ação sobre membranas (s-BLM), possui potencial para modular processos inflamatórios *in vitro* em células do sistema nervoso central (SNC), e a presença do biossurfactante iturina em sua composição apresenta potencial para reduzir a infecção viral *in vitro* pelo (VSV-SARS-CoV-2-S). Este trabalho contribui com estratégias inovadoras para entrega de inibidores de protease ao SNC, ampliando suas aplicações em doenças neuroinflamatórias.

Palavras-chave: nanopartículas; iturina; nafamostat; neuroinflamação; neuroinvasão.

## ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) caused by SARS-CoV-2 and its neurological complications represent a significant challenge to global public health. Despite advancements since the onset of the pandemic, the identification of multifunctional therapies capable of simultaneously addressing the pulmonary and neurological manifestations of COVID-19 remains limited. Previous studies from our group have demonstrated that biosurfactants associated with protease inhibitors exhibit antiviral potential against SARS-CoV-2 (patent pending). This study aimed to synthesize and characterize nanoparticles (NPs) of iturin biosurfactant containing the protease inhibitor nafamostat (NPN), evaluate their interaction with a supported lipid bilayer membrane model (s-BLM), and investigate their effects on *in vitro* models of inflammation and viral infection in astrocytes. NPN and control iturin biosurfactant NPs (NPC) were obtained through a double water/oil/water (W/O/W) microemulsion technique. Hydrodynamic size and polydispersity were analyzed using dynamic light scattering (DLS). The encapsulation efficiency (EE) of nafamostat was calculated using the equation:  $EE (\%) = [(C_t - C_s)/C_t] \times 100$ . The release profile of NPN was assessed using high-performance liquid chromatography (HPLC) at intervals ranging from 1 to 72 hours. The interaction of NPC with s-BLM was investigated via cyclic voltammetry. Cytotoxicity was evaluated in primary cultures of astrocytes and microglia using the MTT assay. In inflammation assays, astrocytes stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were treated with NPC and NPN. The release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) was quantified by ELISA, while immunofluorescence was used to assess glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression. Additionally, viral infectivity was evaluated using a pseudotyped virus model (VSV-SARS-CoV-2-S) in treated astrocytes, with quantification of the percentage of infected cells through mCherry fluorescence. The results indicated a nafamostat encapsulation efficiency of 85%, with controlled release ranging from 22% to 47% over 72 hours. Cyclic voltammetry analyses suggested that NPC interact with the s-BLM membrane, allowing the passage of potassium ferricyanide ions  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  after 4 to 5 hours of interaction. Cell viability remained above 70% at all tested concentrations. In the inflammatory model, only NPN reduced TNF- $\alpha$  production, while both NPC and NPN decreased IL-6 levels. In the viral model, NPC reduced VSV-SARS-CoV-2-S infectivity *in vitro* in astrocytes. In conclusion, NPC and NPN of iturin biosurfactant interact with supported lipid bilayers (s-BLM), demonstrate potential for modulating inflammatory processes *in vitro* in central nervous system (CNS) cells, and the presence of iturin biosurfactant in their composition shows promise in reducing *in vitro* viral infection by VSV-SARS-CoV-2-S. This study contributes to the development of innovative strategies for delivering protease inhibitors to the CNS, expanding their applications in neuroinflammatory diseases.

Keywords: nanoparticles; iturin; nafamostat; neuroinflammation; neuroinvasion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de síntese das NPs biossurfactante iturina com inibidor de protease nafamostat.....	37
Figura 2 – Esquema do cultivo celular primário de astrócitos.....	41
Figura 3 – Representação do estímulo inflamatório com LPS em astrócitos por 24h.....	43
Figura 4 – Representação do pré-tratamento realizado com NPs por 48h.....	44
Figura 5 – Representação da montagem das lâminas de imunofluorescênc.....	45
Figura 6 – Representação do pré-tratamento realizado nas células e incubação com o vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S-mCherry .....	47
Figura 7 – Pico de identificação do nafamostat por HPL, com início de identificação no tempo de (7.6 min).....	49
Figura 8 – Curva de calibração realizada com concentrações crescentes do nafamostat na faixa de 0,03 ng a 0,87 ng, identificada por HPLC....	50
Figura 9 – Porcentagem (%) de liberação das NPs biossurfactantes com nafamostat NPN ao longo do tempo de 72 h do ensaio.....	52
Figura 10 – Voltametria cíclica do (a) eletrodo de Pt limpo não modificado pela s-BLM e (b) eletrodo de Pt modificado com s-BLM em solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl (0,1M).....	53
Figura 11 – Voltametria cíclica do eletrodo de Pt modificado com s-BLM em solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCL (0,1M) após interação com NPs biossurfactante iturina 1mg/mL por tempos crescentes de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h .....	54
Figura 12 – Porcentagem (%) de área eletroativa do eletrodo de Pt modificado	

com a s-BLM após interação com NPs biossurfactante iturina controle NPC por tempos crescentes de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h.....	55
Figura 13 – Viabilidade celular em cultura de astrócitos e microglia após tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC em diferentes diluições mg/mL.....	56
Figura 14 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina controle NPC, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de TNF- $\alpha$ a 630nm.....	58
Figura 15 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de TNF- $\alpha$ a 630nm.....	59
Figura 16 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC por 48h e verificação de TNF- $\alpha$ a 630nm.....	60
Figura 17 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN por 48h e verificação de TNF- $\alpha$ a 630nm.....	61
Figura 18 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina controle NPC, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de IL-6 a 630nm.....	62
Figura 19 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de IL-6 a 630nm.....	63

Figura 20 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC por 48h e verificação de IL-6 a 630nm .....	64
Figura 21 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN por 48h e verificação de IL-6 a 630nm .....	65
Figura 22 – Imunofluorescência com marcação para GFAP em astrócitos, utilizando de anticorpo secundário anti-rabbit com fluorescência em verde .....	68
Figura 23 – Imunofluorescência para GFAP em astrócitos com marcação nuclear com DAPI e marcação de membrana fosfolipídica com WGA.....	68
Figura 24 – Infecção viral de astrócitos in vitro após pré-tratamento das células com NPs biossurfactante iturina controle NPC, NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN todos na concentração de 62,5 ng/ml, por 1h .....	70
Figura 25 – Infecção viral de astrócitos in vitro após pré-tratamento das células com NPs biossurfactante iturina controle NPC, NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN em diferentes concentrações ng/mL por 72h .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização das NPs quanto ao seu tamanho e polidispersão, resultados referentes a NPs bio surfactante iturina controle NPC e NPs bio surfactante iturina com nafamostat NPN.....	48
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHE	Barreira hematoencefálica
BV-2	Célula microglial BV-2
C12	Carbono 12
C18	Carbono 18
CCL2	Citocina da família das quimiocinas CC
CD4(+)	Linfócitos T CD4
CD25 (+)	Linfócitos T CD4
CE	Contra eletrodo de Ag/AgCl
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CSF1	Fator Estimulador de Colônias 1
CSF2	Fator Estimulador de Colônias 2
CTD1	Domínio Carboxi-terminal (c-terminal)1
CTD2	Domínio Carboxi-terminal (c-terminal) 2
CXCL5	Quimiocina 5 do motivo CXC
DP	Doença de Parkinson
DA	Doenças de Alzheimer
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLS	Deslocamento de luz dinâmica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium Invitrogen
DMSO	Dimetilsulfóxido

ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
EMCV	Vírus encefalomiocardite murina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FCV	Calicivírus felino
FOXP3(+)	Proteína FoxP3 (+)
GFAP	Proteína Fibrilar Glial Ácida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
HT22	Linhagem Celular do Hipocampo
HSV-1	Vírus Herpes Simples 1
HSV-2	Vírus Herpes Simples 2
hMPV	Metapneumovírus
H7N9	Vírus da Gripe Aviária
KCL	Cloreto de Potássio
NF-kB	Factor Nuclear Kappa B
IFN $\gamma$	Interferon Gama
IC50	Concentração Inibitória Média
IL-1B	Interleucina 1 Beta
IL-6-	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IpA	Área eletroativa
iNOS	Óxido nítrico sintase
IP10	Proteína 10 induzida por interferon- $\gamma$
LM	Lesão medular

LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicoico
TBS	Tris buffered Salina
T98G	Diferenciação astrocitária humana
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA	RNA mensageiro
MOI	Multiplicidade de infecção
MMPs	Metaloproteinase de matriz
MTT	Sal Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NO	Óxido Nítrico
NPs	Nanopartículas
NPC	Nanopartículas Biossurfactante Iturina Controle
NPN	Nanopartículas Biossurfactante Iturina com Nafamostat
NTD	Domínio amino-terminal N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	PBS solução salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PGE-2	Prostaglandina E2
PARs	Receptores ativados por protease acoplada à proteína G
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PDI	Polidispersão
Pt	Platina
PCLS	Fatias de tecido pulmonar de corte de Precisão
RDB	Domínio Receptor de Blindagem
RNA	Ácido Ribonucleico
RE	Eletrodo de referência

RAW 264.7	Linhagem de Macrófago de Camundongos
S	Glicoproteína (S) do SARS-CoV-2
s-BLM	Membrana Lipídica Suportada (s-BLM).
SFB	Soro Fetal Bovino
SFV	Vírus Semilik Forest
SH-SY5Y	Linhagem celular neuronal
SHV-1	Vírus Suid Herpes
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
Size	Distribuição de tamanho
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Tris buffered saline
TGF-B	Fator de Crescimento Transformador Beta
TLRs	Receptores toll-like
TLR4	Receptor toll-like 4
TMPRSS2	Enzima serina protease transmembrana 2
TWEEN 20	Tensoativo hidrofílico Polissorbato
VRS	Vírus Sincicial
VSV	Vírus da estomatite vesicular
VSG4	Bacillus subtilis VSG4
WE	Eletrodo de trabalho/ eletrodo de Pt
WGA	Lectina do Germe de trigo
ONU	Organização das Nações Unidas
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	OBJETIVO.....	20
1.1.1	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>20</b>
1.1.2	<b>Objetivo específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1	NANOPARTÍCULAS E SUA IMPORTÂNCIA.....	22
2.2	BIOSSURFACTANTES E SEU PAPEL EM QUADROS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E QUADROS NEUROLÓGICOS.....	23
2.3	BIOSSURFACTANTE ITURINA FORMAM MICELAS E ATUAM NA ENTREGA DE DROGRAS.....	25
2.4	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-VIRAL DA SURFACTINA.....	26
2.5	INIBIDORES DE SERINO PROTEASE E SEU PAPEL EM QUADROS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E QUADROS NEUROLÓGICOS.....	27
2.6	VÍRUS CAUSADORES DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E INFLAMAÇÕES NO SNC.....	30
2.7	ENTRADA DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS.....	32
2.8	ASTRÓCITOS E MICRÓGLIA COMO CÉLULAS DE DEFESA DO CÉREBRO.....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	MATERIAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	35
3.2	SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BIOSURFACTANTE ITURINA COM INIBIDOR DE PROTEASE NAFAMOSTAT.....	36
3.2.1	<b>Eficiência de encapsulamento.....</b>	<b>37</b>
3.2.2	<b>Deteção e curva de calibração do nafamostat por HPLC.....</b>	<b>38</b>
3.2.3	<b>Estudo de liberação in vitro das NPN.....</b>	<b>38</b>
3.3	INTERAÇÃO DAS NPs BIOSURFACTANTE ITURINA COM O MODELO DE MEMBRANA LIPÍDICA SUPORTADA (s-BLM).....	39

3.4	CULTURA CELULAR.....	40
<b>3.4.1</b>	<b>Cultura primária de astrócitos.....</b>	<b>40</b>
3.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT.....	41
3.6	ATIVAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR LPS.....	42
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	44
3.8	INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS COM O VÍRUS PSEUDOTIPADO (VSV-SARS-CoV-2-S).....	45
3.9	APRESENTAÇÃO E ANÁLISES DE DADOS.....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
4.1	SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BIOSURFACTANTE ITURINA COM INIBIDOR DE PROTEASE NAFAMOSTAT.....	48
<b>4.1.1</b>	<b>Detecção e curva calibração do nafamostat por HPLC.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Eficiência de encapsulamento.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Estudo da liberação in vitro das NPN.....</b>	<b>51</b>
4.2	INTERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS BIOSURFACTANTE ITURINA COM O MODELO DE MEMBRANA BICAMADA LIPÍDICA SUPORTADA (s-BLM).....	53
4.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT.....	56
4.4	ATIVAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR LPS.....	57
4.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	67
4.6	INFECÇÃO VIRAL DE ASTROCITOS COM O VÍRUS PSEUDOTIPADO (VSVS-SARS- CoV-2-S).....	69
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos inflamatórios no sistema nervoso central (SNC) podem ser desencadeados por uma variedade de fatores, incluindo infecções virais e bacterianas, traumas, estresse, toxinas, acúmulo de proteínas mal dobradas, doenças autoimunes e neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Adamu *et al.*, 2024). Durante esses eventos, células gliais, como micróglias e astrócitos, são ativadas, resultando na liberação de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), o que perpetua a inflamação no SNC (Patani; Hardingham; Liddelow, 2023). Quando não controlada, essa resposta inflamatória pode causar danos significativos, contribuindo para a progressão de doenças neurodegenerativas (Adamu *et al.*, 2024).

A entrega de medicamentos ao SNC é um desafio crucial no tratamento de processos neuroinflamatórios, principalmente devido à barreira hematoencefálica (BHE), que protege o SNC contra agentes estranhos, mas também dificulta a entrada de agentes terapêuticos (Claudio *et al.*, 2016). Além disso, fatores como baixa biodisponibilidade e distribuição não específica dos medicamentos complicam ainda mais o tratamento (Claudio *et al.*, 2016). Para ser eficaz, um medicamento não apenas precisa apresentar atividade terapêutica e seletividade, mas também ser capaz de atravessar a BHE (Claudio *et al.*, 2016).

A nanotecnologia surge como uma ferramenta promissora para superar esses desafios. Por meio dela, é possível sintetizar nanopartículas (NPs) projetadas para entregar medicamentos ao SNC, facilitando a passagem pela BHE e permitindo uma ação direcionada em eventos neuroinflamatórios (Sánchez-Dengra *et al.*, 2023).

As NPs possuem dimensões nanométricas (1 nanômetro equivale a 1 bilionésimo de metro) e podem ser preparadas com diversos materiais, como polímeros, lipopeptídeos, lipídios, metais e outros; e podem conter agentes terapêuticos diversos, como fármacos, proteínas ou ácidos nucleicos (Wu *et al.*, 2023). Entre seus benefícios destacam-se a entrega direcionada de medicamentos a células e tecidos-alvo, a redução da exposição de tecidos saudáveis a fármacos e a liberação controlada dos mesmos, diminuindo a quantidade necessária para administração sistêmica (Shah *et al.*, 2015).

As NPs lipopeptídicas, em particular, apresentam potencial para interagir com receptores de lipoproteínas na BHE, facilitando a entrega de drogas ao SNC (Claudio

*et al.*, 2016). A inclusão de surfactantes na composição das NPs aumenta a probabilidade de ultrapassarem a BHE (Claudio *et al.*, 2016).

Um dos avanços mais recentes na área de nanotecnologia é a utilização de biossurfactantes na formulação de NPs. Esses compostos naturais oferecem vantagens em relação aos surfactantes comerciais, que frequentemente apresentam efeitos adversos (Katiyar *et al.*, 2019). Os biossurfactantes melhoram o encapsulamento de fármacos hidrofílicos, potencializam a eficácia terapêutica dos nanossistemas e minimizam efeitos tóxicos (Katiyar *et al.*, 2019). Além disso, possuem propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais (Smith *et al.*, 2020). Estudos apontam que biossurfactantes são capazes de romper cápsulas virais, sugerindo uma possível ação contra o vírus SARS-CoV-2 (Smith *et al.*, 2020)

Entre os agentes terapêuticos que podem ser encapsulados por NPs, o nafamostat destaca-se por seu amplo espectro de ação. Ele é um inibidor de serina protease, capaz de bloquear componentes das cascatas inflamatória e de coagulação (Li *et al.*, 2016). O nafamostat modula vias inflamatórias importantes, como a NF- $\kappa$ B, e inibe o inflamassomo NLRP3, ambos cruciais na neuroinflamação (Li *et al.*, 2016). Além disso, reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios e promove a expressão de fatores anti-inflamatórios (Li *et al.*, 2016).

As serinoproteases têm papel central em doenças inflamatórias degenerativas do SNC, como acidente vascular cerebral, hemorragia intracerebral e esclerose múltipla (Duan *et al.*, 2018). Elas clivam receptores ativados por proteases (PARs), amplamente distribuídos no SNC, ativando vias de sinalização inflamatória (Duan *et al.*, 2018). Durante processos inflamatórios, as serinoproteases liberadas em excesso exacerbam o dano tecidual. Estudos demonstram que o nafamostat reduz a inflamação e a apoptose, promovendo a recuperação funcional em modelos de lesão medular (Duan *et al.*, 2018).

No contexto antiviral, o nafamostat reduz a entrada do SARS-CoV-2 nas células ao inibir a serinoprotease transmembrana-2 (TMPRSS2), essencial para a clivagem da proteína Spike e a infecção do hospedeiro (Hempel *et al.*, 2021). O nafamostat apresenta efeito dose-dependente contra TMPRSS2, sendo promissor no tratamento de infecções por corona vírus, incluindo o SARS-CoV-2, e influenza A (Hempel *et al.*, 2021).

Além de suas propriedades antivirais, o nafamostat apresenta ações anti-inflamatórias e antitrombóticas. Ele apresenta ação antitrombina, antiplasmina e

antitripsina; e é utilizado no tratamento da coagulação intravascular disseminada (CIVD) e da pancreatite (Takahashi *et al.*, 2021). O nafamostat, apresenta ação anti trombina sem causar efeitos hemorrágicos (Takahashi *et al.*, 2021). De acordo com Takahashi *et al.* (2021), o uso combinado de heparina e nafamostat além de ser um tratamento anti-SARS-CoV-2, melhora drasticamente a hipoxemia grave provavelmente causada por CIVD e embolia pulmonar.

Estudos relatam ainda que o nafamostat apresenta ações neuroprotetoras. Em modelos de AVC, reduziu o infarto cerebral, melhorou funções sensório-motoras e protegeu estruturas neuronais (Liu *et al.*, 2017). Apesar dessas evidências, poucos estudos exploraram o uso do nafamostat em modelos de neuroinflamação no SNC.

As NPs lipopeptídicas à base de biossurfactantes representam uma estratégia promissora para facilitar a entrega de inibidores de protease ao SNC. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar NPs lipopeptídicas de biossurfactante iturina contendo o inibidor de protease nafamostat e avaliar seus efeitos em modelos *in vitro* de inflamação por LPS em células gliais. Além disso, investigou-se a interação das NPs biossurfactante iturina em modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM) e seus efeitos na redução da infectividade viral em modelo pseudotipado (VSV-SARS-CoV-2-S) em culturas *in vitro* de astrócitos de ratos neonatos. Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa contribuem com uma nova perspectiva para o tratamento de processos neuroinflamatórios.

## 1.1 OBJETIVO

### 1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de biossurfactante iturina contendo o inibidor de protease nafamostat (NPN), avaliar sua interação com o modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM) e investigar seus efeitos em modelos *in vitro* de inflamação e infecção viral em astrócitos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- a) sintetizar NPs de biossurfactante iturina associada ao inibidor de protease

nafamostat;

- b) caracterizar e analisar a morfologia das NPs por técnicas como de espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- c) caracterizar as NPs quanto à eficiência de encapsulamento e a cinética de liberação dos inibidores;
- d) verificar o potencial das NPs biossurfactante iturina para a formação de canais em modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM);
- e) analisar os efeitos das NPs biossurfactante iturina sobre a viabilidade celular;
- f) analisar os efeitos das NPs sobre a inflamação *in vitro* por LPS em astrócitos, observando sua ação sobre citocinas pró-inflamatórias;
- g) analisar os efeitos das NPs na redução da infecção viral *in vitro* pelo vírus pseudotipado VSV-SARS- CoV-2-S.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 NANOPARTÍCULAS E SUA IMPORTÂNCIA

A nanotecnologia tem sido amplamente explorada em diversas áreas, como as indústrias biomédica, ambiental, agrícola, química e militar. Os nanomateriais apresentam propriedades únicas, incluindo características ópticas, químicas, físicas e biomédicas distintas (Singh *et al.*, 2024).

Na área biomédica, as NPs têm ganhado destaque devido à sua capacidade de superar barreiras significativas, como a entrega terapêutica, uso em imagens médicas, medicina regenerativa e no aumento da solubilidade, direcionamento e biodisponibilidade de medicamentos (Singh *et al.*, 2024)

Por operarem em escala nanométrica, as NPs apresentam tamanhos compatíveis com estruturas celulares importantes. Isso as torna ferramentas promissoras para encapsulamento e direcionamento de agentes terapêuticos (Chauhan, Gaurav *et al.*, 2020). O tamanho reduzido confere uma elevada área superficial, permitindo o encapsulamento de maiores quantidades de medicamentos (Wu *et al.*, 2023). As NPs possibilitam a entrega seletiva e específica ao alvo, aumentam a biodisponibilidade, proporcionam liberação controlada e estabilidade aos medicamentos, além de minimizarem os efeitos colaterais tóxicos (Wu *et al.*, 2023). A funcionalização das NPs com ligantes específicos auxilia na entrada dos medicamentos em órgãos-alvo, promovendo uma liberação precisa e eficiente (Wu *et al.*, 2023).

As NPs também podem ser projetadas para evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico. Propriedades físico-químicas, como tamanho, morfologia, carga superficial, rugosidade e hidrofobicidade, desempenham papéis cruciais na interação com o sistema imunológico e no destino final dos nanomateriais (Singh *et al.*, 2024).

NPs naturais e biomiméticas, como exossomos, lipoproteínas, lipossomas, NPs lipídicas (LNP) e NPs revestidas com membranas celulares, têm sido propostas para facilitar a passagem de agentes terapêuticos pela BHE (Lin; Yu; Gao, 2024). O carregamento de proteínas e peptídeos em NPs protege-os da degradação e depuração (Lin; Yu; Gao, 2024). Modificações com ligantes específicos permitem o direcionamento de proteínas e peptídeos para lesões-alvo (Lin; Yu; Gao, 2024).

As NPs facilitam a passagem de drogas por barreiras epiteliais e endoteliais

(Farokhzad; Langer, 2009). A inclusão de surfactantes em suas formulações aumenta a eficiência na entrega de medicamentos ao cérebro (Battaglia *et al.*, 2018). Além disso, as NPs protegem os fármacos contra degradações biológicas, químicas e do transporte extracelular mediado por proteínas. Segundo Tenchov *et al.* (2021), as NPs são componentes essenciais em terapias modernas, desempenhando papel vital no transporte e proteção do mRNA em vacinas de COVID-19.

Pesquisas evidenciam o potencial das NPs em terapias antivirais. Hu *et al.* (2018) demonstraram a eficácia de inibidores nanoparticulados de V-ATPase contra a influenza. O encapsulamento de inibidores como difilina e bafilomicina em NPs melhorou significativamente a aplicabilidade dessas drogas. Além disso, Vogel *et al.* (2021) investigaram o uso de NPs lipídicas no desenvolvimento de vacinas pré-clínicas (BNT162b1 e BNT162b2) que contêm RNA mensageiro modificado por nucleosídeo para codificar imunógenos derivados da glicoproteína spike (S) do SARS-CoV-2.

Portanto uso de NPs são aplicadas para diversas finalidades e no encapsulamento de diversas drogas. Nesta pesquisa foram sintetizadas e caracterizadas NPs lipopeptídicas de biosurfactante iturina com inibidor de protease nafamostat.

## 2.2 BIOSSURFACTANTES E SEU PAPEL EM QUADROS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E QUADROS NEUROLÓGICOS

Os biosurfactantes são metabólitos secundários produzidos por microrganismos, incluindo bactérias (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Actinobacteria*, *Nocardia*, *Arthrobacter*), leveduras e fungos (*Candida*, *Starmerella*, *Saccharomyces*, *Pseudozyma*) (Kumari *et al.*, 2023). Esses compostos são classificados em glicolipídios, fosfolipídios, lipoproteínas, lipopeptídeos, complexos polissacarídeo-lipídio ou microbianos (Sarubbo *et al.*, 2022). Comparados aos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes apresentam maior segurança, menor toxicidade e melhor biocompatibilidade (Kumari *et al.*, 2023).

Os lipopeptídeos formam o segundo maior grupo de biosurfactantes, sendo produzidos principalmente por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (Vecino *et al.*, 2021). Eles consistem em ácidos graxos (C12-C18) ligados a cadeias peptídicas contendo de 4 a 12 aminoácidos. Podem apresentar uma estrutura

hidrofílica linear ou assumir uma forma cíclica, como ocorre nos lipopeptídeos cíclicos (Vecino *et al.*, 2021).

Entre os principais lipopeptídeos cíclicos estão surfactinas, iturinas, fenicinas, liquenisininas, viscosinas, anfisininas e putisolvinas (Vecino *et al.*, 2021). Essas moléculas possuem propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais e antiplaquetárias, além de potenciais aplicações em terapias trombolíticas e no tratamento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, ao interferirem na agregação do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$  (1-40)) em fibrilas (Zhao *et al.*, 2017).

No estudo de Zhao *et al.* (2017), foi demonstrado que a surfactina pode atuar em terapias trombolíticas de emergência associadas a doenças pulmonares, cardíacas e cerebrais. Em um modelo de embolia pulmonar em ratos, a administração de surfactina em combinação com a prouroquinase aumentou a lise de coágulos plasmáticos (Zhao *et al.*, 2017).

O SARS-CoV-2 induz uma inflamação intensa, com recrutamento de células imunológicas e produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), proteína induzível (IP10) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) (Huang *et al.*, 2020). Biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* apresentam atividade anti-inflamatória, modulando a resposta imune por meio da redução de citocinas pró-inflamatórias e do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (Giri *et al.*, 2016).

A capacidade dos biosurfactantes de formar micelas facilita o encapsulamento de fármacos e sua entrega a locais específicos de infecção (Smith *et al.*, 2020). Em estudos com o biosurfactante VSG 4 de *Bacillus subtilis*, foi observada uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-18 e NF- $\kappa$ B p65, além do aumento de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (Giri *et al.*, 2016).

O trabalho de Selvam *et al.* (2009) mostrou que o *Bacillus subtilis* (PB6), produtor de surfactina, apresenta efeitos anti-inflamatórios em modelos de colite. Animais tratados com PB6 apresentaram redução significativa nos danos ao cólon, manutenção do peso corporal e redução dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ). Além disso, houve aumento dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ , citocinas com atividade anti-inflamatória (Selvam *et al.*, 2009).

Segundo Park *et al.* (2013), a surfactina demonstrou atividade anti-neuroinflamatória em células microgliais BV-2 estimuladas por ácido lipoteicoico

(LTA). A surfactina inibiu a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NF-kB, MCP-1, prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, protegeu células neuronais do hipocampo (HT22) contra toxicidade mediada por microglia ativada (Park *et al.*, 2013).

Biossurfactantes de *Bacillus subtilis*, como iturina e surfactina, têm sido amplamente relatados por sua capacidade de modular citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Neste estudo, foram conduzidos experimentos com NPs lipopeptídicas baseadas em biossurfactante iturina, produzidas por *Bacillus subtilis*, encapsulando o inibidor de protease nafamostat.

### 2.3 BIOSSURFACTANTE ITURINA FORMAM MICELAS E ATUAM NA ENTREGA DE DROGAS

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria não patogênica amplamente distribuída no ambiente, conhecida pela capacidade de produzir surfactantes biológicos, como surfactina, fentromicina e iturina (Yaraguppi *et al.*, 2023). Este microrganismo é utilizado em diversas áreas, incluindo conservação de alimentos, agricultura, pecuária e medicina (Zohora; Oliveira; Rahman, 2016 apud Yaraguppi *et al.*, 2023).

Entre os lipopeptídeos derivados de *Bacillus subtilis*, as iturinas se destacam por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e atividades biológicas diversas. A iturina é um lipopeptídeo cíclico sintetizado por *Bacillus subtilis* e outras cepas bacterianas, abrangendo as variantes A, C, D e E (Yaraguppi *et al.*, 2023).

Esses compostos possuem uma estrutura peptídica cíclica compartilhada, composta por sete  $\alpha$ -aminoácidos e um  $\beta$ -aminoácido. As iturinas apresentam variações no tamanho da cadeia de ácidos graxos, na localização dos aminoácidos e no conteúdo estrutural (Yaraguppi *et al.*, 2023). Entre elas, a iturina A é especialmente notável, caracterizada por um heptapeptídeo cíclico e uma cadeia de ácidos graxos  $\alpha$ -amino contendo 14 a 17 átomos de carbono. Este composto demonstra alta atividade antibacteriana e antifúngica (Yaraguppi *et al.*, 2023).

As iturinas possuem uma ampla gama de aplicações biológicas e industriais. Além das atividades anticancerígenas e hemolíticas, elas podem ser utilizadas na indústria cosmética como emulsificantes, agentes antirrugas e antibacterianos (Oliveira *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006 apud Yaraguppi *et al.*, 2023).

No trabalho de Shekunov *et al.* (2023) foram testados 11 lipopeptídeos

cíclicos, e a iturina apresentou atividade antiviral significativa contra o SARS-CoV-2, interrompendo o processo de fusão entre as membranas viral e celular.

A iturina A é um surfactante e emulsificante altamente eficaz devido à sua estrutura anfifílica. Ela é composta por um anel peptídico hidrofílico e uma cauda hidrofóbica de ácidos graxos, o que facilita a interação com fases aquosas e oleosas, promovendo a formação de emulsões estáveis (Thakur *et al.*, 2020).

Este lipopeptídeo também se destaca no aumento da solubilidade e biodisponibilidade de medicamentos hidrofóbicos, graças à sua capacidade de formar micelas ou vesículas espontaneamente (Chauhan, Vivek *et al.*, 2023). A adição de ligantes ou anticorpos específicos em sistemas de liberação baseados em iturina permite a administração precisa e direcionada de fármacos (Kourmentza *et al.*, 2021).

A produção de NPs utilizando iturina é uma estratégia promissora para diversas aplicações.

#### 2.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-VIRAL DA SURFACTINA

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis*, conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e antivirais. No estudo realizado por Hwang *et al.* (2005), foi demonstrado que a surfactina apresenta atividade anti-inflamatória em células da linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). De acordo com os autores, a surfactina inibiu a expressão de IL-1 $\beta$ , iNOS mRNA e óxido nítrico (NO), indicando seu potencial anti-inflamatório (Hwang *et al.*, 2005).

Zhang *et al.* (2015) também investigaram os efeitos anti-inflamatórios da surfactina em macrófagos estimulados por LPS. O estudo revelou que a surfactina inibiu a expressão de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-6 (IL-6), NO e iNOS. Além disso, o composto regulou negativamente o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) induzido por LPS, reduzindo a ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), um importante mediador inflamatório.

De acordo com Gan *et al.* (2016), a surfactina demonstrou efeitos anti-inflamatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em estudos com camundongos, foi observado que a surfactina inibiu a inflamação crônica em lesões ateroscleróticas, induziu fatores anti-inflamatórios como IgA, TGF- $\beta$  e IL-10 no intestino, e estimulou

a produção de linfócitos T reguladores (CD4+, CD25+, FoxP3+) no baço. Esses fatores contribuíram para a inibição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Os grupos tratados com surfactina apresentaram redução significativa da inflamação crônica, associada a uma diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e aumento de IL-10.

No campo antiviral, Vollenbroich *et al.* (1997) relataram que a surfactina exibe atividade contra diversos vírus envelopados, incluindo o vírus Semliki Forest (SFV), herpes simples (HSV-1 e HSV-2), herpes suíno (SHV-1), estomatite vesicular (VSV), imunodeficiência símia (SIV), calicivírus felino (FCV) e encefalomiocardite murina (EMCV). Os experimentos *in vitro* demonstraram que a surfactina causa uma inativação bifásica dos vírus, promovendo a ruptura da membrana lipídica viral e, parcialmente, do capsídeo viral. Essa atividade é atribuída à interação físico-química entre a surfactina e a membrana lipídica dos vírus (Vollenbroich *et al.*, 1997).

Kracht *et al.* (1999) reforçaram esses achados ao demonstrar que a surfactina, produzida por cepas de *Bacillus subtilis*, é capaz de inativar vírus envelopados como VSV, SFV e SHV-1. Segundo Zhao *et al.* (2017), os lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* exibem atividade antiviral significativa, sendo essa especificidade relacionada à interação com a bicamada lipídica viral. Essa interação altera a permeabilidade da membrana e, em concentrações mais altas, provoca a ruptura do sistema de membranas dos vírus (Kracht *et al.*, 1999).

Huang, Wenjing *et al.* (2018) destacaram que a surfactina, devido às suas propriedades anfipáticas, tem o potencial de se automontar em NPs sob condições específicas, podendo atuar como transportador de fármacos hidrofóbicos. De forma semelhante, os lipopeptídeos à base de iturina, formam micelas que permitem o encapsulamento e liberação controlada de medicamentos (Chauhan, Vivek *et al.*, 2023). Essas características tornam a surfactina e a iturina compostos promissores para aplicações terapêuticas.

## 2.5 INIBIDORES DE SERINO PROTEASE E SEU PAPEL EM QUADROS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E QUADROS NEUROLÓGICOS

A síndrome respiratória aguda causada pelo SARS-CoV-2 e suas consequências neurológicas são um problema de saúde pública. As infecções virais podem contribuir para o aparecimento ou progressão de doenças neurológicas,

proporcionando um risco aumentado para doenças neurodegenerativas (Granhölm, 2023).

As doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA) e esclerose múltipla (EM), são desencadeadas por fatores ambientais e genéticos que agem em conjunto. No entanto, a ação de toxinas virais e bacterianas no SNC gera processos inflamatórios intensos, contribuindo para o avanço das doenças neurodegenerativas (Granhölm, 2023).

O SARS-CoV-2 pode causar efeitos neurológicos diretos devido à entrada do vírus no cérebro ou na medula espinhal, bem como efeitos indiretos devido à resposta imune no corpo ou no cérebro, que levam a patologias no SNC (Granhölm, 2023). A entrada do SARS-CoV-2 nas células ocorre principalmente por meio dos receptores ECA-2, que são carboxipeptidases, com o auxílio da serino protease TMPRSS2. Além das vias aéreas superiores e inferiores, o receptor ECA-2 está presente nas células do SNC, no esôfago, nos enterócitos do íleo, no miocárdio, nos rins e na bexiga (Otfi; Adiga, 2022). De acordo com Petra Tavcar *et al.* (2021), a enzima ECA-2 é expressa em neurônios e células não neuronais, incluindo astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais e pericitos presentes na BHE.

Os inibidores de protease, como o nafamostat, atuam na inibição da TMPRSS2, impedindo que a enzima clive a proteína viral Spike (S) do SARS-CoV-2, reduzindo assim a entrada do vírus nas células que expressam ECA-2 (Hoffmann *et al.*, 2020). O trabalho de Kawase *et al.* (2012) analisou fármacos inibidores de serino protease TMPRSS2, observando a possível capacidade de reduzir a entrada viral. Em seus experimentos, os autores utilizaram células HeLa-ECA-2 ou HeLa-ECA-2-TMPRSS2, realizando o tratamento das células com fármacos inibidores de proteases, como benzamidina, aprotinina, gabexato, camostat e TLCK, por 30 minutos. Em seguida, os vírus pseudotipados SARS-S e Coronavírus Humano (NL63-S) foram inoculados junto aos inibidores de protease. Os resultados demonstraram que o camostat evitou a ativação da proteína viral S na superfície das células, bloqueando a entrada viral do SARS-S e do Coronavírus Humano (NL63-S) em células que expressam TMPRSS2 (Kawase *et al.*, 2012).

No trabalho de Ansarin *et al.* (2020) e Sagawa; Inoue; Takano, (2020), a administração oral de cloridrato de bromexina reduziu a transferência de pessoas para unidades de terapia intensiva, evitando intubação e taxa de mortalidade em

pacientes com COVID-19. O cloridrato de bromexina inibiu a TMPRSS2, evitando a entrada viral nas células e processos inflamatórios subsequentes.

Na pesquisa de Saglam-Metiner *et al.* (2024), o nafamostat inibiu a infecção por influenza A, melhorou a viabilidade celular e reduziu respostas inflamatórias. De acordo com os autores, foram administradas doses seguras de nafamostat, sendo 10  $\mu\text{M}$  para estudos *in vitro* e 22  $\mu\text{M}$  para estudos *ex vivo*, avaliando-se as interações patógeno-hospedeiro. Durante a pesquisa, os autores mediram os níveis de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-2, CCL11 e IFN- $\gamma$ , observando a ação do nafamostat sobre a resposta inflamatória mediada pelo vírus H1N1 em células Calu-3 *in vitro* e em cultura *ex vivo* de fatias de tecido pulmonar de corte de precisão (PCLS) (Saglam-Metiner *et al.*, 2024). Os resultados indicaram que o nafamostat reduziu os níveis de interleucina-6 (IL-6) em células Calu-3 e em tecido pulmonar PCLS em ambos os modelos. O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aumentou significativamente durante a infecção H1N1 + Calu-3; no entanto, a dose de 10  $\mu\text{M}$  de nafamostat foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  (Saglam-Metiner *et al.*, 2024). As expressões de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram em células H1N1 e H1N1+ PCLS em comparação com os controles; entretanto, a administração de nafamostat em modelos *in vitro* e *ex vivo* foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Saglam-Metiner *et al.*, 2024).

As enzimas serina proteases são as proteases mais abundantes no organismo humano. Alterações na atividade das proteases resultam em alterações fisiológicas, como câncer, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias, cardiovasculares e infecções microbianas (Harish; Uppuluri, 2018). As proteases atuam na degradação de proteínas e no reparo tecidual; no entanto, em condições patológicas, promovem a degradação da matriz extracelular das células e de proteínas. Os fragmentos celulares e proteicos são capazes de ativar vias da inflamação por meio dos receptores Toll-like (TLRs), recrutando células imunes (Guo *et al.*, 2024). A ativação de TLRs leva à ativação e ao deslocamento do NF- $\kappa\text{B}$  para o núcleo das células, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Guo *et al.*, 2024). O NF- $\kappa\text{B}$  é frequentemente ativado em pacientes com condições inflamatórias crônicas, como câncer, doenças pulmonares, cardiovasculares, autoimunes, cutâneas e neurodegenerativas. Diversos agentes podem ativar o NF- $\kappa\text{B}$  por meio de vias canônicas e não canônicas (Guo *et al.*, 2024).

Na COVID-19, a via NF- $\kappa\text{B}$  desempenha um papel central, particularmente

nos casos graves. Sua ativação pelo SARS-CoV-2 promove a liberação de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , que são cruciais para a resposta imunológica, mas também estão associadas às tempestades de citocinas em quadros severos (Guo, Qing *et al.*, 2024). Após a infecção inicial, a ativação persistente do NF- $\kappa$ B contribui para inflamações contínuas, danos teciduais e sintomas prolongados, característicos das sequelas pós-agudas da COVID-19 (Guo, Qing *et al.*, 2024)

O nafamostat age ligando-se covalentemente ao sítio ativo de serina proteases. Este composto tem demonstrado eficácia em condições como pancreatite aguda e coagulação intravascular disseminada (Wei; Huang; Jiang, 2024). No estudo de Gupta *et al.* (2010), o nafamostat foi listado entre as pequenas moléculas capazes de inibir a via NF- $\kappa$ B. Além disso, o nafamostat tem evidenciado efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios em doenças do SNC (Chen *et al.*, 2014). Entre suas aplicações, destaca-se a capacidade de melhorar os desfechos neurológicos e promover a regeneração axonal após acidentes vasculares cerebrais (AVC), além de proteger contra a isquemia cerebral aguda por meio da preservação da integridade da BHE (Kwon *et al.*, 2015). Os inibidores de protease desempenham um papel crucial na redução de processos inflamatórios e na desaceleração de doenças neurodegenerativas.

## 2.6 VÍRUS CAUSADORES DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA E INFLAMAÇÃO NO SNC

As infecções virais podem desencadear respostas imunes intensas com sintomas neurológicos a longo prazo. De acordo com Jorgačevski; Potokar, (2023), alguns vírus causadores de síndromes respiratórias agudas são capazes de infectar o SNC, induzindo processos neuroinflamatórios. Esses vírus podem acessar o SNC de diversas formas: cruzando as células endoteliais dos capilares cerebrais, através da barreira BHE entre o sangue meníngeo e o líquido cefalorraquidiano, ou por meio de neurônios periféricos e olfatórios infectados (Jorgačevski; Potokar, 2023).

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um vírus de RNA de fita simples envelopado que pertence à família Pneumoviridae, ordem Mononegavirales. Ele causa infecções no trato respiratório, podendo levar a quadros graves de pneumonia e bronquiolite (Russell *et al.*, 2017). A patologia pulmonar causada pelo VSR compromete a BHE, facilitando a entrada do vírus no SNC (Bohmwald *et al.*, 2021).

O VSR infecta astrócitos, gerando processos inflamatórios prolongados no SNC e aumentando a produção de citocinas, interleucinas e quimiocinas (Bohmwald *et al.*, 2021). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que astrócitos murinos podem ser infectados pelo VSR (Bohmwald *et al.*, 2021)

No trabalho de Arnold *et al.* (2009), o vírus metapneumovírus humano (hMPV) foi identificado nas vias aéreas superiores de crianças que apresentavam convulsões (Arnold *et al.*, 2009). O vírus Influenza também é associado à síndrome respiratória aguda e à infecção no SNC (Franci *et al.*, 2016). De acordo com Ng *et al.* (2018), o vírus Influenza causador da gripe aviária (H7N9) pode infectar astrócitos e células neuronais, resultando em processos inflamatórios. Estudos *in vitro* com células cerebrais humanas mostraram a neuropatogenicidade do vírus da gripe aviária (H7N9). Ng *et al.* (2018) observaram que células astrocitárias humanas (T98G) e células neuronais (SH-SY5Y) podem ser infectadas pelo vírus H7N9 e pelo Influenza A (H1N1).

O SARS-CoV-2, pode desencadear síndrome respiratória aguda e processos inflamatórios intensos. Este é um vírus neurotrópico, capaz de infectar o SNC e causar sintomas como perda de memória, tontura, derrames, psicose, cefaleias, confusão mental, delírios, cognição reduzida e depressão. Esses sintomas neurológicos ocorrem tanto em casos leves quanto graves de COVID-19 (Petra Tavcar *et al.*, 2021). O receptor ECA2, presente nas células endoteliais da BHE, em neurônios e em células gliais (astrócitos, micróglia e oligodendrócitos), facilita a infecção pelo SARS-CoV-2. A morte celular resultante da infecção direta ou indireta das células endoteliais fragiliza as junções da BHE, permitindo a entrada do vírus no SNC (Maliha; Fatemi; Araf, 2024).

Outra via de entrada do SARS-CoV-2 no SNC ocorre através do epitélio olfatório e da cavidade nasal, locais primários de infecção devido à presença do receptor ECA2. As células do epitélio olfatório infectadas liberam o vírus, que penetra na placa cribiforme e alcança o bulbo olfatório, ingressando no SNC (Maliha; Fatemi; Araf, 2024). No cérebro, o SARS-CoV-2 infecta neurônios e células endoteliais da BHE, causando morte celular. Esse processo inicial recruta células imunológicas, que intensificam a fragilidade da BHE, facilitando ainda mais a entrada do vírus no SNC (Maliha; Fatemi; Araf, 2024). Linfócitos e macrófagos que expressam o receptor ECA2 também podem transportar o SARS-CoV-2 ao SNC (Maliha; Fatemi; Araf, 2024). Assim, o SARS-CoV-2 promove a liberação de citocinas e quimiocinas

inflamatórias, alterando a homeostase cerebral e ativando células imunológicas do SNC, como micróglia e astrócitos. Esses eventos resultam em processos neuroinflamatórios intensos (Maliha; Fatemi; Araf, 2024).

Nesta pesquisa, é demonstrada a ação das NPs de biossurfactante iturina combinadas com o inibidor de protease nafamostat na redução da inflamação *in vitro* por LPS em astrócitos, bem como na diminuição da infectividade viral *in vitro* em astrócitos pelo vírus pseudotipado da estomatite vesicular (VSV-SARS-CoV-2-S).

## 2.7 ENTRADA DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples positiva que entra nas células principalmente pela interação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), amplamente expressa em diferentes tecidos do corpo humano. Esse vírus apresenta quatro principais proteínas estruturais: a proteína Spike (S), a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína do núcleo capsídeo (N) (Steiner *et al.*, 2024). A proteína Spike (S) é responsável pela interação com o receptor ECA2 do hospedeiro, permitindo a entrada do vírus nas células (Steiner *et al.*, 2024).

A proteína (S) do SARS-CoV-2 possui dois domínios principais: S1 e S2, que são clivados por furinas. O domínio S1 apresenta o domínio amino-terminal (N-terminal, NTD), o domínio receptor de ligação (RBD), e os domínios carboxi-terminais (C-terminal, CTD1 e CTD2). O RBD é responsável por se ligar ao receptor ECA2, sendo, junto com o NTD, um alvo comum de mutações (Steiner *et al.*, 2024).

O domínio S2 possui um site de clivagem adicional, denominado S2', que, ao ser ativado, expõe o peptídeo de fusão, permitindo que o vírus ancore nas células hospedeiras para a liberação do RNA viral. Dessa forma, a interação entre a proteína (S) e o receptor ECA2 requer uma clivagem adicional no domínio S2' (Steiner *et al.*, 2024). A clivagem desse domínio é realizada por serino protease transmembrana do tipo II (TMPRSS2), processo que permite a fusão do vírus à membrana da célula hospedeira e a subsequente liberação do material genético viral. Quando essa clivagem ocorre, o RNA viral entra diretamente na célula pela superfície (Steiner *et al.*, 2024).

Outra via de entrada do SARS-CoV-2 nas células é a endocitose. Nesse processo, a proteína viral (S) interage com o receptor ECA2, e o vírus é internalizado

em vesículas endossomais. Posteriormente, o vírus é ativado por proteases lisossômicas, como catepsina L e catepsina B. A escolha da via de entrada viral depende do tipo celular: a entrada direta por TMPRSS2 ocorre quando essa enzima está amplamente expressa, enquanto a endocitose ocorre em células com baixa expressão de TMPRSS2, seguida pela ativação do vírus por proteases lisossômicas (Steiner *et al.*, 2024).

Dessa forma, o estudo de inibidores de proteases capazes de inibir TMPRSS2 e as proteases lisossômicas (catepsina L e catepsina B), é de extrema importância. Esses inibidores poderiam contribuir para a redução da entrada viral do SARS-CoV-2 nas células, além de possuírem potencial para atuar sobre processos inflamatórios mediados por vírus e em condições que afetam o SNC.

## 2.8 ASTRÓCITOS E MICRÓGLIA COMO CÉLULAS DE DEFESA DO CÉREBRO

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC e desempenham diversas funções cruciais para a homeostase cerebral. De acordo com (Guo, F.; Ma; Pleasure, 2014), os astrócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da BHE, sendo responsáveis por assegurar a presença de linfócitos e monócitos para proteger o SNC. Além disso, controlam a eficiência da sinalização sináptica e a propagação dos potenciais de ação dos neurônios (Guo, F.; Ma; Pleasure, 2014).

Os astrócitos também desempenham funções imunes inatas e adaptativas, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos, como nucleotídeos virais e lipopolissacarídeos bacterianos, por meio de seus receptores. Além disso, são capazes de induzir a produção de óxido nítrico, moduladores inflamatórios e quimiocinas que atraem células imunes ao SNC (Guo, F.; Ma; Pleasure, 2014).

Durante uma invasão viral no SNC, os astrócitos são frequentemente as primeiras células a serem infectadas após a invasão da BHE (Petra Tavcar *et al.*, 2021). Quando os vírus atingem o cérebro, alteram o metabolismo astrocitário e prejudicam o funcionamento neuronal. No entanto, conforme apontado por Najjar *et al.*, (2020), o dano neurológico causado pelo vírus SARS-CoV-2 é também resultado da inflamação sistêmica induzida pelo vírus. Segundo Steardo; Steardo; Scuderi, (2023), o SARS-CoV-2 desencadeia uma resposta reativa significativa das células gliais. Essas células atuam no controle dos eventos inflamatórios, proteção e

regeneração. Contudo, a maioria dos pacientes não apresenta restauração do estado fisiológico glial, resultando em falhas homeostáticas subjacentes a sintomas neuropsiquiátricos relacionados à COVID-19 (Steardo; Steardo; Scuderi, 2023).

Outra célula crucial no SNC é a micróglia, que desempenha importantes funções imunológicas, respondendo à infecção e inflamação, além de recrutar células de defesa. A micróglia representa cerca de 10 a 20% das células gliais e realiza monitoramento constante do SNC, gerando sinais e parâmetros para informar o estado das células e manter a homeostase do SNC (Hanisch, 2014). Quando há falha na integridade do SNC, inicia-se o processo de ativação microglial. A micróglia possui diversos receptores que auxiliam na detecção de infecções, danos celulares, lesões teciduais, rupturas vasculares e comprometimento da BHE (Hanisch, 2014). Além disso, ela reconhece falhas em atividades neuronais, como níveis anormais de neurotransmissores ou distúrbios iônicos (Hanisch, 2014). Assim, a micróglia desempenha um papel fundamental na detecção de ameaças ou condições neuropatológicas, protegendo e auxiliando nos processos de reparação do SNC (Hanisch, 2014). Embora a ativação microglial seja importante para combater infecções, sua intensificação, seja aguda ou crônica, pode gerar efeitos não benéficos, como processos autoimunes e/ou neurodegenerativos (Hanisch, 2014).

Diante disso, é de grande importância realizar pesquisas sobre astrócitos e micróglia em relação a processos inflamatórios e infecções virais do SNC. Inicialmente, esta pesquisa realizou o cultivo celular *in vitro* de astrócitos e micróglia, conduzindo testes de viabilidade celular. No entanto, ao longo do trabalho, os experimentos foram direcionados apenas aos astrócitos devido à sua abundância no SNC e ao seu rápido crescimento celular.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

A síntese e caracterização das NPC e NPN, foram realizadas no laboratório de Bioquímica e neurociências da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob a orientação do Prof. Dr. George Augusto Veloso de Oliveira. As NPs foram preparadas com biossurfactante bacteriano iturina (patente em processo de redação) e um inibidor de serino-protease comercial mesilato de nafamostat.

O biossurfactante iturina foi produzido e purificado por colaboradores da Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), sendo a equipe composta pelos Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues, Prof. Dr. Diego Fernandes Livio, Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro e Prof. Dr. José Antônio da Silva. O inibidor de protease mesilato de nafamostat (lote 0000179260) foi adquirido da Sigma- Aldrich.

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados no setor de Eletroquímica do laboratório de Bioquímica e neurociências da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob orientação dos pesquisadores Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva e Prof. Dr. George Augusto Veloso de Oliveira. Os lipídios fosfatidilcolina e colesterol, usados na preparação da membrana bicamada lipídica suportada (s-BLM), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A lixa d'água com granulação 1200 utilizada para limpar levemente a superfície do eletrodo de Pt, foram adquiridas em loja de materiais de construção em Alfenas-MG.

O cultivo celular *in vitro* de células gliais, bem como os ensaios de viabilidade celular MTT foram realizados no setor de cultivo celular do laboratório de Bioquímica e neurociências da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira e da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kris Simone Tranches Dias. Os reagentes utilizados para cultivo celular incluíram o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), penicilina-estreptomicina, tripsina-EDTA (0,25%) e soro fetal bovino, todos adquiridos da Thermo Fisher Scientific. O sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H- tetrazólio (MTT) foi obtido da Sigma-Aldrich.

Os ensaios de inflamação, imunofluorescência e infecção viral foram realizados no laboratório de Neuroimunobiologia da Dor (LABNID), localizado na Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, sob a orientação do pesquisador Prof. Dr. Flávio

Protásio Veras, que disponibilizou todos os reagentes e materiais necessários. Portanto, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) de *Escherichia coli*, os reagentes para marcação celular 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e aglutinina do germe de trigo (WGA), bem como os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  (rabbit), anti-IL-6 (rabbit), anti-GFAP e Alexafluor488-anti-rabbit, foram todos cedidos pelo Prof. Dr. Flávio Protásio Veras. Os reagentes 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)(ABTS), avidina, Vectashield, solução tampão salina Tris (TBS), albumina sérica bovina (BSA), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e Tween-20 foram igualmente disponibilizados pelo Prof. Dr. Flávio Protásio Veras. O vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S-mCherry, também foi cedido pelo Prof. Dr. Flávio Protásio Veras do LABNID.

Todos os demais reagentes utilizados, incluindo metanol, clorofórmio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido fórmico e trietilamina, eram de grau analítico.

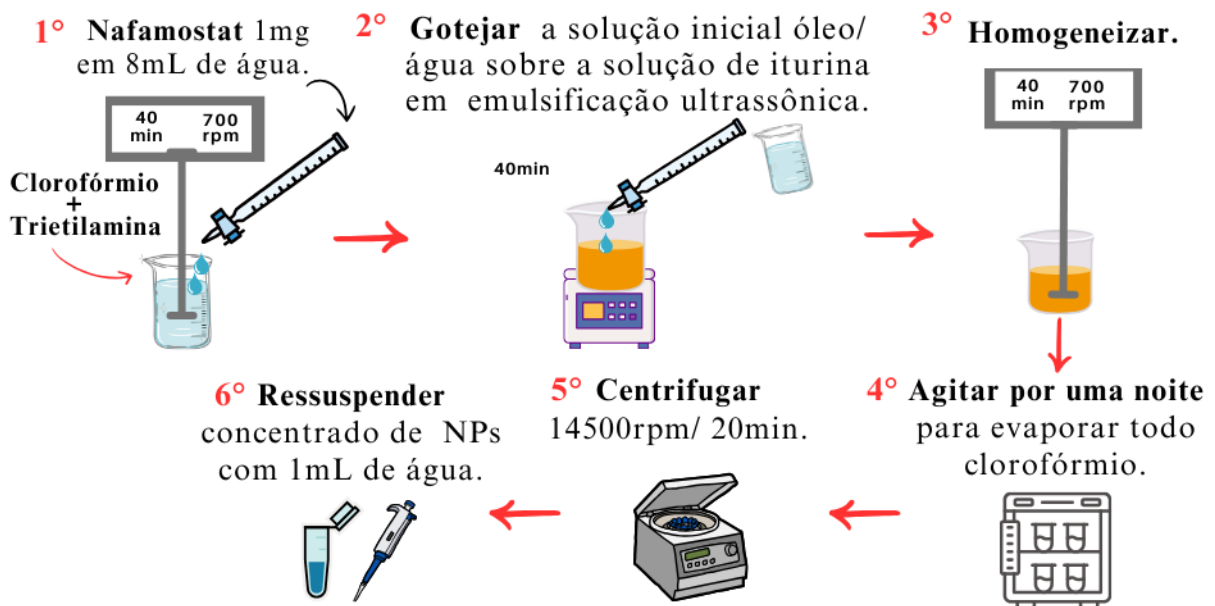
### 3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BLOSSURFACTANTE ITURINA COM INIBIDOR DE PROTEASE NAFAMOSTAT

A síntese das NPs foi realizada por microemulsão dupla do tipo água/óleo/água (A/O/A), conforme descrito por (Huang, Wenjing *et al.*, 2018). Inicialmente, uma solução aquosa do nafamostat (1 mg/mL) foi misturada com excesso de trietilamina (600  $\mu$ L) e clorofórmio (40 mL), formando uma pré-emulsão A/O por agitação durante 40 minutos. Em seguida, a pré-emulsão foi gotejada em uma solução aquosa de iturina (8 mg/mL) sob emulsificação ultrassônica por 40 minutos. Após, a solução foi misturada novamente por mais 40 minutos. Para a remoção da fase orgânica (clorofórmio) a solução de NPs foi incubada em agitação constante (90 rpm), 37°C durante uma noite. Após evaporação do clorofórmio a solução de NPs foram alíquotadas em eppendorfs de 1 mL e foram centrifugadas a 14500 rpm por 20 min, o sobrenadante foi coletado para análise da eficiência de encapsulamento e as NPs foram suspensas em 1 mL de água ultrapura. As NPs contendo apenas iturina (encapsulamento de água) foram produzidas pelo mesmo método, sem a adição de nafamostat.

A distribuição de tamanho (size) e o índice de polidispersão (PDI), foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Soares, 2011). Para caracterização físico química do tamanho das NPs e PDI, 1 mg de cada amostra de NPs foi suspensa em 1mL de água ultrapura e avaliada no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. A Figura 1 apresenta o esquema do processo de síntese das NPs contendo nafamostat.

Figura 1 – Esquema do processo de síntese das NPs biossurfactante iturina com inibidor de protease nafamostat.

### Síntese de NPs Biossurfactante iturina com nafamostat:



Fonte: da autora.

### 3.2.1 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento das NPN foi calculada pela seguinte equação:

$$EE (\%) = [(Ct - Cs)/Ct] \times 100.$$

Onde (Ct) representa a concentração total de nafamostat utilizada no preparo das NPN e (Cs) corresponde à concentração de nafamostat encontrada no sobrenadante das NPs, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC).

### 3.2.2 Detecção e curva de calibração do nafamostat por HPLC

Para a detecção do nafamostat por HPL no equipamento da (SHIMADZU), amostras padrão do nafamostat foram preparadas nas concentrações de (0,5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ ) em metanol. A identificação do nafamostat por HPLC foi conduzida seguindo a metodologia descrita por (ZHANG *et al.*, 2020). A coluna utilizada durante as análises por HPLC, foi uma coluna C18, a eluição escolhida foi (A) ácido fórmico a 0,1% em água purificada e (B) metanol, o volume máximo de injeção foi de 50  $\mu\text{L}$ . Adotou-se a eluição gradiente sendo 100% de ácido fórmico (A) em 23% de metanol (B) aos 10 min, aumentando-se linearmente para 35% (B) aos (15 min) e 55% (B) aos 20 min, se mantendo até ao final da corrida com tempo 28.10 min. A temperatura da coluna foi 29 °C e a taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min.

A curva calibração do mesilato de nafamostat foi realizada na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , os volumes de injeção (2  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ ). A eluição gradiente utilizada na curva calibração foi (A) ácido fórmico a 0,1% em água purificada e (B) metanol.

### 3.2.3 Estudo de liberação *in vitro* das NPN

O estudo de liberação do inibidor de protease nafamostat incorporado nas NPs de biosurfactante iturina foi realizado conforme descrito por (Zu *et al.*, 2016). O tampão utilizado no processo de liberação das NPs foi tampão fosfato de sódio monobásico/dibásico, pH 5,9.

A liberação foi realizada em falcon de 50 mL, foi adicionado 2ml das NPN em 18ml de tampão fosfato de sódio monobásico/dibásico, pH 5,9. Os tubos falcon foram fechados e colocados sob agitação constante a 90 rpm em temperatura de 37°C. Nos intervalos de tempo de (1h, 3h, 12h, 24h, 36h, 48h e 72h) foram coletadas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  das amostras, que foram analisadas por HPLC para a quantificação do nafamostat liberado.

### 3.3 INTERAÇÃO DAS NPs BLOSSURFACTANTE ITURINA COM O MODELO DE MEMBRANA LIPÍDICA SUPORTADA (s-BLM)

Ensaio de voltametria cíclica foram realizados para verificar a interação das NPC com o modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM). Para a realização dos ensaios foi utilizado o sistema potenciostato/galvanostato PG- 39MCSV, Omnimetra Instrumentos Científicos Ltda, conectado a um computador para controle do potencial e aquisição de dados. Os eletrodos utilizados foram eletrodo de referência (RE)/ eletrodo de Ag/AgCl, contra eletrodo (CE)/ eletrodo de carbono e eletrodo de trabalho (WE)/ eletrodo de platina (Pt).

Para verificar a interação de íons ferricianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  presentes na sonda eletroquímica com os eletrodos, foi preparada uma solução sonda com Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl(0,1M) com volume final de 100 mL. Em seguida foram realizadas análises do eletrodo de Pt limpo sem a s-BLM, para isso foram realizados enxague dos eletrodos e o polimento da superfície do eletrodo de Pt com uma lixa D'água de granulação 1200. Em seguida, os eletrodos foram conectados ao sistema potenciostato/galvanostato através de garras e foram posicionados próximos uns aos outros, sendo mergulhados com sua superfície de contato na solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl (0,1M). Foi aplicado um potencial de varredura com janela de 50uA e os resultados foram detectados no computador através do software omnimetra/ PG39M 16CXS 4.0.6 16 bits.

Para análise do eletrodo de Pt com a superfície modificada, foram necessários a preparação da solução de s-BLM. A s-BLM foi preparada com fosfolipídio (fosfatidilcolina) e colesterol, sendo 20:7. Os reagentes utilizados no preparo da s-BLM foram transferidos para um eppendorf de 2ml, foi adicionado 1ml de clorofórmio e foi realizada a homogeneização do eppendorf para dissolver os reagentes. A solução de s-BLM foi armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para verificar a interação das NPC com a s-BLM foi utilizado o eletrodo de Pt, sendo adicionado 10 $\mu\text{L}$  da solução s-BLM na superfície do eletrodo, esperando a evaporação do clorofórmio por 20 segundos. Após, o eletrodo de Pt contendo a s-BLM foi mergulhado em solução de KCl 0,1 M por 40 min.

Para confirmar a formação da membrana s-BLM na superfície do eletrodo, o eletrodo foi mergulhado na solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl

(0,1M) e aplicado o potencial de varredura.

Ao confirmar a formação da s-BLM na superfície do eletrodo de Pt, o eletrodo foi mergulhado em solução NPC na concentração 1 mg/ml por um tempo máximo de 5h. Nos intervalos de tempo de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, o eletrodo de Pt era colocado na sonda eletroquímica juntamente com outros eletrodos, sendo verificado se os sinais de corrente retornavam ao longo do tempo de contato das NPC.

### 3.4 CULTURA CELULAR

#### 3.4.1 Cultura primária de astrócitos

O cultivo primário de astrócitos e microglia foi realizado a partir de hipocampos frescos coletados de ratos neonatos (de 2 a 4 dias), sendo cultivadas em meio de cultura DMEM (*Eagle's minimal essential medium*) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (Penicilina/Estreptomicina). O processo da extração das células e todo projeto foi conduzido de acordo com a orientação e aprovação do comitê de ética para experimentação em animais (CEUA 009/2023). Após estabelecer um cultivo primário, foram realizados subcultivos para garrafas maiores. A Figura 2 exemplifica a realização do cultivo primário de astrócitos.

Logo após o cultivo primário e crescimento celular, foi notado que a maioria das células aderidas ao fundo das garrafas eram astrócitos, enquanto que a microglia e outras células ficavam livres sobre o meio de cultura. O achado está de acordo com o trabalho de Shi *et al.*, (2023), que também verificaram a presença de astrócitos aderidos ao fundo das garrafas e microglia livres sobre o meio de cultura (Shi *et al.*, 2023).

Figura 2 – Esquema do cultivo celular primário de astrócitos.



Fonte: da autora.

### 3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em cultura de astrócitos *in vitro*. O objetivo foi avaliar a citotoxicidade das NPs biossurfactante em células glia, astrocíticas e micróglia. O plaqueamento foi realizado em placas de 96 poços, realizando a incubação por 48h para fixação das células. O tratamento das células foi realizado com meio de cultivo DMEM + solução de NPs biossurfactante.

As NPs preparadas na concentração 5mg/ml, foram diluídas em diluições 1:1 em quintuplicata. A primeira diluição foi realizada da seguinte forma (150  $\mu$ L de NPs + 150  $\mu$ L de meio DMEM), e a partir desta diluição coletamos 150  $\mu$ L e diluímos da mesma forma, sucessivamente. As concentrações de NPs baseada na concentração inicial, foi de 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,62 mg/mL, 0,31 mg/mL e 0,15 mg/ml. O controle positivo foi células + DEMEM, o controle negativo foi somente DEMEM e o controle com DMSO foi (75  $\mu$ L de DMSO e 75  $\mu$ L de DMEM), totalizando 150  $\mu$ L por poço. Após a adição das NPs biossurfactante, a placa foi incubada por 48 horas. Em seguida foi retirado todo meio de tratamento, realizando a lavagem de cada poço com 100  $\mu$ L de PBS filtrado. Logo, às células foram incubadas com

solução (MTT) preparada com DMEM completo na concentração final de 0,5 mg/mL (estoque 5mg/ml em PBS) por 4h. O produto final formazan foi dissolvido em DMSO por 20 minutos, sendo quantificado em absorbância de 540 nm.

### 3.6. ATIVAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR LPS

Ao estabelecer um cultivo primário de astrócitos, as células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (nº 1, 20 mm de diâmetro) em placas de 24 poços, utilizando aproximadamente  $0,5 \times 10^5$  células por poço. A inflamação celular foi induzida por meio da estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (E. coli), seguindo dois protocolos distintos.

No primeiro protocolo, os astrócitos foram estimulados com LPS por 24h e, em seguida, tratados com NPC ou NPN por 48h. O experimento teve uma duração total de 72 horas. Após esse período, o meio contendo os fatores inflamatórios liberados pelas células foi coletado, distribuído em placas de 96 poços e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6.

No segundo protocolo, as células foram primeiramente tratadas com NPC ou NPN por 48h e, posteriormente, estimuladas com LPS por 24h. O experimento também teve uma duração total de 72h, e o meio contendo os fatores inflamatórios foi coletado e armazenado sob as mesmas condições descritas anteriormente.

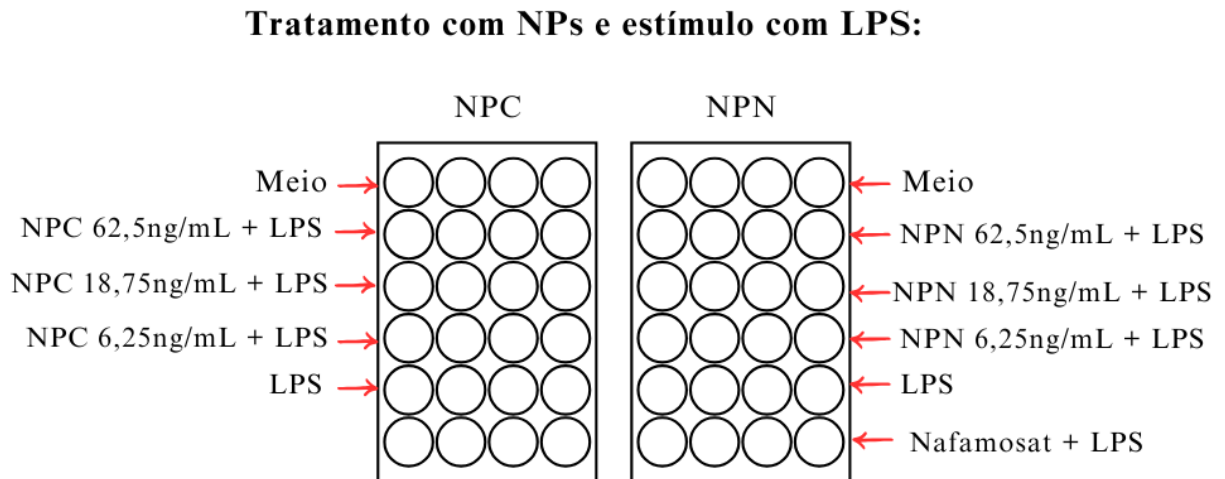
Em ambas as condições experimentais, cada grupo recebeu tratamento em quadruplicata. As Figuras 3 e 4 ilustram, respectivamente, a sequência de tratamento dos astrócitos estimulados inicialmente com LPS e daqueles que receberam primeiro o tratamento com NPC ou NPN. Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,5 ng/mL, além da amostra de nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL.

Para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias, foram utilizados anticorpos de captura e de detecção para TNF- $\alpha$  e IL-6. Os anticorpos de captura foram preparados diluindo-se 50 $\mu\text{L}$  do anticorpo em 5 mL de PBS 1x. Esses anticorpos foram adicionados às placas de 96 poços (50  $\mu\text{L}$ /poço) e incubados por 24h em temperatura ambiente.

A solução de lavagem foi preparada com 1 mL de Tween diluído em 1 L de PBS 1x. Após a incubação, os anticorpos foram descartados e as placas lavadas três vezes com essa solução.



Figura 4 – Representação do pré-tratamento realizado com NPs por 48h.



Fonte: da autora.

Legenda: Ordem do tratamento das placas que receberam primeiro o tratamento com NPs biossurfactante iturina controle (NPC) e NPs biossurfactante iturina com nafamosat (NPN) por 48 h de incubação e, em seguida, o estímulo inflamatório com LPS (1 µg/mL) por 24h.

### 3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

O ensaio de imunofluorescência foi realizado com os astrócitos estimulados do ensaio de inflamação, sendo  $0,5 \times 10^5$  células plaqueadas em placas de 24 poços, sob lamínulas de vidro ( $n^\circ$  1,20 mm de diâmetro). As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) por 30 min, em seguida o PFA foi descartado e foram adicionados 1mL de PBS por poço.

As células passaram por processo de permeabilização, seguido de bloqueio. A permeabilização foi realizada com 200 µL do permeabilizante por 30 min e o bloqueio foi realizado com 200 µL da solução bloqueio por 30 min. Após, a solução bloqueio foi descartada e foram realizadas lavagens com PBS.

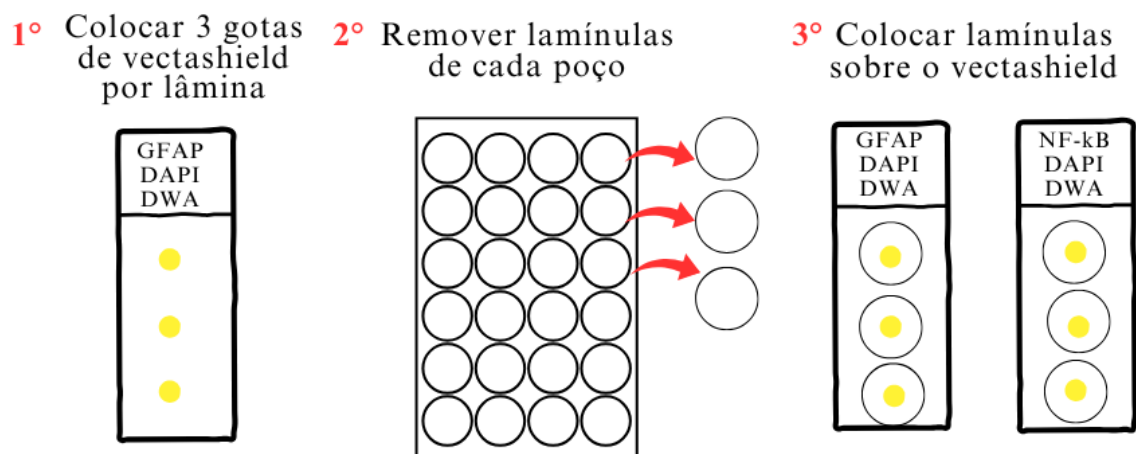
Os anticorpos primários incubados foram (anti-GFAP) para proteína fibrilar glial ácida e (anti- NF-κB) para fator nuclear kappa B. O preparo dos anticorpos primários foi realizado com 6 µL de anticorpo em 1200 µL de solução bloqueio (1:200). Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de anticorpo primário sobre as células, ficando em incubação por 24h (overnight). Os anticorpos primários foram descartados e foi realizada a lavagem dos poços com solução TBS 1 mL por poço, sob agitação por (20 min). Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo

secundário Alexafluor488. O preparo do anticorpo secundário Alexafluor488 anti-rabbit, foi realizado com (2,4  $\mu\text{L}$  de anticorpo em 1000  $\mu\text{L}$  da solução bloqueio). Foram adicionados junto a solução de anticorpo secundário os marcadores celulares, marcador nuclear DAPI (1  $\mu\text{L}$ ) e marcador de membrana fosfolipídica WGA (1  $\mu\text{L}$ ). A solução de anticorpo secundário preparada com (Alexafluor488, DAPI e WGA) foram adicionadas sobre as células, sendo realizada a incubação por 45 min à temperatura ambiente.

Em seguida, foram realizadas a lavagem das células com solução TBS 1 mL por poço, sob agitação por 20 min. Após, as células foram lavadas novamente com 1ml de água por poço, também sob agitação por 20 min. Por fim, foram realizadas as montagens das lâminas de imunofluorescência com o meio de montagem (Vectashield), sendo 10  $\mu\text{L}$  para fixação e conservação das lamínulas. Na Figura 5, representação de como foi realizada a montagem das lâminas de imunofluorescência.

Figura 5 – Representação da montagem das lâminas de imunofluorescência.

### Preparo das lâminas de imunofluorescência:



Fonte: da autora.

### 3.8 INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS COM O VÍRUS PSEUDOTIPADO (VSV-SARS-CoV-2-S)

A infecção viral em astrócitos foi realizada com o modelo viral pseudotipado da estomatite vesicular (VSV-SARS-CoV-2-S) mCherry. Este modelo viral,

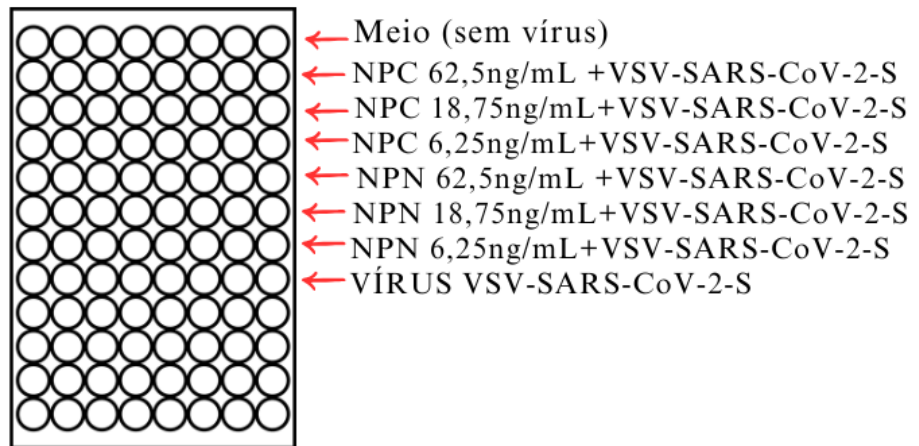
apresenta a proteína (S) do SARS- CoV-2, sendo utilizado como ferramenta de tráfego celular sem nenhum risco de causar processos infecciosos. Neste modelo, o VSV-SARS-CoV-2-S infecta as células e as células passam a expressar mCherry, emitindo fluorescência detectável por fluorimetria.

Os astrócitos foram plaqueados em uma placa de 96 poços, placa de parede preta e fundo transparente. No primeiro ensaio viral, as células receberam o pré-tratamento com NPC e NPN na concentração de 62,5 ng/mL e com o nafamostat na concentração de 62,5 ng/mL, incubação por 1h. No segundo ensaio viral, as células receberam o pré-tratamento com NPC ou NPN nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL, 6,25 ng/mL e com o nafamostat na concentração de 62,5 ng/mL, incubação por 72h. O pré-tratamento com NPC e NPN por 72h foi realizado devido ao processo de liberação lento das NPN. Em seguida foram determinados a multiplicidade de infecção (MOI), para verificar a quantidade de vírus necessários ao experimento. A infecção viral dos astrócitos com o vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S foi realizada segundo o MOI de 0,1. Foi realizado o preparo da solução viral com (1mL do vírus em 4mL de meio demem), em seguida foram adicionados 50 µL do conteúdo viral por poço. A placa ficou em homogeneização horizontal por 2h para que o vírus ficasse sempre em contato com as células, facilitando a infecção. Logo após, o meio viral foi removido ficando somente os vírus que foram capazes de infectar as células. Em seguida, foram adicionados 150 µL de DMEM completo por poço, e as placas foram incubadas por 24h.

Por fim, foi realizada a leitura por fluorimetria com emissão de 583nm e excitação 610 nm no leitor de placas Elisa (Synergy H1 hybride Reader). Na Figura 6, representação do pré-tratamento realizado nas células e a incubação com o vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S-mCherry.

Figura 6 – Representação do pré-tratamento realizado nas células e incubação com o vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S-mCherry.

**Pré-tratamento de astrócitos com NPs e infecção pelo vírus  
VSV-SARS-CoV-2-S**



Fonte: da autora.

### 3.9 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism versão 8.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O grau de significância foi representado pelo asterisco (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BIOSSURFACTANTE ITURINA COM INIBIDOR DE PROTEASE NAFAMOSTAT

Foi realizado o preparo de NPs lipopeptídicas dispersas em solução de biossurfactante iturina conforme descrito nos materiais e métodos. A caracterização das NPs foi realizada por deslocamento de luz dinâmica (DLS) através do equipamento Zeta-nano ZS90, os resultados foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização das NPs quanto ao seu tamanho e polidispersão, resultados referentes a NPs biossurfactante iturina controle NPC e NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN.

<b>NPs</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Polidispersão (PDI)</b>
NPC	442,5 +- 34,5 nm	0,393 +- 0,002
NPN	198,0 +- 16,0 nm	0,231 +- 0,015

Fonte: da autora.

De acordo com os resultados, as NPC apresentaram tamanhos aproximados de 442,5 +- 34,5 nm e polidispersão (PDI) de 0,393 +- 0,002. Enquanto que as NPN, apresentaram resultados de 198,0 +- 16,0 nm e PDI de 0,231 +- 0,015. Ambos resultados foram satisfatórios, no entanto às NPN demonstraram melhores resultados com tamanhos mais reduzidos. A redução no tamanho das NPN pode ter ocorrido devido a interação cátion- $\pi$  entre a trietilamina que possui pK 10,8 e nafamostat que apresenta grupos funcionais que apresenta delocalização eletrônica devido as três ligações de anéis aromáticos. A interação entre trietilamina e nafamostat pode ter favorecido a formação das NPN menores, permitindo melhor estabilização.

De acordo com Chen *et al.* (2004), NPs de 100 à 200 nm apresentam melhor estabilidade na corrente sanguínea e são menos detectadas por células imunológicas (Chen *et al.*, 2004). Quanto menor o tamanho das NPs maior será sua

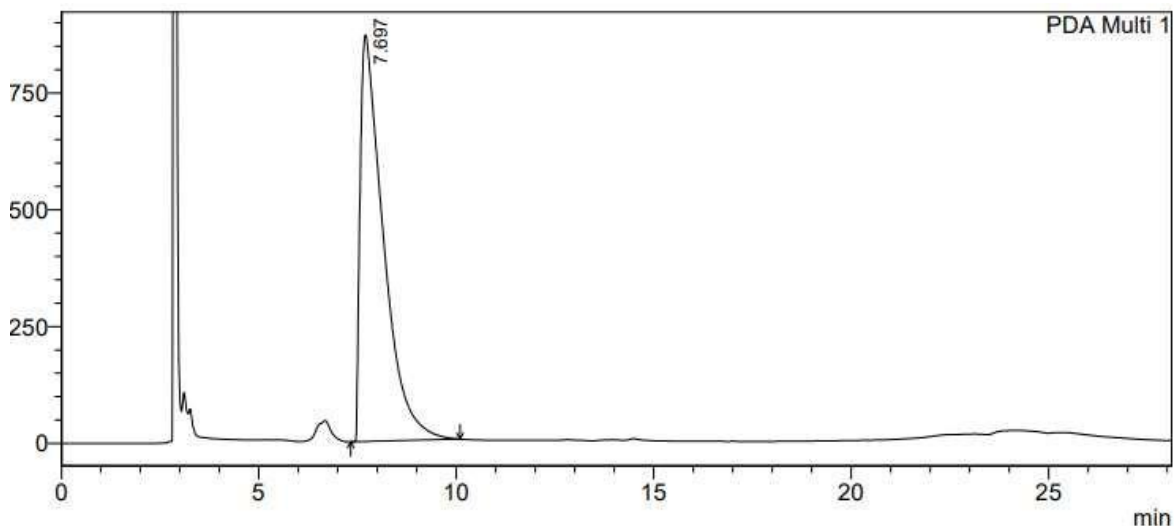
relação superfície-volume, permitindo encapsular e transportar uma quantidade de fármaco maior (Scott, 2011).

A polidispersão (PDI) é um resultado adimensional utilizado como indicativo da distribuição do tamanho das NPs devendo ficar próximo a 0,1, indicando que às NPs estão na mesma faixa de tamanho (Scott, 2011). A redução no tamanho e a presença de biossurfactante em sua composição é uma estratégia importante que auxilia para que as NPs não sejam facilmente removidas da corrente sanguínea por células imunológicas (Claudio *et al.*, 2016).

#### 4.1.1 Detecção e curva de calibração do nafamostat por HPLC

A identificação do nafamostat foi realizada por HPLC, seguindo a metodologia descrita por (Zhang, Yuxin *et al.*, 2020). De acordo com os resultados, o pico de identificação do nafamostat se iniciou no tempo de (7.6 min), de acordo com a Figura 10.

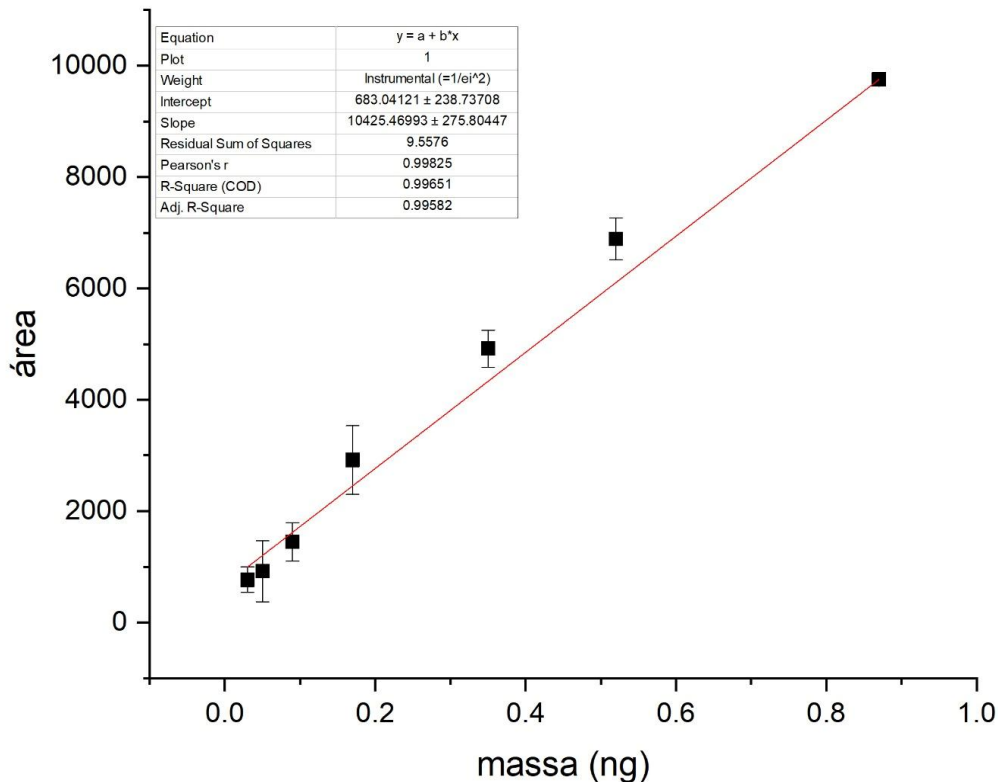
Figura 7 – Pico de identificação do nafamostat por HPL, com início de identificação no tempo de (7.6 min).



Fonte: da autora.

A curva de calibração foi realizada com massa crescentes do nafamostat na faixa de 0,03 ng a 0,87 ng do analito e foi representado na Figura 8. Os resultados permitiram a comparação com os resultados de liberação, visto que as NPs apresentavam baixa concentração do nafamostat, dificultando a sua identificação por HPLC.

Figura 8 – Curva de calibração realizada com concentrações crescentes do nafamostat na faixa de 0,03 ng a 0,87 ng, identificada por HPLC.



Fonte: da autora.

#### 4.1.2 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento das NPN foi calculada através da equação:

$$EE (\%) = [(C_t - C_s)/C_t] \times 100.$$

$$EE(\%) = [(1mg - 0,1414 mg)/1 mg] \times 100$$

A eficiência de encapsulamento (EE) das NPs de biossurfactante iturina contendo nafamostat foi de 85,86%, conforme cálculo realizado. Esse valor indica uma boa eficiência de encapsulamento, demonstrando que o sistema desenvolvido é promissor para a encapsulação do nafamostat.

Na literatura, não foram encontrados estudos relatando especificamente o encapsulamento de nafamostat utilizando NPs de biossurfactante iturina. No entanto,

diferentes estratégias foram empregadas para encapsular o nafamostat em sistemas nanoparticulados, permitindo uma comparação indireta dos resultados.

Reus *et al.* (2023) desenvolveram formulações lipossomais de nafamostat para administração sistêmica e intranasal. Os lipossomas apresentaram tamanhos entre 119 e 147nm, com baixa polidispersão ( $PDI < 0.2$ ), indicando boa homogeneidade. A eficiência de encapsulamento não foi quantificada diretamente, mas a ausência de nafamostat livre no meio de suspensão sugere uma encapsulação eficiente. A principal vantagem da formulação lipossomal foi a melhoria na estabilidade metabólica e química do nafamostat, além do direcionamento eficaz ao tecido pulmonar, principal sítio de infecção pelo SARS-CoV-2 (Reus *et al.*, 2023).

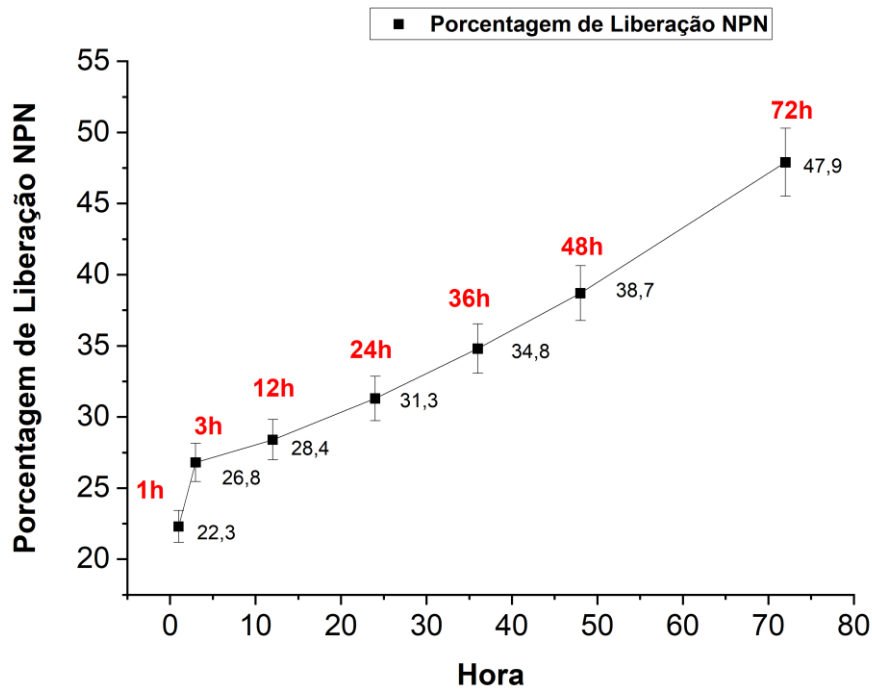
Cho *et al.* (2021) utilizaram um sistema de liberação de fármacos baseado na glicirrizina como carreador para o nafamostat. As NPs obtidas apresentaram tamanho entre 300 e 400 nm, morfologia esférica e estabilidade confirmada por DLS e potencial zeta. A eficiência de encapsulamento do nafamostat nesse sistema foi superior a 90%, conforme avaliação por espectroscopia UV (Cho *et al.*, 2021).

Portanto, de acordo com o resultado obtido a encapsulação do nafamostat em NPs de biossurfactante iturina apresenta uma eficiência comparável aos trabalhos descritos, com valores próximos ao sistema baseado em glicirrizina e possivelmente superiores à formulação lipossomal. Além disso, NPs biossurfactante iturina pode apresentar vantagens em termos de biocompatibilidade e estabilidade.

#### **4.1.3 Estudo de liberação *in vitro* das NPN**

As amostras colhidas do ensaio de liberação realizado com NPN foram identificadas por HPLC os resultados estão demonstrados na Figura 9. O ensaio teve por objetivo definir a porcentagem (%) da liberação do nafamostat ao longo tempo, observando o perfil de liberação das NPs.

Figura 9 – Porcentagem (%) de liberação das NPs biossurfactantes com nafamostat NPN ao longo do tempo de 72 h do ensaio.



Fonte: da autora.

A coleta das amostras em tempos pré-determinados foi essencial para avaliar o tempo necessário para a liberação do nafamostat das NPs em contato com a solução tampão de fosfato de sódio. Os resultados indicam que a liberação ocorre de forma lenta ao longo do tempo e apresenta uma cinética linear após 10h de ensaio. Nos primeiros 60 minutos, 22% do nafamostat foi liberado; em 3h, 26%; em 12h, 28%; em 24h, 31%; em 36h, 34%; em 48h, 38%; e, ao final de 72h, 47% do nafamostat foi liberado. Dessa forma, aproximadamente metade do nafamostat encapsulado foi liberado em 72h, destacando a importância de prolongar o ensaio para avaliar a liberação total do nafamostat ao longo do tempo.

A liberação lenta sugere uma forte interação entre o nafamostat e a iturina, favorecendo uma distribuição controlada e prolongada do fármaco. Além disso, o menor tamanho das NPN, possivelmente decorrente da interação cátion- $\pi$  entre a trietilamina e os anéis aromáticos do nafamostat, pode ter promovido uma melhor estabilização das NPN, contribuindo para uma liberação mais gradual do nafamostat.

Na literatura, não foram encontrados estudos sobre o encapsulamento do nafamostat em NPs de biossurfactantes, especificamente de iturina. Huang,

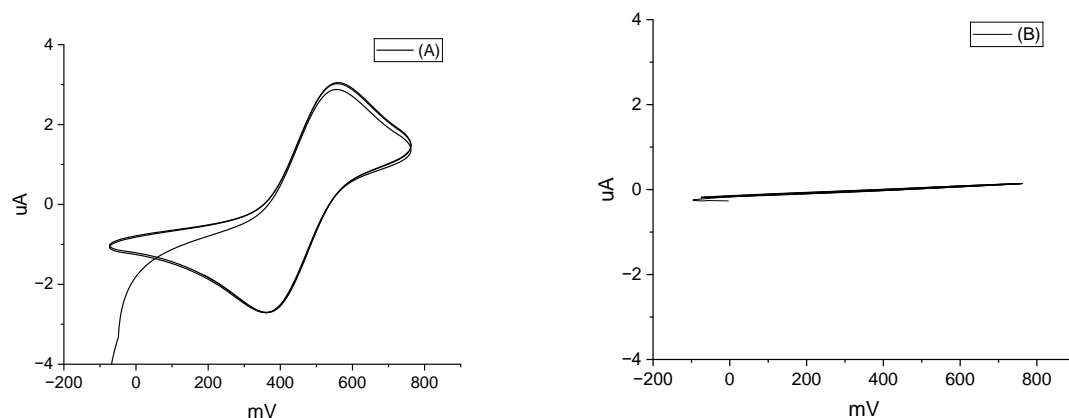
Wenjing *et al.* (2018) relataram que NPs de surfactina, outro biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, liberaram 66,5% da doxorrubicina em 48h, indicando uma liberação mais rápida em comparação às NPs de iturina. Essa diferença pode estar associada às características estruturais dos biossurfactantes e à afinidade específica entre o fármaco e a matriz da NPs. Enquanto a surfactina favorece uma liberação mais rápida, a iturina apresentou um perfil de liberação mais prolongado, o que pode ser vantajoso para aplicações que requerem uma liberação controlada e sustentada do fármaco.

O uso de NPs biossurfactante pode facilitar a passagem das NPs por paredes celulares, tecidos e membranas (Claudio *et al.*, 2016). Assim, as NPs de iturina poderiam favorecer a entrega do nafamostat ao SNC, facilitando sua passagem pela BHE.

#### 4.2 INTERAÇÃO DAS NPs BIOSURFACTANTE ITURINA COM O MODELO DE MEMBRANA LIPÍDICA SUPOSTADA (S-BLM)

As imagens seguir demonstram os resultados da voltametria cíclica do eletrodo de (Pt) em solução Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl (0,1M). A Figura 10 em (A) resposta do eletrodo de Pt não modificado pela s-BLM e em (B) resposta do eletrodo de Pt modificada com a s-BLM.

Figura 10 – Voltametria cíclica do (a) eletrodo de Pt limpo não modificado pela s-BLM e (b) eletrodo de Pt modificada com s-BLM em solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCl (0,1M).



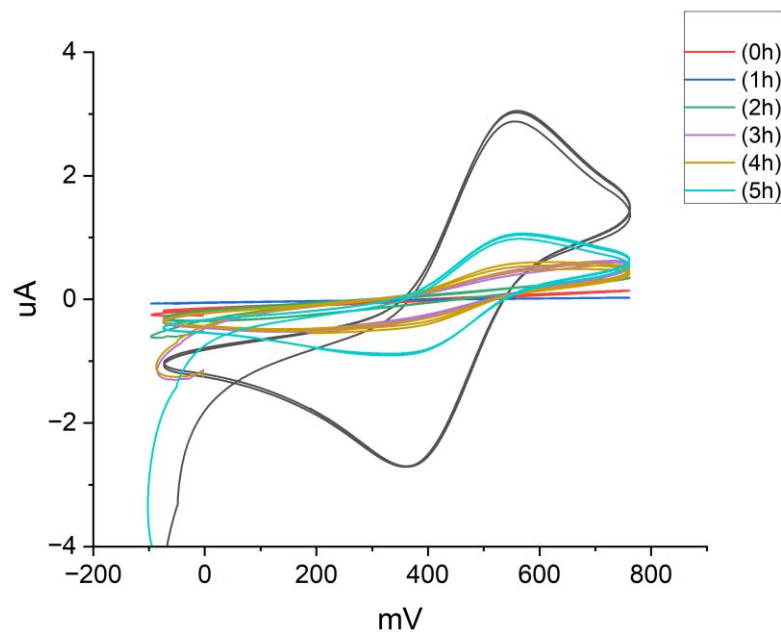
Fonte: da autora.

Portanto, quando o eletrodo de Pt estava limpo sem a s-BLM, a interação dos

íons ferricianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  presentes na sonda com o eletrodo de Pt permitia a formação de um voltamograma cíclico com 100% de detecção dos sinais eletroativos. Quando o eletrodo de Pt apresentava a s-BLM, os íons presentes na sonda não interagem com o eletrodo de Pt, os sinais de corrente eletroativa eram reduzidos não formando o voltamograma cíclico.

Os resultados apresentados a seguir Figura 11 demonstra se a integridade da s-BLM era mantida após interação com NPC 1mg/mL por um período de 0h à 5h.

Figura 11 – Voltametria cíclica do eletrodo de Pt modificado com s-BLM em solução sonda de Ferri/ferrocianeto de K (5mM) em KCL (0,1M) após interação com NPs biossurfactante iturina 1mg/mL por tempos crescentes de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h.



Fonte: da autora.

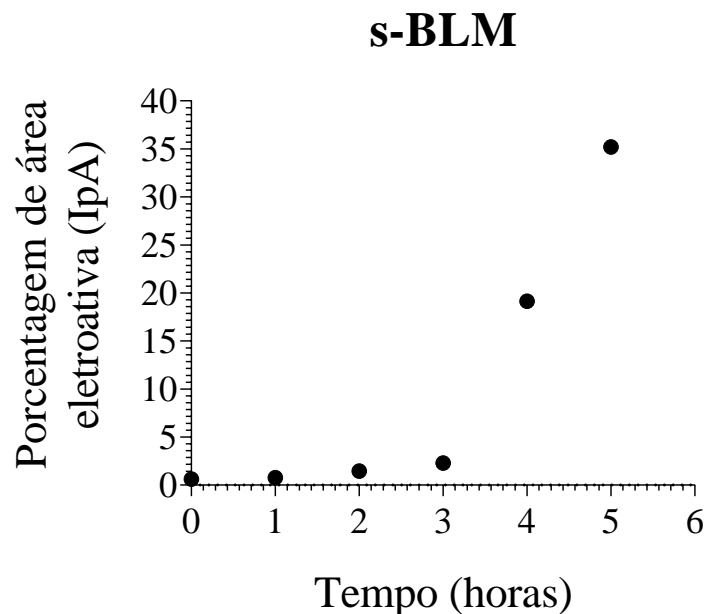
Em 1h de contato das NPC com o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM, os sinais eletroativos não foram detectados e a s-BLM permaneceu formada na superfície do eletrodo. Ao longo de 2h de contato das NPC com o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM, a s-BLM teve uma leve modificação, no entanto os sinais de detecção continuaram baixos. Logo com 3h de contato das NPC biossurfactante iturina com o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM, foi notado que os sinais eletroativos retornavam lentamente.

Após 4h de contato das NPC com o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM, os sinais eletroativos aumentaram mais. O aumento dos sinais eletroativos, foram

mais significativos com 5h de contato das NPC com a s-BLM. No entanto, mesmo com 5h de contato das NPC com a s-BLM, os sinais eletroativos não retornaram completamente quando comparado com a superfície do eletrodo de platina limpo sem a s-BLM.

Na imagem a seguir Figura 12 demonstra a porcentagem (%) de área eletroativa, devido ao tempo de contato com as NPC com a superfície do eletrodo de platina Pt.

Figura 12 – Porcentagem (%) de área eletroativa do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM após interação com NPs biossurfactante iturina controle NPC por tempos crescentes de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h.



Fonte: da autora.

De acordo com a Figura 12, a área eletroativa (IpA) foi maior nos tempos de 4h e 5h de contato com as NPC. Portanto, com 4h o eletrodo de Pt apresentava 19 % de área eletroativa e com 5h cerca de 35% de área eletroativa. Mesmo com 5h de contato das NPC com a superfície do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM, os sinais eletroativos não retornaram completamente, sugerindo que as NPC permitiram a formação de canais na s-BLM.

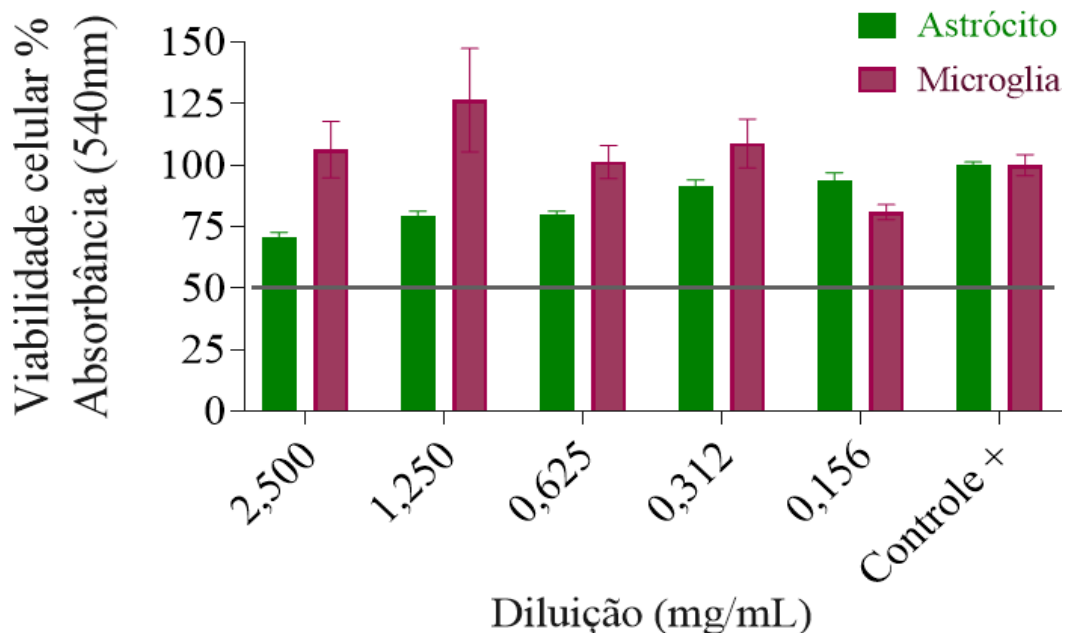
De acordo com o trabalho de Maget-Dana *et al.* (1985), a iturina induz a formação de poros condutores em membranas lipídicas biomoleculares (BLM). Segundo os autores, a membrana plasmática parece ser o alvo principal das iturinas (Maget-Dana *et al.*, 1985)

Os resultados indicam que as NPC poderiam formar canais em modelo de membrana lipídica suportada (s-BLM), permitindo que os íons presentes na sonda entrem em contato com a platina presente na superfície do eletrodo, fazendo com que os sinais eletroativos retornem lentamente. Tendo em vista que as NPS foram desenvolvidas para o tratamento de infecções e processos inflamatórios no SNC, é importante que as NPC tenham a capacidade de formar canais, para que consigam alcançar o SNC. Porém, essa formação de canais deve ser controlada, de forma que a NPs consiga ultrapassar a BHE sem causar danos.

#### 4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT

O ensaio de viabilidade celular MTT foi realizado conforme descrito nos materiais e métodos. Os resultados foram demonstrados a seguir na Figura 13.

Figura 13 – Viabilidade celular em cultura de astrócitos e microglia após tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC em diferentes diluições mg/mL.



Fonte: da autora.

De acordo com os resultados, os astrócitos e microglia permaneceram viáveis quando expostos a diferentes diluições mg/ml das NPs. As células permaneceram com atividade metabólica ativa, sendo capaz de reduzir o sal MTT de coloração amarela a um composto insolúvel de coloração roxa, formando “cristais insolúveis”.

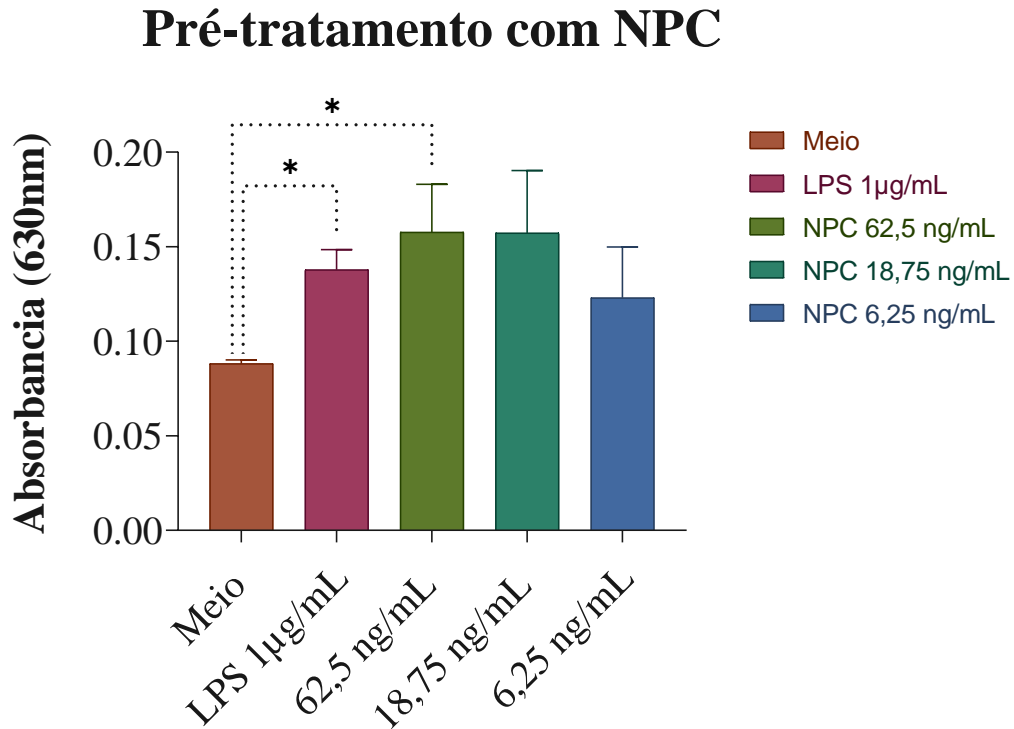
A reação acontece na mitocôndria das células, somente células metabolicamente ativas com atividade mitocondrial estáveis conseguem realizar esta reação. De acordo com os resultados, as NPs não tiveram efeitos na viabilidade dos astrócitos, enquanto para a micróglia, houve uma diminuição de 25% na viabilidade celular para a maior concentração. Entretanto, observa-se que astrócitos e microglia permaneceram com viabilidade celular acima de 70% em diferentes diluições mg/ml das NPs, não atingindo o IC50 concentração capaz de provocar morte em 50% das células, não alterando a viabilidade celular *in vitro* de astrócitos e microglia.

#### 4.4 ATIVAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR LPS

A ativação da inflamação *in vitro* em astrócitos foi realizada conforme descrito na metodologia. O ensaio teve como objetivo estimular o processo inflamatório em cultura *in vitro* de astrócitos e verificar se as NPC e NPN poderiam reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6.

Os astrócitos foram submetidos a dois protocolos de tratamento. No primeiro, as células foram pré-tratadas com NPC ou NPN por 48h, seguidas pela estimulação inflamatória com LPS por 24h. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas. A Figura 14 apresenta os resultados do ensaio com NPC.

Figura 14 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina controle NPC, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de TNF- $\alpha$  a 630nm.

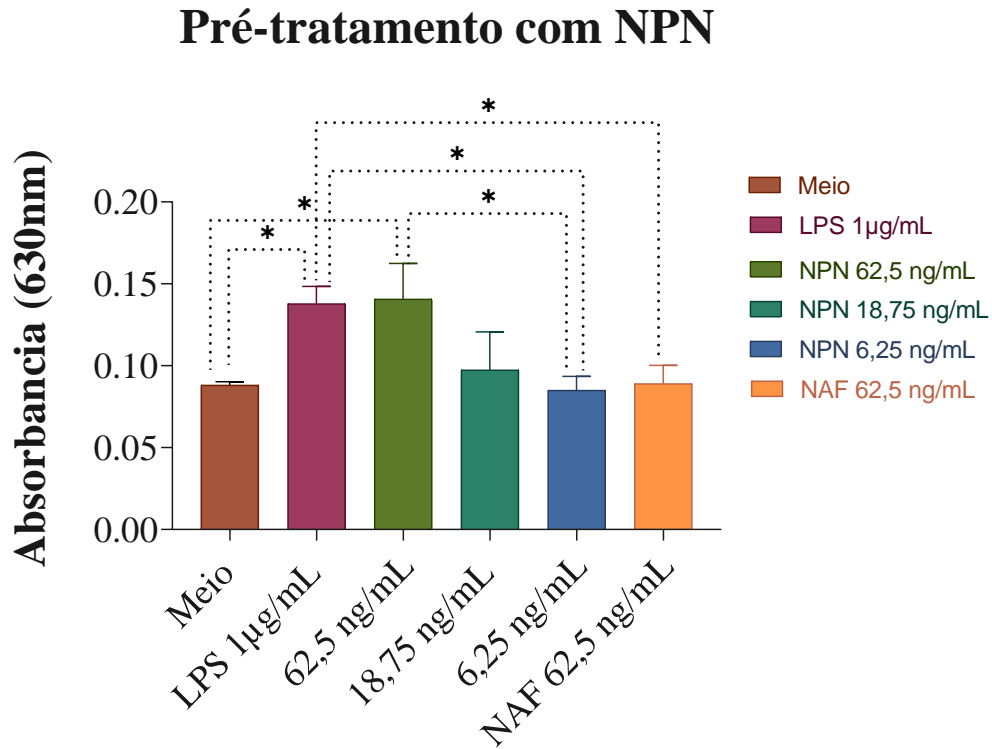


Fonte: da autora.

Legenda: Quantificação de TNF- $\alpha$  em astrócitos pré-tratados com nanopartículas (NPs) biossurfactantes iturina controle (NPC) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL por 48 horas. Após o pré-tratamento, os astrócitos foram estimulados com LPS (1  $\mu$ g/mL) por 24 horas para indução da resposta inflamatória. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas com LPS (1  $\mu$ g/mL). Os gráficos apresentam os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

O tratamento com LPS induziu um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  em relação ao controle sem inflamação ( $p < 0,05$ ). No entanto, o grupo tratado com NPC na concentração de 62,5 ng/mL apresentou um aumento significativo do processo inflamatório ( $p < 0,05$ ). Já as concentrações de 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL não apresentaram diferenças significativas na redução do TNF- $\alpha$ . Assim, o pré-tratamento com NPC por 48h não contribuiu para a redução da inflamação, não apresentando resultados significativos para a redução do TNF- $\alpha$ . A Figura 15 apresenta os resultados do ensaio com NPN.

Figura 15 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs bio-surfactante iturina com nafamostat NPN, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de TNF- $\alpha$  a 630nm.



Fonte: da autora.

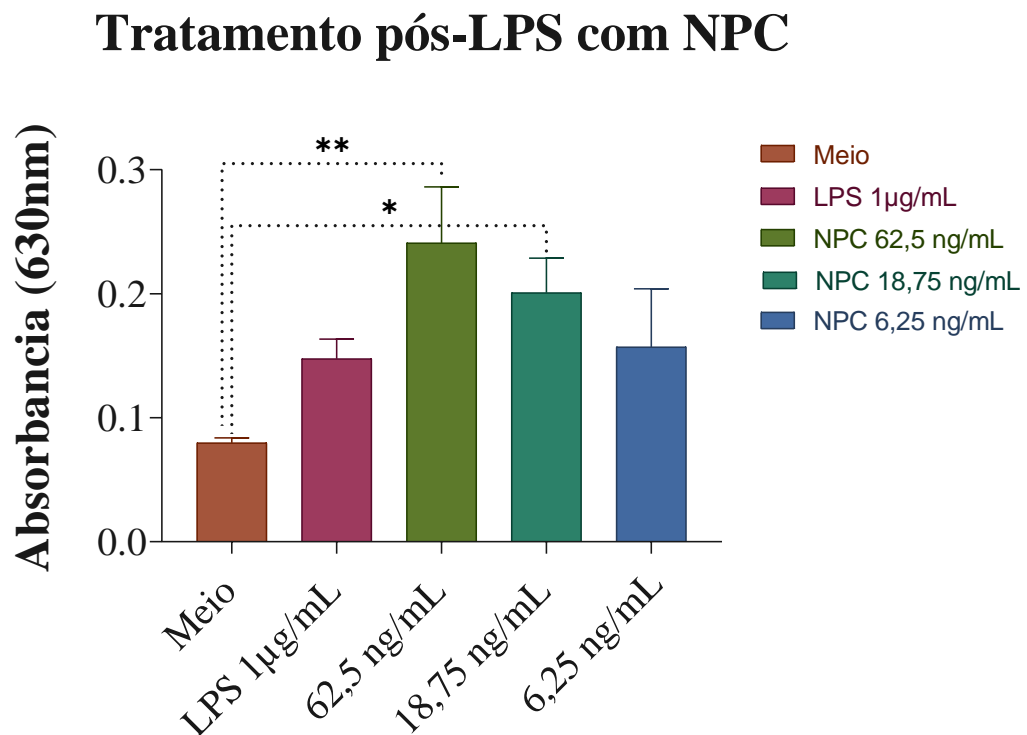
Legenda: Quantificação de TNF- $\alpha$  em astrócitos pré-tratados com nanopartículas (NPs) bio-surfactante de iturina/ nafamostat (NPN) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, além de nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL, por 48 horas. Após o pré-tratamento, os astrócitos foram estimulados com LPS (1  $\mu$ g/mL) por 24 horas para indução da resposta inflamatória. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas com LPS (1  $\mu$ g/mL). Os gráficos apresentam os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

O pré-tratamento das células com NPN mostrou uma redução significativa dos níveis de TNF- $\alpha$ . No entanto, o tratamento com NPN na concentração de 62,5 ng/mL não reduziu a inflamação e, pelo contrário, levou a um aumento do TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). O tratamento com NPN na concentração de 18,75 ng/mL também não mostrou efeitos significativos na redução de TNF- $\alpha$ . No entanto, a concentração de 6,25 ng/mL reduziu significativamente os níveis dessa citocina ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, o nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL também demonstrou uma redução significativa de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

Na segunda abordagem experimental, as células foram inicialmente

estimuladas com LPS por 24h para indução da inflamação, seguidas pelo tratamento com NPC ou NPN por 48 h. A Figura 16 mostra os resultados do ensaio de inflamação realizado com o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento das células com NPC por 48h.

Figura 16 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC por 48h e verificação de TNF- $\alpha$  a 630nm.



Fonte: da autora.

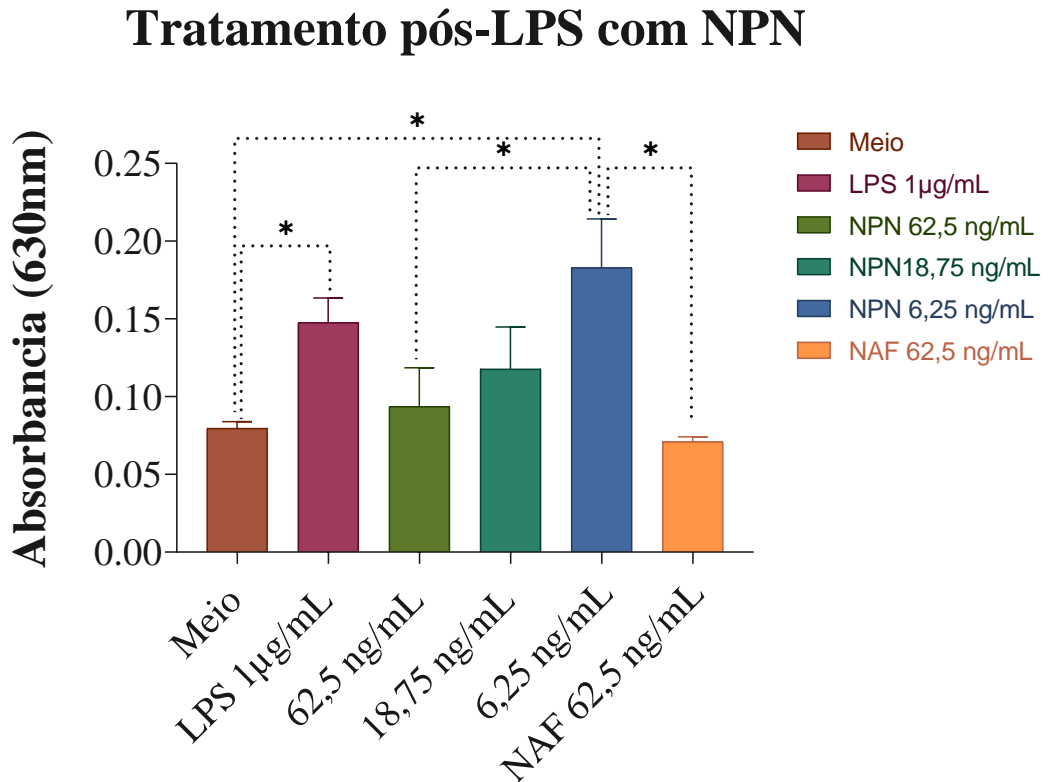
Legenda: Quantificação de TNF- $\alpha$  em astrócitos previamente estimulados com LPS (1  $\mu$ g/mL) por 24 horas, seguidos de tratamento pós-LPS com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina controle (NPC) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, por 48 horas. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas exclusivamente com LPS (1  $\mu$ g/mL). O gráfico apresenta os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

A Figura 16 mostrou que o tratamento pós-LPS com NPC não reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$ . As concentrações de 62,5 ng/mL e 18,75 ng/mL resultaram em um aumento dos níveis dessa citocina pró-inflamatória, enquanto a concentração de 6,25 ng/mL não apresentou resultado significativo.

A imagem a seguir Figura 17 demonstra o resultado do ensaio de inflamação,

onde foi realizado primeiro o estímulo do processo inflamatório com LPS por 24h e, em seguida, o tratamento das células com NPN por 48h.

Figura 17 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN por 48h e verificação de TNF- $\alpha$  a 630nm.



Fonte: da autora.

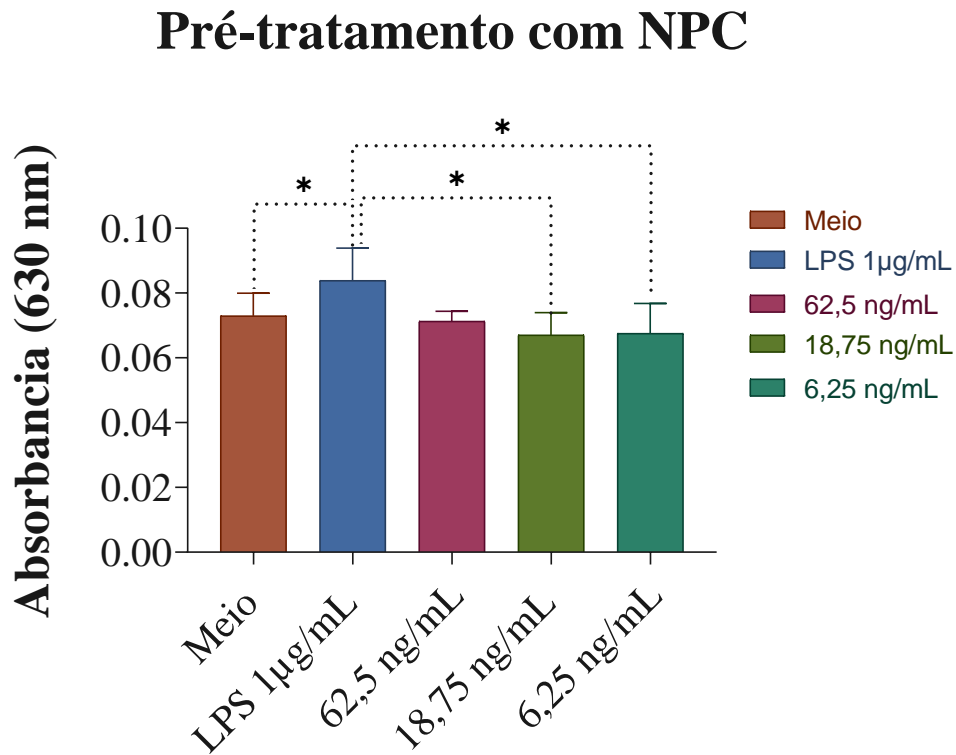
Legenda: Quantificação de TNF- $\alpha$  em astrócitos previamente estimulados com LPS (1  $\mu$ g/mL) por 24 horas, seguidos de tratamento pós-LPS com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina/nafamostat (NPN) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, além de nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL, por 48 horas. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas exclusivamente com LPS (1  $\mu$ g/mL). O gráfico apresenta os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

A Figura 17 demonstrou que o tratamento com NPN pós-LPS resultou em uma redução significativa de TNF- $\alpha$ , especialmente na concentração de 62,5 ng/mL ( $p < 0,05$ ). Embora a concentração de 18,75 ng/mL não tenha mostrado efeitos significativos, observa-se uma tendência de resposta dose-dependente.

Os efeitos sobre a IL-6 também foram analisados. A Figura 18 demonstra o

resultado do pré-tratamento das células com NPC por 48h, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h, sendo realizado a verificação de IL-6 a 630nm.

Figura 18 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina controle NPC, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de IL-6 a 630nm.



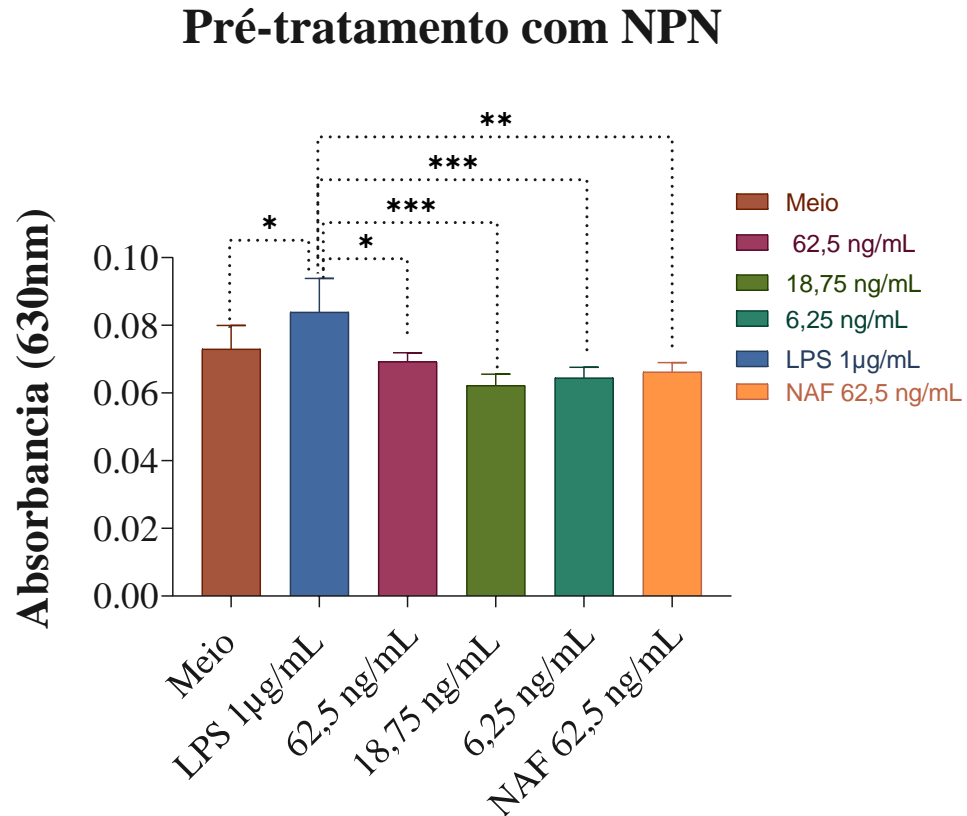
Fonte: da autora.

Legenda: Quantificação de IL-6 em astrócitos pré-tratados com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina controle (NPC) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL por 48 horas. Após o pré-tratamento, os astrócitos foram estimulados com LPS (1 µg/mL) por 24 horas para indução da resposta inflamatória. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas exclusivamente com LPS (1 µg/mL). Os gráficos apresentam os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de IL-6. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

Conforme os resultados apresentados na figura 18, o pré-tratamento com NPC por 48h reduziu significativamente os níveis de IL-6 nas concentrações de 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL ( $p < 0,05$ ).

A Figura 19 demonstra os resultados do pré-tratamento com NPN por 48h, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de IL-6.

Figura 19 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o pré-tratamento das células por 48h com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN, seguido por estímulo inflamatório com LPS por 24h e verificação de IL-6 a 630nm.



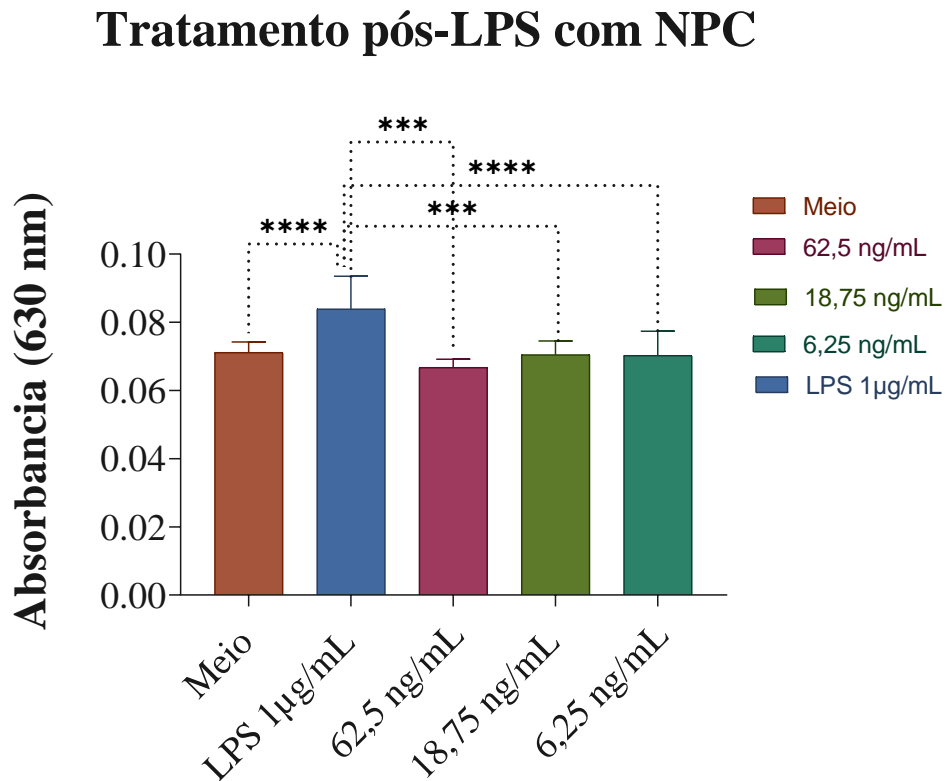
Fonte: da autora.

Legenda: Quantificação de IL-6 em astrócitos pré-tratados com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina/nafamostat (NPN) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, além de nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL, por 48 horas. Após o pré-tratamento, os astrócitos foram estimulados com LPS (1 µg/mL) por 24 horas para indução da resposta inflamatória. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas com LPS (1 µg/mL). Os gráficos apresentam os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de IL-6. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

Conforme apresentado na Figura 19, o pré-tratamento com NPN também resultou em redução significativa de IL-6 em todas as concentrações testadas, com um efeito mais acentuado nas concentrações menores. De acordo com os resultados, o tratamento com NPN na concentração de 62,5 ng/mL demonstrou reduzir IL-6,  $p < 0,05$ . Os tratamentos realizados com NPN nas concentrações mais baixas de 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, demonstrou resultados ainda mais significativos para a redução de IL-6,  $p < 0,001$ . O tratamento com nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL também reduziu significativamente a IL-6 ( $p < 0,01$ ).

A Figura 20 demonstra o resultado do estímulo inflamatório realizado com LPS por 24h, seguido pelo tratamento NPC por 48h e verificação de IL-6.

Figura 20 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina controle NPC por 48h e verificação de IL-6 a 630nm.



Fonte: da autora.

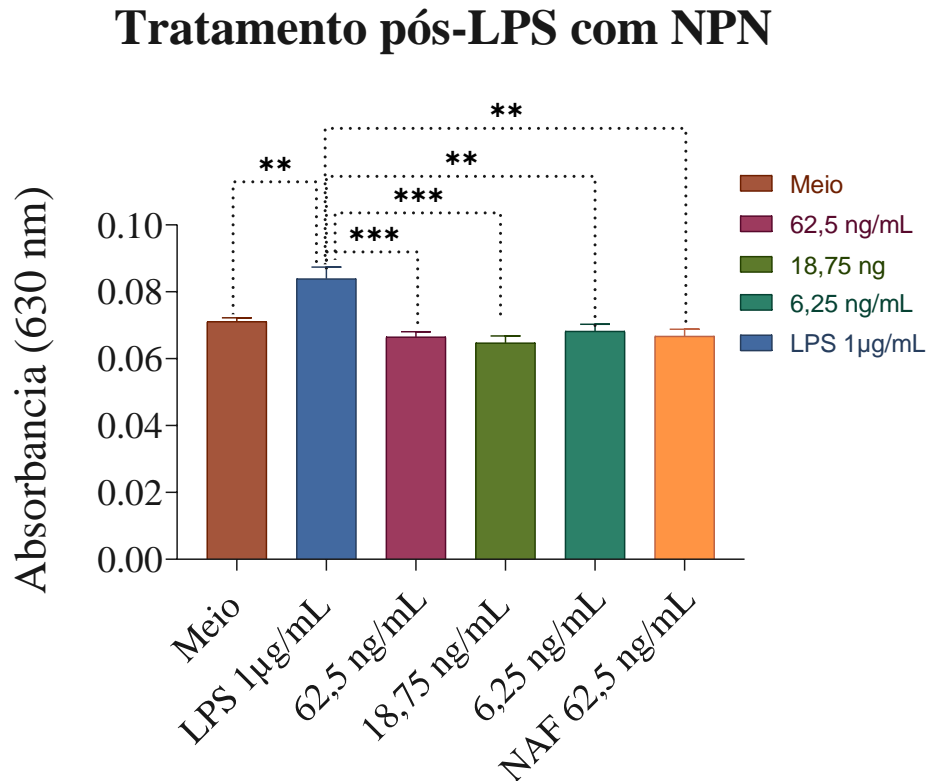
Legenda: Quantificação de IL-6 em astrócitos previamente estimulados com LPS (1 µg/mL) por 24 horas, seguidos de tratamento pós-LPS com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina controle (NPC) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, por 48 horas. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas exclusivamente com LPS (1 µg/mL). O gráfico apresenta os valores de absorbância a 630 nm para a quantificação de TNF-α. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

A Figura 20 mostrou que o tratamento com NPC pós-LPS também resultou em redução significativa dos níveis de IL-6 nas concentrações de 62,5 ng/mL e 18,75 ng/mL ( $p < 0,001$ ), enquanto a concentração de 6,25 ng/mL mostrou um efeito ainda mais expressivo ( $p < 0,0001$ ). Portanto, as NPC também apresentaram redução significativa de IL-6 quando realizado o tratamento pós-LPS.

Na Figura 21 demonstra o resultado do estímulo inflamatório realizado com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPN por 48 h e verificação de TNF-α a

630nm.

Figura 21 – Ensaio de inflamação sendo realizado em primeiro o estímulo inflamatório com LPS por 24h, seguido pelo tratamento com NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN por 48h e verificação de IL-6 a 630nm.



Fonte: da autora.

Legenda: Quantificação de IL-6 em astrócitos previamente estimulados com LPS (1 µg/mL) por 24 horas, seguidos de tratamento pós-LPS com nanopartículas (NPs) biossurfactantes de iturina/nafamostat (NPN) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, além de nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL, por 48 horas. Os grupos controles incluíram células cultivadas apenas com meio de cultura e células tratadas exclusivamente com LPS (1 µg/mL). O gráfico apresenta os valores de absorvância a 630 nm para a quantificação de IL-6. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . O grau de significância foi indicado por asteriscos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

De acordo com os resultados da Figura 21, o tratamento realizado com NPN após o estímulo inflamatório com LPS demonstrou redução de IL-6 em todas as concentrações testadas ( $p < 0,001$  para 62,5 ng/mL e 18,75 ng/mL e  $p < 0,01$  para 6,25 ng/mL e nafamostat puro).

Portanto, os ensaios inflamatórios realizados com LPS em cultura *in vitro* de astrócitos permitiram a avaliação dos efeitos das NPC e NPN sobre os níveis de

TNF- $\alpha$  e IL-6. As NPC não foram eficazes na redução de TNF- $\alpha$ , independentemente do protocolo utilizado. No entanto, as NPN e o nafamostat puro demonstrou resultados significativos na redução de TNF- $\alpha$ . Em relação à IL-6, tanto NPC quanto NPN demonstrou efeitos positivos na redução dos níveis da citocina em ambos os protocolos. Apesar da ausência de efeito significativo das NPC sobre TNF- $\alpha$ , elas apresentaram uma ação importante na redução da IL-6. Por outro lado, as NPN se destacaram com a redução significativa de TNF- $\alpha$  e de IL-6.

Na literatura, não foram encontrados estudos específicos sobre o encapsulamento do nafamostat em NPs de biossurfactantes, especialmente de iturina. Entretanto, pesquisas anteriores fornecem evidências que corroboram os efeitos observados em nosso estudo.

Altin-Celik *et al.* (2024) investigaram os efeitos dos biossurfactantes Iturina A e Gramicidina A em células de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), observando propriedades antiproliferativas, anti-inflamatórias e antitumorais. Os biossurfactantes induziram apoptose nas células tumorais, aumentando a expressão do gene pró-apoptótico BAX e reduzindo o gene antiapoptótico BCL2. Além disso, regularam a expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, incluindo IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e VEGF, sugerindo um efeito anti-inflamatório significativo. Esses achados reforçam que nossas NPs preparadas com biossurfactante iturina pode contribuir para a modulação da resposta inflamatória.

Duan *et al.* (2018) analisaram o efeito do nafamostat na lesão medular (LM) e destacaram seu potencial neuroprotetor, principalmente devido à sua atividade anti-inflamatória. O tratamento com nafamostat reduziu significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, além de diminuir a apoptose, conforme evidenciado por coloração TUNEL e expressão de caspase-3 e Bcl-2. O nafamostat também reduziu a expressão de trombina na medula lesionada e aumentou os níveis de neurotrofinas, sugerindo um efeito protetor contra os danos inflamatórios. Esses achados estão alinhados com os nossos resultados, onde o nafamostat puro e as NPN com nafamostat demonstraram redução de TNF- $\alpha$  e IL-6, reforçando seu potencial anti-inflamatório.

Niemeyer *et al.* (2022) relataram que o nafamostat inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias em epitélios bronquiolares humanos mucociliados, com reduções significativas na secreção de CXCL5 e Fator Estimulador de Colônias 1 (CSF1) após o tratamento ( $P < 0,01$ ). Outras três quimiocinas, MCP1, CSF2 e Matrix

Metalopeptidase 2 (MMP1), também tiveram níveis reduzidos, reforçando o efeito anti-inflamatório do nafamostat. Essa observação complementa nossos achados, onde o nafamostat encapsulado em NPN demonstrou uma ação anti-inflamatória, bem como o nafamostat puro.

Por fim, Yates *et al.* (2022) investigaram o efeito do nafamostat em um modelo de inflamação induzido pelo agonista TLR7/8 R848, observando uma redução significativa da inflamação hepática por meio da diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Apesar de não ter alterado a produção de citocinas no pulmão ou no cérebro, o nafamostat foi eficaz na restauração dos leucócitos circulantes esgotados pelo R848. Esses resultados reforçam a capacidade do nafamostat de modular processos inflamatórios sistêmicos e corroboram nossos achados quanto à sua ação anti-inflamatória.

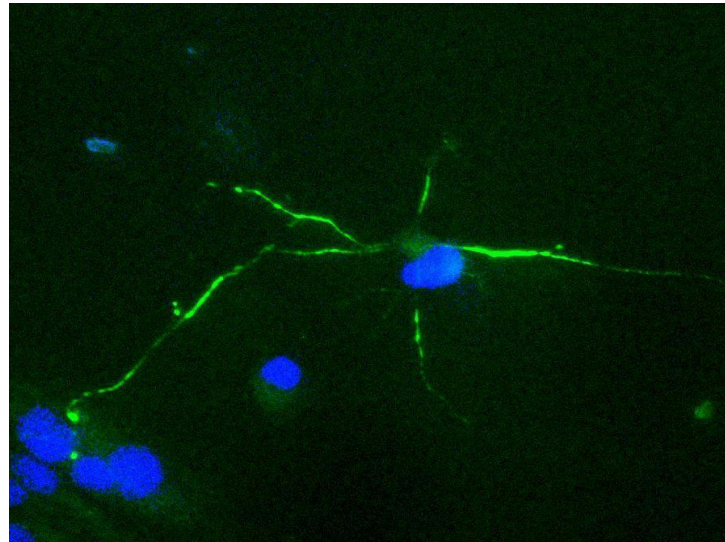
A literatura aponta que tanto a iturina e o nafamostat possuem propriedades anti-inflamatórias, sugerindo que a combinação desses compostos pode ter um efeito benéfico em processos inflamatórios. Nossos achados ampliam o conhecimento sobre o uso de NPs de biossurfactantes iturina como veículos de fármacos anti-inflamatórios, abrindo novas perspectivas para o tratamento de condições neuroinflamatórias.

#### 4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

O anticorpo primário GFAP, conjugado a um anticorpo secundário fluorescente, permite a caracterização da estrutura morfológica dos astrócitos (Nazli *et al.*, 2023). Além disso, a marcação para GFAP pode indicar astrogliose reativa em processos inflamatórios (Rauf *et al.*, 2022).

As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados da imunofluorescência realizada para GFAP em astrócitos.

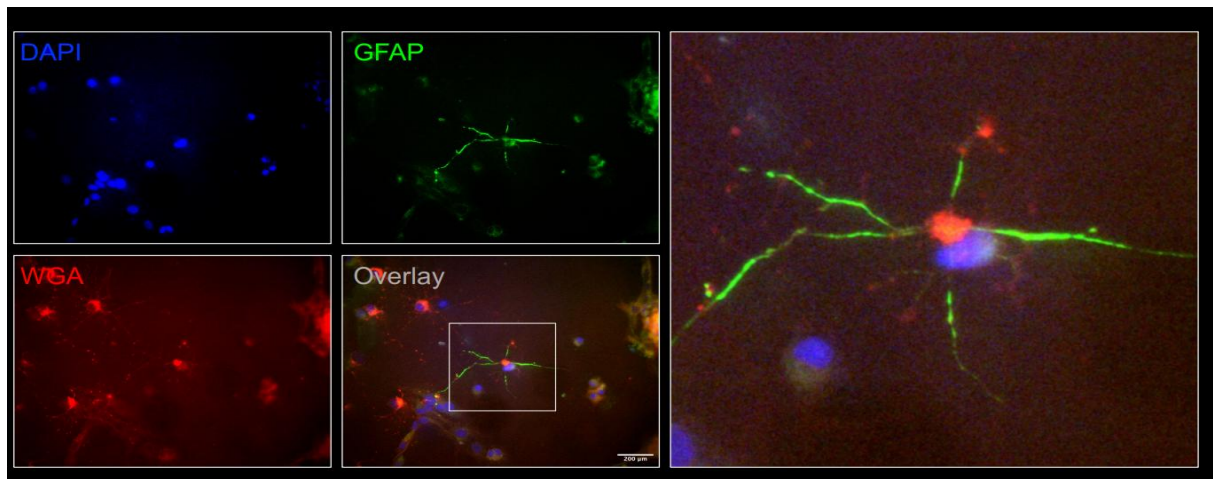
Figura 22 - Imunofluorescência com marcação para GFAP em astrócitos, utilizando de anticorpo secundário anti-rabbit com fluorescência em verde.



Fonte: da autora.

Legenda: Imagem de microscopia confocal de astrócitos com marcação de astrócitos através da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (verde) e marcação do núcleo da célula com DAPI em (azul). Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Figura 23 – Imunofluorescência para GFAP em astrócitos com marcação nuclear com DAPI e marcação de membrana fosfolipídica com WGA.



Fonte: da autora.

Legenda: Imagem de microscopia confocal mostrando sobreposição (overlay) dos marcadores fluorescentes. GFAP (verde) marcação de astrócitos, WGA (vermelho) marcação da membrana fosfolipídica e DAPI (azul) marcação dos núcleos celulares. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Os resultados obtidos demonstram que GFAP marcou a morfologia dos astrócitos, DAPI marcou os núcleos celulares, e WGA permitiu a visualização da membrana fosfolipídica. Esses achados confirmam que os ensaios foram conduzidos

em culturas de astrócitos.

A via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um dos principais mecanismos envolvidos na reativação dos astrócitos. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição chave, que é translocado para o núcleo durante processos inflamatórios em astrócitos reativos (Hyvärinen *et al.*, 2019).

O LPS utilizado nos ensaios de inflamação desta pesquisa é capaz de induzir uma resposta inflamatória *in vitro* em astrócitos e microglia (Shi, Fu Dong, 2015). Astrócitos expressam receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, como os receptores Toll-like (TLRs). O LPS, ao se ligar ao TLR4, pode ativar vias de sinalização que culminam na ativação do NF- $\kappa$ B, levando à sua translocação nuclear e consequente indução da expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Luo *et al.*, 2023).

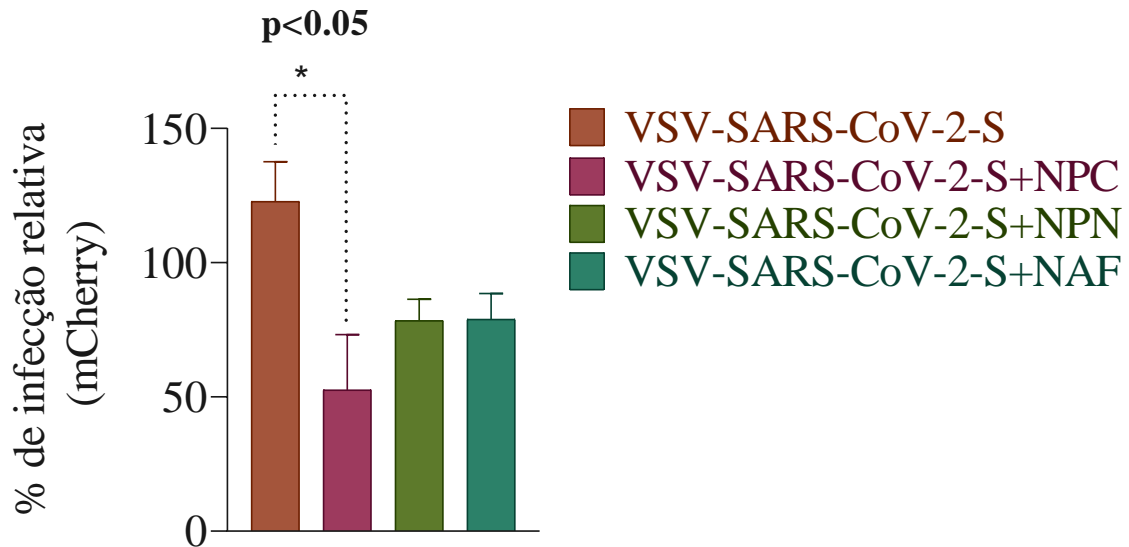
Além disso, a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B em astrócitos pode ser estimulada por diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, espécies reativas de oxigênio (ROS), mielina fagocitada, ativação de TLRs, além de esfingolipídios como esfingosina-1-fosfato e lactosilceramida (Luo *et al.*, 2023).

Portanto, os ensaios de imunofluorescência realizados confirmam a marcação específica para GFAP. Como etapas futuras, pretende-se aprofundar a análise da morfologia astrocitária e investigar possíveis alterações na expressão e translocação do NF- $\kappa$ B em resposta ao tratamento com NPs.

#### 4.6 INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS COM O VÍRUS PSEUDOTIPADO (VSV-SARS-CoV-2-S)

A infecção viral de astrócitos *in vitro* com o vírus VSV-SARS-CoV-2-S foi realizada conforme descrito nos materiais e métodos. A Figura 24 ilustra o resultado da infecção viral de astrócitos *in vitro* após o pré-tratamento das células com NPC e NPN na concentração de 62,5 ng/mL, durante uma hora. Os resultados foram analisados por fluorimetria e expressos como a porcentagem relativa de infecção mCherry nas células.

Figura 24 – Infecção viral de astrócitos *in vitro* após pré-tratamento das células com NPs bio-surfactante iturina controle NPC, NPs bio-surfactante iturina com nafamostat NPN todos na concentração de 62,5 ng/ml, por 1h.



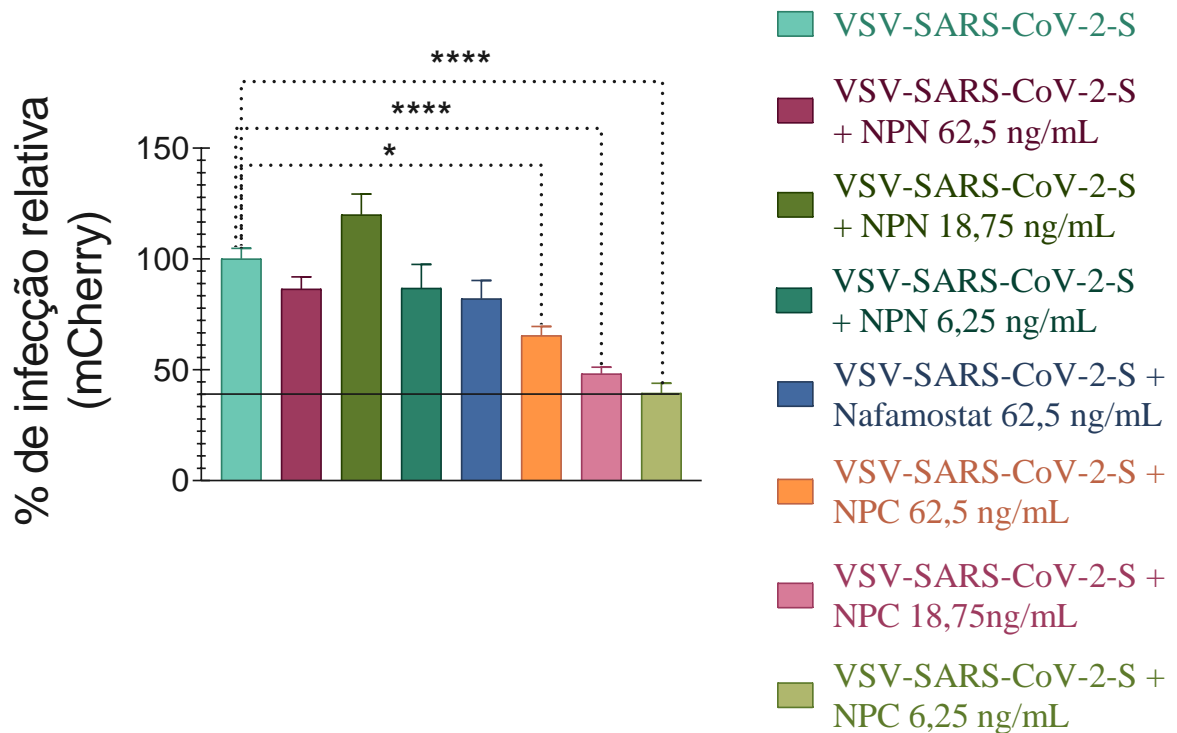
Fonte: da autora.

Legenda: Infecção viral *in vitro* de astrócitos utilizando o modelo pseudotipado do vírus da estomatite vesicular (VSV-SARS-CoV-2-S) mCherry. Os astrócitos foram pré-tratados com nanopartículas controle (NPC) e nanopartículas nafamostat (NPN) na concentração de 62,5 ng/mL, além do tratamento com nafamostat livre (62,5 ng/mL), por 1 hora. Em seguida, a infecção foi realizada com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. A infecção viral foi quantificada por fluorimetria, com emissão em 583 nm e excitação em 610 nm, utilizando o leitor de placas ELISA (Synergy H1 Hybrid Reader). O grau de significância estatística foi indicado por asteriscos: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

Conforme demonstrado na Figura 24, as NPC apresentaram uma redução significativa da infecção viral pelo vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2-S, com  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (vírus sem tratamento). Isso sugere que as NPC atuam de maneira eficaz na redução da entrada viral. Por outro lado, o grupo tratado com NPN na concentração de 62,5 ng/mL, bem como o nafamostat puro na mesma concentração, não apresentaram redução significativa na taxa de infecção viral.

A Figura 25 apresenta os resultados da infecção viral *in vitro* de astrócitos pelo vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2, após pré-tratamento das células com NPC ou NPN por 72 horas. As NPs foram testadas nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, enquanto o nafamostat foi utilizado na concentração de 62,5 ng/mL. A quantificação da infecção foi realizada por fluorimetria, considerando a porcentagem relativa de infecção mCherry emitida pelo vírus nas células.

Figura 25 – Infecção viral de astrócitos *in vitro* após pré-tratamento das células com NPs biossurfactante iturina controle NPC, NPs biossurfactante iturina com nafamostat NPN em diferentes concentrações ng/mL por 72h.



Fonte: da autora.

Legenda: Infecção viral *in vitro* de astrócitos utilizando o modelo pseudotipado do vírus da estomatite vesicular (VSV-SARS-CoV-2-S) mCherry. Os astrócitos foram pré-tratados com nanopartículas controle (NPC) ou nanopartículas cnafamostat (NPN) nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL, além do tratamento com nafamostat livre (62,5 ng/mL), por 72 horas. Em seguida, a infecção foi realizada com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. A quantificação da infecção foi realizada por fluorimetria, com emissão em 583 nm e excitação em 610 nm, utilizando o leitor de placas ELISA (Synergy H1 Hybrid Reader). O grau de significância estatística foi indicado por asteriscos: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

Os resultados demonstram que a infecção viral de astrócitos pelo vírus VSV-SARS-CoV-2-S foi confirmada, apresentou 100% de infecção. O pré-tratamento com NPN nas concentrações de 62,5 ng/mL, 18,75 ng/mL e 6,25 ng/mL não resultou em redução significativa da infecção viral, quando comparado ao grupo vírus. O pré-tratamento com NPN a 18,75 ng/mL resultou em um aumento da taxa de infecção viral, ultrapassando 100% de infecção. Ademais, o nafamostat puro na concentração de 62,5 ng/mL também não demonstrou redução significativa da infecção viral em comparação ao grupo vírus.

Em contraste, o pré-tratamento com NPC apresentou reduções significativas

na infecção viral. Comparando-se NPC 62,5 ng/mL (65% de infecção) com o grupo vírus (100% de infecção), houve uma redução de aproximadamente 35% na infecção viral ( $p < 0,05$ ). A concentração de 18,75 ng/mL de NPC resultou em 50% de infecção, indicando uma redução de 50% ( $p < 0,0001$ ), enquanto NPC 6,25 ng/mL resultou em 40% de infecção, correspondendo a uma redução de 60% ( $p < 0,0001$ ).

Portanto, os resultados apresentados na Figura 25 confirmam que as NPN não reduziram significativamente a taxa de infecção viral. No entanto, as NPC foram eficazes na redução da infecção viral em todas as concentrações testadas, demonstrando um efeito dose-resposta. O grupo tratado com NPC 6,25 ng/mL obteve a maior redução, atingindo uma diminuição de até 60% na infecção pelo vírus pseudotipado VSV-SARS-CoV-2.

Assim, independentemente do tempo de pré-tratamento 1h ou 72h, as NPC apresentaram um desempenho superior na redução da infecção viral *in vitro* em astrócitos. Esses achados estão alinhados com pesquisas anteriores conduzidas pelo nosso grupo, que demonstraram a atividade antiviral do biossurfactante iturina contra o SARS-CoV-2.

Embora as NPN não tenham reduzido significativamente a infecção viral, é relevante considerar a ação do nafamostat sobre a TMPRSS2, conforme descrito na literatura, bem como seu potencial efeito anti-inflamatório e neuroprotetor.

Como perspectivas futuras, investigações adicionais sobre a inibição de proteases, como a tripsina, poderiam elucidar melhor o papel das NPN na modulação da TMPRSS2 e nos processos inflamatórios.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que as NPs de biossurfactante iturina contendo o inibidor de protease nafamostat (NPN) apresentaram características favoráveis, como menor tamanho e baixa polidispersão. No ensaio de liberação, as NPN exibiram uma liberação lenta do nafamostat. A análise por voltametria cíclica sugere que as NPC permitem a formação de canais na s-BLM. As NPC não afetaram a viabilidade celular em culturas de células gliais *in vitro*, mantendo a atividade metabólica estável. No ensaio de inflamação *in vitro* induzido por LPS em astrócitos, as NPC não reduziram os níveis de TNF- $\alpha$ , enquanto a diminuição dessa citocina foi observada apenas com as NPN e o nafamostat puro. No entanto, tanto as NPC quanto as NPN, assim como o nafamostat puro, reduziram significativamente os níveis de IL-6. No ensaio de imunofluorescência *in vitro* a marcação da membrana fosfolipídica em astrócitos por (WGA) e a marcação específica para a GFAP, confirma que os experimentos foram realizados em astrócitos. No ensaio de infecção viral *in vitro*, as NPC demonstraram capacidade de reduzir a porcentagem de infecção viral pelo vírus VSV-SARS-CoV-2-S (mCherry).

## REFERÊNCIAS

- ADAMU, Alhamdu; LI, Shuo; GAO, Fankai; XUE, Guofang. The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: current understanding and future therapeutic targets. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 16, 2024. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1347987>.
- ALTIN-CELIK, Pinar; EKEN, Ahmet; DERYA-ANDEDEN, Muazzez; ECIROGLU, Hamiyet; UZEN, Ramazan; DONMEZ-ALTUNTAS, Hamiyet. Iturin A and Gramicidin A inhibit proliferation, trigger apoptosis, and regulate inflammation in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 100, p. 106121, 1 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2024.106121>. Accessed on: 2 Apr. 2025.
- ANSARIN, Khalil; TOLOUIAN, Ramin; ARDALAN, Mohammadreza; TAGHIZADIEH, Ali; VARSHOCHI, Mojtaba; TEIMOURI, Soheil; VAEZI, Tahere; VALIZADEH, Hamed; SALEH, Parviz; SAFIRI, Saeid; CHAPMAN, Kenneth R. Effect of bromhexine on clinical outcomes and mortality in COVID-19 patients: A randomized clinical trial. **BioImpacts**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 209–215, 2020. <https://doi.org/10.34172/bi.2020.27>.
- ARNOLD, John C.; SINGH, Kumud K.; MILDER, Edmund; SPECTOR, Stephen A.; SAWYER, Mark H.; GAVALI, Shilpa; GLASER, Carol. Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1057–1060, 2009. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181acd221>.
- BATTAGLIA, Luigi; PANCIANI, Pier Paolo; MUNTONI, Elisabetta; CAPUCCHIO, Maria Teresa; BIASIBETTI, Elena; DE BONIS, Pasquale; MIOLETTI, Silvia; FONTANELLA, Marco; SWAMINATHAN, Shankar. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 369–378, 3 Apr. 2018. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1429401>.
- BOHMWALD, Karen; SOTO, Jorge A.; ANDRADE-PARRA, Catalina; FERNÁNDEZ-FIERRO, Ayleen; ESPINOZA, Janyra A.; RÍOS, Mariana; EUGENIN, Eliseo A.; GONZÁLEZ, Pablo A.; OPAZO, María Cecilia; RIEDEL, Claudia A.; KALERGIS, Alexis M. Lung pathology due to hRSV infection impairs blood–brain barrier permeability enabling astrocyte infection and a long-lasting inflammation in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 91, p. 159–171, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.09.021>.
- CHAUHAN, Gaurav; MADOU, Marc J.; KALRA, Sourav; CHOPRA, Gianni; GHOSH, Deepa; MARTINEZ-CHAPA, Sergio O. Nanotechnology for COVID-19: Therapeutics and Vaccine Research. **ACS Nano**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 7760–7782, 28 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04006>.
- CHAUHAN, Vivek; DHIMAN, Vivek Kumar; MAHAJAN, Gaytri; PANDEY, Akash; KANWAR, Shamsheer S. Synthesis and characterization of silver nanoparticles developed using a novel lipopeptide(s) biosurfactant and evaluating its antimicrobial

and cytotoxic efficacy. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 124, p. 51–62, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.002>.

CHEN, Tao; WANG, Jing; LI, Chenhui; ZHANG, Weining; ZHANG, Luyong; AN, Lufan; PANG, Tao; SHI, Xinzhong; LIAO, Hong. Nafamostat mesilate attenuates neuronal damage in a rat model of transient focal cerebral ischemia through thrombin inhibition. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, 2 Jul. 2014. <https://doi.org/10.1038/srep05531>.

CHO, Taeheum; HAN, Hyo Sang; JEONG, Junhyuk; PARK, Eun Mi; SHIM, Kyu Sik. A novel computational approach for the discovery of drug delivery system candidates for covid-19. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1–20, 2 Mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22062815>.

CLAUDIO, Palazzo; REATUL, Karim; BRIGITTE, Evrard; GERALDINE, Piel. Drug-delivery nanocarriers to cross the blood-brain barrier. **Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials**, [s. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 333–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00010-1>.

DUAN, Hui Quan; WU, Qiu Li; YAO, Xue; FAN, Bao You; SHI, Hong Yu; ZHAO, Chen Xi; ZHANG, Yan; LI, Bo; SUN, Chao; KONG, Xiao Hong; ZHOU, Xin Fu; FENG, Shi Qing. Nafamostat mesilate attenuates inflammation and apoptosis and promotes locomotor recovery after spinal cord injury. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 429–438, 1 May 2018. <https://doi.org/10.1111/cns.12801>.

FAROKHZAD, Omid C.; LANGER, Robert. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 16–20, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>.

FRANCI, G.; PALOMBA, L.; FALANGA, A.; ZANNELLA, C.; D'ORIANO, V.; RINALDI, L.; GALDIERO, S.; GALDIERO, M. Influenza virus infections: clinical update, molecular biology, and therapeutic options. **The Microbiology of Respiratory System Infections**, [s. l.]: Elsevier, 2016. p. 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804543-5.00001-4>.

GAN, Ping; JIN, Dong; ZHAO, Xiuyun; GAO, Zhenqiu; WANG, Shengying; DU, Peng; QI, Gaofu. Bacillus-produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE<sup>-/-</sup> mice. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 35, p. 226–234, 1 Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.043>.

GIRI, Sib Sankar; SEN, Shib Sankar; JUN, Jin Woo; SUKUMARAN, Venkatachalam; PARK, Se Chang. Role of Bacillus subtilis VSG4-derived biosurfactant in mediating immune responses in *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 54, p. 220–229, 1 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.004>.

GRANHOLM, Ann Charlotte. Long-Term Effects of SARS-CoV-2 in the Brain: clinical consequences and molecular mechanisms. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], vol. 12, n. 9, 1 May 2023. <https://doi.org/10.3390/jcm12093190>.

GUO, F.; MA, J.; PLEASURE, D. E. Astrocytes. **Encyclopedia of the Neurological**

**Sciences**, [s. l.]: Elsevier Inc., 2014. p. 287–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00172-X>.

GUO, Qing; JIN, Yizi; CHEN, Xinyu; YE, Xiaomin; SHEN, Xin; LIN, Mingxi; ZENG, Cheng; ZHOU, Teng; ZHANG, Jian. NF- $\kappa$ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 1, 1 Dec. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>.

GUPTA, Subash C.; SUNDARAM, Chitra; REUTER, Simone; AGGARWAL, Bharat B. Inhibiting NF- $\kappa$ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, [s. l.], v. 1799, n. 10–12, p. 775–787, Oct. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>.

HANISCH, U. K. Microglia. **Encyclopedia of the Neurological Sciences**, [s. l.]: Elsevier Inc., 2014. p. 3–5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00184-6>.

HARISH, B. S.; UPPULURI, Kiran Babu. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 1373–1387, 1 Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.115>.

HEMPEL, Tim; RAICH, Lluís; OLSSON, Simon; AZOUZ, Nurit P.; KLINGLER, Andrea M.; HOFFMANN, Markus; PÖHLMANN, Stefan; ROTHENBERG, Marc E.; NOÉ, Frank. Molecular mechanism of inhibiting the SARS-CoV-2 cell entry facilitator TMPRSS2 with camostat and nafamostat. **Chemical Science**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 983–992, 21 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1039/d0sc05064d>.

HOFFMANN, Markus; SCHROEDER, Simon; KLEINE-WEBER, Hannah; MÜLLER, Marcel A.; DROSTEN, Christian; PÖHLMANN, Stefan. Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: New treatment option for COVID-19. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 6, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1128/AAC.00754-20>.

HU, Che Ming Jack; CHEN, You Ting; FANG, Zih Syun; CHANG, Wei Shan; CHEN, Hui Wen. Antiviral efficacy of nanoparticulate vacuolar ATPase Inhibitors Against Influenza virus infection. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 8579–8593, 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185806>.

HUANG, Chaolin; WANG, Yeming; LI, Xingwang; REN, Lili; ZHAO, Jianping; HU, Yi; ZHANG, Li; FAN, Guohui; XU, Jiuyang; GU, Xiaoying; CHENG, Zhenshun; YU, Ting; XIA, Jiaan; WEI, Yuan; WU, Wenjuan; XIE, Xuelei; YIN, Wen; LI, Hui; LIU, Min; XIAO, Yan; GAO, Hong; GUO, Li; XIE, Jungang; WANG, Guangfa; JIANG, Rongmeng; GAO, Zhancheng; JIN, Qi; WANG, Jianwei; CAO, Bin. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 Feb. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).

HUANG, Wenjing; LANG, Yan; HAKEEM, Abdul; LEI, Yan; GAN, Lu; YANG, Xiangliang. Surfactin-based nanoparticles loaded with doxorubicin to overcome multidrug resistance in cancers. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 1723–1736, 21 Mar. 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S157368>.

HWANG, Mi Hyun; LIM, Jong Hwan; YUN, Hyo In; RHEE, Man Hee; CHO, Jae Youl; HSU, Walter H.; PARK, Seung Chun. Surfactin C inhibits the lipopolysaccharide-induced transcription of interleukin-1 $\beta$  and inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 27, n. 20, p. 1605–1608, Oct. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2515-1>.

HYVÄRINEN, Tanja; HAGMAN, Sanna; RISTOLA, Mervi; SUKKI, Lassi; VEIJULA, Katariina; KREUTZER, Joose; KALLIO, Pasi; NARKILAHTI, Susanna. Co-stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 1 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53414-9>.

JORGAČEVSKI, Jernej; POTOKAR, Maja. Immune Functions of Astrocytes in Viral Neuroinfections. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 4, 1 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24043514>.

KATIYAR, Sameer S.; KUSHWAH, Varun; DORA, Chander Parkash; JAIN, Sanyog. Novel biosurfactant and lipid core-shell type nanocapsular sustained release system for intravenous application of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 557, p. 86–96, 25 Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.043>.

KAWASE, Miyuki; SHIRATO, Kazuya; VAN DER HOEK, Lia; TAGUCHI, Fumihiko; MATSUYAMA, Shutoku. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 86, n. 12, p. 6537–6545, 15 Jun. 2012. <https://doi.org/10.1128/jvi.00094-12>.

KOURMENTZA, Konstantina; GROMADA, Xavier; MICHAEL, Nicholas; DEGRAEVE, Charlotte; VANIER, Gaetan; RAVALLEC, Rozenn; COUTTE, Francois; KARATZAS, Kimon Andreas; JAUREGI, Paula. Antimicrobial activity of Lipopeptide Biosurfactants against Foodborne Pathogen and Food Spoilage Microorganisms and Their Cytotoxicity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 11 Jan. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561060>.

KRACHT, Maren; ROKOS, Hartmut; OZEL, Muhsin; KOWALL13, Martin; PAULI, Georg; VATERA, Joachim. **Antiviral and Hemolytic Activities of Surfactin Isoforms and Their Methyl Ester Derivatives**, [s. l.: s. n.], 1999.

KUMARI, Khushbu; NANDI, Aditya; SINHA, Adrija; GHOSH, Aishee; SENGUPTA, Srabasti; SAHA, Utsa; SINGH, Pawan K.; PANDA, Pritam Kumar; RAINA, Vishakha; VERMA, Suresh K. The paradigm of prophylactic viral outbreaks measures by microbial biosurfactants. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 575–587, 1 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.016>.

KWON, Sun Kwan; AHN, Moonsang; SONG, Hee Jung; KANG, Shin Kwang; JUNG, Saet Byel; HARSHA, Nagar; JEE, Sungju; MOON, Jae Young; SUH, Kwang Sun; LEE, Sang Do; JEON, Byeong Hwa; KIM, Dong Woon; KIM, Cuk Seong. Nafamostat mesilate attenuates transient focal ischemia/reperfusion-induced brain injury via the

inhibition of endoplasmic reticulum stress. **Brain Research**, [s. l.], v. 1627, p. 12–20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.013>.

LI, Chenhui; WANG, Jing; FANG, Yinquan; LIU, Yuan; CHEN, Tao; SUN, Hao; ZHOU, Xin Fu; LIAO, Hong. Nafamostat mesilate improves function recovery after stroke by inhibiting neuroinflammation in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 56, p. 230–245, 1 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.03.019>. Accessed on: 1 Apr. 2025.

LIN, Jiayuan; YU, Zhihua; GAO, Xiaoling. Advanced noninvasive strategies for the brain delivery of therapeutic proteins and peptides. **ACS Nano**, [s. l.], v. 18, n. 34, p. 22752–22779, 27 Aug. 2024. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c06851>.

LIU, Yuan; LI, Chenhui; WANG, Jing; FANG, Yinquan; SUN, Hao; TAO, Xia; ZHOU, Xin Fu; LIAO, Hong. Nafamostat Mesilate improves neurological outcome and axonal regeneration after stroke in rats. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 4217–4231, 1 Aug. 2017. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9999-7>.

LUO, Wenqi; LI, Yueying; XIANG, Chunyu; AIZAWA, Toshimi; NIU, Renrui; WANG, Yiming; ZHAO, Jianhui; LIU, Zeping; LI, Chaoyuan; LIU, Wanguo; GU, Rui. Nanomaterials as therapeutic agents to modulate astrocyte-mediated inflammation in spinal cord injury. **Materials Today Bio**, [s. l.], v. 23, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100888>.

MAGET-DANA, R; PTAK, M; PEYPOUX, F; MICHEL, G. **Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic**. [s. l.: s. n.], 1985.

MALIHA, Sumaiya Tasnim; FATEMI, Rabeya; ARAF, Yusha. COVID-19 and the brain: understanding the pathogenesis and consequences of neurological damage. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 51, n. 1, 1 Dec. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09279-x>.

NAJJAR, Souhel; NAJJAR, Amanda; CHONG, Derek J.; PRAMANIK, Bidyut K.; KIRSCH, Claudia; KUZNIECKY, Ruben I.; PACIA, Steven V.; AZHAR, Salman. Central nervous system complications associated with SARS-CoV-2 infection: integrative concepts of pathophysiology and case reports. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 17, n. 1, 6 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01896-0>.

NAZLI, Nurul Atikah Nor; MUTHURAJU, Sangu; AHMAD, Farizan; YUSOFF, Abdul Aziz Mohamed; JAAFAR, Hasnan; SHAMSUDDIN, Shaharum; ABDULLAH, Jafri Malin. Characterisation of primary human hippocampal astrocyte cell culture following exposure to hypoxia. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 92–106, 2023. <https://doi.org/10.21315/mjms2023.30.1.8>.

NG, Y. P.; YIP, T. F.; PEIRIS, J. S. Malik; IP, Nancy Y.; LEE, Suki M.Y. Avian influenza A H7N9 virus infects human astrocytes and neuronal cells and induces inflammatory immune responses. **Journal of NeuroVirology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 752–760, 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0659-8>.

NIEMEYER, Brian F.; MILLER, Caitlin M.; LEDESMA-FELICIANO, Carmen; MORRISON, James H.; JIMENEZ-VALDES, Rocio; CLIFTON, Clarissa; POESCHLA, Eric M.; BENAM, Kambez H. Broad antiviral and anti-inflammatory efficacy of nafamostat against SARS-CoV-2 and seasonal coronaviruses in primary human bronchiolar epithelia. **Nano Select**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 437–449, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1002/nano.202100123>.

OTIFI, Hassan M.; ADIGA, Balkur K. Endothelial dysfunction in Covid-19 Infection. **American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 363, n. 4, p. 285–291, 1 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2021.12.010>.

PARK, Sun Young; KIM, Ji Hee; LEE, Sang Joon; KIM, Young Hee. Involvement of PKA and HO-1 signaling in anti-inflammatory effects of surfactin in BV-2 microglial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 268, n. 1, p. 68–78, 1 Apr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.017>.

PATANI, Rickie; HARDINGHAM, Giles E.; LIDDELOW, Shane A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 395–409, 1 Jul. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1>.

PETRA, Tavcar; MAJA, Potokar; MARKO, Kolenc; MISA, Korva; TATJANA, Avsic-Zupance; ROBERT, Zorec; JERNEJ, Jorgacevski. Neurotropic viruses, astrocytes, and COVID-19. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 1–14, 2021.

RAUF, Abdur; BADONI, Himani; ABU-IZNEID, Tareq; OLATUNDE, Ahmed; RAHMAN, Md Mominur; PAINULI, Sakshi; SEMWAL, Prabhakar; WILAIRATANA, Polrat; MUBARAK, Mohammad S. Neuroinflammatory markers: Key indicators in the pathology of neurodegenerative diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 10, 1 May 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27103194>.

REUS, Philipp; GUTHMANN, Hadar; UHLIG, Nadja; AGBARIA, Majd; ISSMAIL, Leila; EBERLEIN, Valentina; NORDLING-DAVID, Mirjam M.; JBARA-AGBARIA, Doaa; CIESEK, Sandra; BOJKOVA, Denisa; CINATL, Jindrich; BURGER-KENTISCHER, Anke; RUPP, Steffen; ZALIANI, Andrea; GRUNWALD, Thomas; GRIBBON, Philip; KANNT, Aimo; GOLOMB, Gershon. Drug repurposing for the treatment of COVID-19: Targeting nafamostat to the lungs by a liposomal delivery system. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 364, p. 654–671, 1 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.10.050>.

RUSSELL, Clark D.; UNGER, Stefan A.; WALTON, Marc; SCHWARZE, Jürgen. The human immune response to respiratory syncytial virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 481–502, 1 Apr. 2017. <https://doi.org/10.1128/CMR.00090-16>.

SAGAWA, Tomoya; INOUE, Ken ichiro; TAKANO, Hirohisa. Use of protease inhibitors for the prevention of COVID-19. **Preventive Medicine**, [s. l.], v. 141, 1 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106280>.

SAGLAM-METINER, Pelin; YILDIZ-OZTURK, Ece; TETIK-VARDARLI, Aslı; CICEK,

Candan; GOKSEL, Ozlem; GOKSEL, Tuncay; TEZCANLI, Beril; YESIL-CELIK TAS, Ozlem. Organotypic lung tissue culture as a preclinical model to study host- influenza A viral infection: A case for repurposing of nafamostat mesylate. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 87, 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102319>.

SÁNCHEZ-DENGRÁ, Bárbara; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, Isabel; BERMEJO, Marival; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, Marta. Access to the CNS: Strategies to overcome the BBB. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 636, 5 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122759>.

SARUBBO, Leonie A.; SILVA, Maria da Gloria C.; DURVAL, Italo José B.; BEZERRA, Káren Gercyane O.; RIBEIRO, Beatriz G.; SILVA, Iverson A.; TWIGG, Matthew S.; BANAT, Ibrahim M. Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 181, 1 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.

SELVAM, R; MAHESWARI, P; KAVITHA, P; RAVICHANDRAN, M; SAS, Benedikt; RAMCHAND, C N. Effect of Bacillus subtilis PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, [s. l.], v. 46, p. 79–85, 2009.

SHAH, Rohan; ELDRIDGE, Daniel; PALOMBO, Enzo; HARDING, Ian. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**. [s. l.: s. n.], 2015. DOI 10.1007/978-3-319-10711-0. Available at: <http://www.springer.com/series/10224>.

SHEKUNOV, Egor V.; ZLODEEVA, Polina D.; EFIMOVA, Svetlana S.; MURYLEVA, Anna A.; ZARUBAEV, Vladimir V.; SLITA, Alexander V.; OSTROUMOVA, Olga S. Cyclic lipopeptides as membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2: New tricks for old dogs. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 212, 1 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105575>.

SHI, Fu Dong. Neuroinflammation. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 714–716, 1 Dec. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1568-y>.

SHI, Jing Ming; LIU, Hang; CAI, Long; GUO, Yi Bo; MA, Hui; LI, Yan Song; LI, Sha Di; ZHANG, Ze Yu; MA, Yan Dong; GUO, Cheng Hui. Identification and functional comparison of primary astrocytes and microglia. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 383, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109731>.

SINGH, Ragini; KUMAWAT, Mamta; GOGOI, Himanshu; MADHYASTHA, Harishkumar; LICHTFOUSE, Eric; DAIMA, Hemant Kumar. Engineered Nanomaterials for Immunomodulation: A Review. **ACS Applied Bio Materials**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 727–751, 19 Feb. 2024. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00940>.

SMITH, Matthew L.; GANDOLFI, Stefano; COSHALL, Philippa M.; RAHMAN, Pattanathu K.S.M. Biosurfactants: A Covid-19 Perspective. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 9 Jun. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01341>.

STEARDO, Luca; STEARDO, Luca; SCUDERI, Caterina. Astrocytes and the Psychiatric Sequelae of COVID-19: What We Learned from the Pandemic.

**Neurochemical Research**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1015–1025, 1 Apr. 2023.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03709-7>.

STEINER, Silvio; KRATZEL, Annika; BARUT, G. Tuba; LANG, Reto M.; AGUIAR MOREIRA, Etori; THOMANN, Lisa; KELLY, Jenna N.; THIEL, Volker. SARS-CoV-2 biology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 206–225, 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>.

TAKAHASHI, Wakana; YONEDA, Taro; KOBAYASHI, Hayato; UEDA, Tsukasa; TSUJI, Noriaki; OGAWA, Haruhiko; ASAKURA, Hidesaku. Potential mechanisms of nafamostat therapy for severe COVID-19 pneumonia with disseminated intravascular coagulation. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 102, p. 529–531, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.093>.

TENCHOV, Rumiana; BIRD, Robert; CURTZE, Allison E.; ZHOU, Qiongqiong. Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 16982–17015, 23 Nov. 2021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.

THAKUR, Shubham; SINGH, Amrinder; SHARMA, Ritika; AURORA, Rohan; JAIN, Subheet Kumar. Biosurfactants as a Novel Additive in Pharmaceutical Formulations: Current Trends and Future Implications. **Current Drug Metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 885–901, 9 Oct. 2020. <https://doi.org/10.2174/1389200221666201008143238>.

VECINO, Xanel; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Lorena; RINCÓN-FONTÁN, Myriam; CRUZ, José M.; MOLDES, Ana B. Nanomaterials synthesized by biosurfactants. **Comprehensive Analytical Chemistry**, [s. l.]: Elsevier B.V., 2021. v. 94, p. 267–301. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.12.008>.

VOGEL, Annette B.; KANEVSKY, Isis; CHE, Ye; SWANSON, Kena A.; MUIK, Alexander; VORMEHR, Mathias; KRANZ, Lena M.; WALZER, Kerstin C.; HEIN, Stephanie; GÜLER, Alptekin; LOSCHKO, Jakob; MADDUR, Mohan S.; OTA-SETLIK, Ayuko; TOMPKINS, Kristin; COLE, Journey; LUI, Bonny G.; ZIEGENHALS, Thomas; PLASCHKE, Arianne; EISEL, David; DANY, Sarah C.; FESSER, Stephanie; ERBAR, Stephanie; BATES, Ferdia; SCHNEIDER, Diana; JESIONEK, Bernadette; SÄNGER, Bianca; WALLISCH, Ann Kathrin; FEUCHTER, Yvonne; JUNGINGER, Hanna; KRUMM, Stefanie A.; HEINEN, André P.; ADAMS-QUACK, Petra; SCHLERETH, Julia; SCHILLE, Stefan; KRÖNER, Christoph; DE LA CARIDAD GÜIMIL GARCIA, Ramón; HILLER, Thomas; FISCHER, Leyla; SELLERS, Rani S.; CHOUDHARY, Shambhunath; GONZALEZ, Olga; VASCOTTO, Fulvia; GUTMAN, Matthew R.; FONTENOT, Jane A.; HALL-URSONE, Shannan; BRASKY, Kathleen; GRIFFOR, Matthew C.; HAN, Seungil; SU, Andreas A.H.; LEES, Joshua A.; NEDOMA, Nicole L.; MASHALIDIS, Ellene H.; SAHASRABUDHE, Parag V.; TAN, Charles Y.; PAVLIAKOVA, Danka; SINGH, Guy; FONTES-GARFIAS, Camila; PRIDE, Michael; SCULLY, Ingrid L.; CIOLINO, Tara; OBREGON, Jennifer; GAZI, Michal; CARRION, Ricardo; ALFSON, Kendra J.; KALINA, Warren V.; KAUSHAL, Deepak; SHI, Pei Yong; KLAMP, Thorsten; ROSENBAUM, Corinna; KUHN, Andreas N.; TÜRECI, Özlem; DORMITZER, Philip R.; JANSEN, Kathrin U.; SAHIN, Ugur. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. **Nature**, [s. l.], v. 592, n. 7853, p. 283–289, 8 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>.

VOLLENBROICH, Dirk; VATER, Joachim; MARIA KAMP, Roza; PAULI, Georg. **Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from bacillus subtilis.** [s. l.: s. n.], 1997.

WEI, Yang; HUANG, Mingdong; JIANG, Longguang. Advancements in Serine Protease Inhibitors: From Mechanistic Insights to Clinical Applications. **Catalysts**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 787, 5 Nov. 2024. DOI 10.3390/catal14110787. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4344/14/11/787>.

WU, Dong-Dong; SALAH, Yasmine Ahmed; NGOWI, Ebenezeri Erasto; ZHANG, Yan-Xia; KHATTAK, Saadullah; HUSSAIN KHAN, Nazeer; WANG, Yan; LI, Tao; GUO, Zi-Hua; WANG, Yan-Mei; JI, Xin-Ying. Nanotechnology prospects in brain therapeutics concerning gene-targeting and nose-to-brain administration. **SCIENCE**, [s. l.], v. 26, p. 107321, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107321>. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci>.

YARAGUPPI, Deepak A.; BAGEWADI, Zabin K.; PATIL, Ninganagouda R.; MANTRI, Nitin. Iturin: A Promising Cyclic Lipopeptide with Diverse Applications. **Biomolecules**, [s. l.], v. 13, n. 10, 1 Oct. 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13101515>.

YATES, Abi G.; WEGLINSKI, Caroline M.; YING, Yuxin; DUNSTAN, Isobel K.; STREKALOVA, Tatyana; ANTHONY, Daniel C. Nafamostat reduces systemic inflammation in TLR7-mediated virus-like illness. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 19, n. 1, 1 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02357-y>.

ZHANG, Yuanyuan; LIU, Chuan; DONG, Bin; MA, Xiaolei; HOU, Lihua; CAO, Xiaohong; WANG, Chunling. Anti-inflammatory Activity and Mechanism of Surfactin in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. **Inflammation**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 756–764, 1 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9986-y>.

ZHANG, Yuxin; AN, Lufan; ZHANG, Lin; WANG, Rulin; TIAN, Yuan; ZHANG, Zunjian. Identification of impurities in nafamostat mesylate using HPLC-IT-TOF/MS: A series of double-charged ions. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 346–350, 1 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.002>.

ZHAO, Haobin; SHAO, Dongyan; JIANG, Chunmei; SHI, Junling; LI, Qi; HUANG, Qingsheng; RAJOKA, Muhammad Shahid Riaz; YANG, Hui; JIN, Mingliang. Biological activity of lipopeptides from Bacillus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 15, p. 5951–5960, 1 Aug. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>.

ZU, Yuangang; ZHANG, Yin; WANG, Weiguo; ZHAO, Xiuhua; HAN, Xue; WANG, Kunlun; GE, Yunlong. Preparation and in vitro / in vivo evaluation of resveratrol-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 981–991, 23 Mar. 2016. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.924167>.