

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 09/06/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de Araçatuba

Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica  
Área de Saúde Bucal da Criança

**KELLY LIMI AIDA**

**EFEITO MICROBIOLÓGICO E CITOTÓXICO DE SISTEMAS  
NANOESTRUTURADOS BIOADESIVOS CONTENDO  
FRAGMENTOS DE PEPTÍDEOS**

Araçatuba

2017

KELLY LIMI AIDA

**EFEITO MICROBIOLÓGICO E CITOTÓXICO DE SISTEMAS  
NANOESTRUTURADOS BIOADESIVOS CONTENDO  
FRAGMENTOS DE PEPTÍDEOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do  
Campus de Araçatuba – FOA, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –  
UNESP, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Ciência Odontológica, na  
Área de concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Adj. Robson F. Cunha

Co-orientadoras: Profa. Dra. Cristiane Duque

Profa. Adj. Sandra M. H.C.A. Aguiar

Araçatuba

2017

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A288e Aida, Kelly Limi.  
Efeito microbiológico e citotóxico de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo fragmentos de peptídeos / Kelly Limi Aida. - Araçatuba, 2017  
46 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Robson Frederico Cunha  
Coorientadora: Profa. Cristiane Duque  
Coorientadora: Profa. Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos 2. Cárie dentária  
3. *Streptococcus mutans* I. Título

Black D27  
CDD 617.645

# *Dados Curriculares*

## **Kelly Limi Aida**

<b>Nascimento</b>	05.01.1987 – Assaí-Pr
<b>Filiação</b>	Lauro Akikazu Aida Cleusa Hiromi Ueno Aida
<b>2006-2011</b>	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Londrina
<b>2012-2014</b>	Curso de Mestrado em Odontologia pela Universidade Estadual de Londrina
<b>2013-2014</b>	Curso de Especialização em Estatística com Ênfase em Pesquisa Quantitativa pela Universidade Estadual de Londrina
<b>Associações</b>	CROPR – Conselho Regional de Odontologia do Paraná CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

# *Dedicatória*

Com todo amor e carinho, dedico este trabalho à  
maior preciosidade da minha vida, minha  
*FAMÍLIA.*

# AGRADECIMENTOS

“Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não posso desperdiçá-la”. (*Ayrton Senna*)

## *Senhor Deus,*

Obrigada por sempre me dar força, coragem, esperança e persistência para alcançar meus objetivos.

## *Aos meus queridos Pais,*

Lauro Akikazu Aida e Cleusa Hiromi Ueno Aida, obrigada pelo carinho, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelos sacrifícios que fizeram para me dar uma vida melhor. Mesmo com a distância, meu amor e admiração por vocês cresce a cada dia.

## *Ao meu Marido,*

Yudi Yamada, obrigada pelo companheirismo, pela compreensão, pelo carinho, pela atenção, pela preocupação e pelo apoio durante este período. O seu amor é a fonte de alimento para meu coração. Com sua presença, os meus dias são mais alegres, enfrentar as dificuldades parece ser mais fácil, sem você nada mais tem sentido em minha vida. Com a Graça de Deus, viveremos juntos eternamente. Te amo muito!

## *À toda Família,*

Obrigada pela força, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Vocês são tudo para mim, obrigada por fazerem parte da minha vida.

## *Ao meu orientador,*

Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, obrigada por me aceitar como sua aluna de doutorado. Sem sua ajuda talvez não pudesse estar concluindo este curso. Obrigada pela oportunidade de estagiar na Bebê-Clínica. Enfim, obrigada por transmitir toda sua experiência e conhecimento.

***À minha co-orientadora,***

Prof. Dra. Cristiane Duque, foi uma honra conhecer uma pessoa tão competente, esforçada, trabalhadora, generosa, humilde, sonhadora e encantadora. Admiro muito suas qualidades.

Muito obrigada pela dedicação, pelo desempenho, pela persistência, pela competência, e especialmente, pela disposição de sempre me ajudar e lutar pelo nosso bem. Muito obrigada pela oportunidade de vivenciar na pesquisa laboratorial. Graças a você, levo uma grande bagagem de conhecimento e aprendizado do doutorado.

***Aos Professores do Programa de Pós-Graduação,***

Sandra M. H C. Avila de Aguiar, Juliano Pelim Pessan, Célio Percinoto e Alberto Carlos Botazzo Delbem, obrigada pelos ensinamentos, pela vivência e pela colaboração com a minha formação docente.

***Aos colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara,***

Pós-doutoranda Giovana Maria Fioramonti Calixto, e ao Professor Marlus Chorilli, obrigada pela contribuição com toda a parte da caracterização dos sistemas. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão deste trabalho.

***Aos colaboradores do Instituto de Química da Unesp de Araraquara,***

Norival Alves Santos-Filho, Professor Eduardo Maffud Cilli, obrigada pelo auxílio com a síntese dos peptídeos. A contribuição de vocês foi fundamental para o prosseguimento no trabalho.

***À Professora Denise M. P. Spolidorio,***

Obrigada por todas as vezes que solicitamos seu laboratório para realizar o ensaio de citotoxicidade e obrigada pelo auxílio com o crescimento e doação das células.

***Às amigas do laboratório de Microbiologia,***



Paula Fernanda Kreling, Loiane Massunari, Karina Sampaio Caiaffa, Juliana de Carvalho, obrigada por toda ajuda, pela amizade que construímos, pelas confidências e pelo conhecimento que me passaram, levarei a amizade de vocês para sempre.

***Aos demais amigos de Laboratório,***

Natália, Remberto, Jesse, Vanessa, Laís, Carla Mendes, Liliana, Guilherme, Laís, Luhana, Renan, Mayra, Nayara, Marcelle, Carla Favretto, Marjully, José Antônio, Isabel, Jorge, Jackeline, Jaqueline, Mariana e Thayse, obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração, vocês tornaram esta caminhada mais leve e feliz.

***Aos Funcionários,***

Mário, Ricardo e Luizinho, agradeço a colaboração para o bom funcionamento do laboratório e da clínica.

***À Faculdade de Odontologia de Araçatuba,***

Obrigada pela oportunidade de oferecer todo o apoio para realizar o doutorado.

***À Capes,***

Obrigada pela bolsa de estudos.

***À FAPESP,***

Obrigada pelo auxílio financeiro (Processo 2012/19235-5).

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

*Madre Teresa de Calcutá*

Aida, KL. **Efeito microbiológico e citotóxico de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo fragmentos de peptídeos**. 2017. 83f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

### **Resumo Geral**

O uso de agentes antimicrobianos naturais que reduzam a adesão e proliferação de *S. mutans* no biofilme poderia ser uma estratégia interessante para o controle da cárie dentária. No entanto, a estabilidade química e física de alguns desses agentes, como os peptídeos catiônicos antimicrobianos e fragmentos de peptídeos, pode ser comprometida por fatores externos, como temperatura e pH, reduzindo sua ação antimicrobiana. Com isso, os objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar sistemas de liberação de fármaco nanoestruturados bioadesivos para a incorporação dos fragmentos peptídicos D1-23 e P1025 e avaliar seu efeito citotóxico e atividade contra biofilme de *S. mutans*. A primeira formulação (F1), composta de ácido oleico, polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol (PPCA), Carbopol® 974P e Carbopol® 971P, foi analisada por microscopia de luz polarizada (MLP), reologia e bioadesão in vitro. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de D1-23 foram determinadas contra *S. mutans* para posterior avaliação da atividade sobre biofilme formado após 4h e 24h de tratamento. A segunda formulação (F2) foi selecionada a partir de três diferentes concentrações de ácido oleico, PPCA e Carbopol® 974P. Cada formulação foi analisada por MLP, espalhamento de raios x a baixo ângulo (SAXS), reologia e bioadesão. CIM e CBM de P1025 sobre *S. mutans* e seu efeito quando incorporado ou não em F2 sobre biofilme de *S. mutans* em formação foram analisados. A citotoxicidade em células epiteliais HaCat foi avaliada para os dois sistemas líquido cristalino (SLC) usando testes de MTT. Análise descritiva foi realizada para os dados dos ensaios de caracterização e para os ensaios microbiológicos e citotóxicos os dados foram submetidos aos testes de ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U ( $p < 0.05$ ). Os resultados indicaram que F1 apresentou características de SLC com alta viscosidade e bioadesão. CIM e CBM de D1-23 foram de 15,60 e 31,25 µg/mL, respectivamente. D1-23 incorporado em F1 apresentou melhores resultados contra biofilme de *S. mutans* que quando em solução, após 24h de tratamento. F2 apresentou melhores propriedades reológicas e força bioadesiva comparada aos demais sistemas, caracterizando um SLC. P1025 teve somente efeito inibitório sobre *S. mutans* (CIM=0.25 mg/mL). O efeito antibiofilme de P1025 incorporado em F2 foi observado após 24h de tratamento, principalmente quando aplicado na fase de adesão. Ambos os SLC contendo D1-23 e P1025 não apresentaram toxicidade sobre as células epiteliais, nas condições de tempo e concentrações avaliadas. A incorporação de peptídeos em SLC bioadesivos

nanoestruturados aumenta suas propriedades antimicrobianas, podendo ser uma interessante estratégia para a prevenção da cárie dentária.

**Palavras-chave:** Peptídeos catiônicos antimicrobianos. Cárie dentária. *Streptococcus mutans*.

Aida, KL. Microbiological and citotoxicity effect of nanostructured bioadhesive system containing peptide fragments. 2017. 83f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

### **General abstract**

The use of natural antimicrobial agents for reducing the adhesion and proliferation of *S. mutans* in the biofilm could be an interesting strategy for the control of dental caries. However, the chemical and physical stability of some natural antimicrobials, such as cationic antimicrobial peptides and peptide fragments, can be compromised by external factors such as temperature and pH, reducing their antimicrobial action. Thus, the objectives of this study were to develop and characterize nanostructured bioadhesive drug delivery systems for the incorporation of D1-23 and P1025 peptide fragments and to evaluate their cytotoxicity and activity against *S. mutans* biofilm. The first formulation (F1) was composed of oleic acid, polyoxypropylene- (5) -polyoxyethylene- (20) -cetyl alcohol (PPCA), Carbopol® 974P and Carbopol® 971P and analyzed by polarized light microscopy (PLM), rheology and in vitro bioadhesion. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bacterial concentration (MBC) of D1-23 were determined against *S. mutans* for further evaluation of activity against *S. mutans* biofilm after 4h and 24h of treatment. The second formulation was selected from three different concentrations of oleic acid, PPCA and Carbopol® 974P. Each formulation was analyzed by PLM, small-angle x-ray scattering (SAXS), rheology and bioadhesion. MIC and MBC of P1025 were determined against *S. mutans*. Thus, P1025 was incorporated in the best formulation (F2). The effect of P1025 incorporated or not into F2 on *S. mutans* biofilm formation was analyzed. Cytotoxicity in HaCat epithelial cells for both formulations was evaluated using MTT assays. Descriptive analysis was performed for the characterization assays and data from microbiological and cytotoxic assays were submitted to ANOVA / Tukey or Kruskal-Wallis / Mann-Whitney U ( $p < 0.05$ ). The results indicated that F1 presented characteristics of liquid-crystalline type system (LCS) with high viscosity and bioadhesion. The MIC and MBC of D1-23 were 15.60 and 31.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively. D1-23 incorporated in F1 showed better results than D1-23 in solution against *S. mutans* biofilm after 24h. F2 had better rheological properties and bioadhesive strength compared to other systems analyzed and characteristics of LCS. P1025 had only inhibitory effect against *S. mutans* (MIC=0.25mg/mL). The antibiofilm effect of P1025 incorporated into F2 was observed after 24h of treatment, mainly when applied in surface-bound salivary phase. Both LCS had no toxicity on epithelial cells, considering time and concentrations tested. The incorporation of peptides in nanostructured bioadhesive LCS increased their antimicrobial properties and could be an interesting strategy for caries prevention.

**Keywords:** Antimicrobial cationic peptides. Dental caries. *Streptococcus mutans*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figure 1-</b> Photomicrographs representing the effect of artificial saliva in the structure of F by PLM at 20x magnification (Fn, n= 10, 30, 50 and 100% of added artificial saliva.....	34
<b>Figure 2</b> – Rheograms of formulations F and F100. (Ascendent curve - filled symbol and descendent curve - empty symbols).....	35
<b>Figure 3</b> - Variation of the storage module (G' – filled symbol) and loss module (G'' – empty symbol) as a function of the frequency to F and F100.....	36
<b>Figure 4</b> – Boxplot of the percentage of biomass biofilm reduction after 4h and 24h of the treatments.....	37
<b>Figure 5</b> – Epithelial cell viability after 24h of the treatments.....	38

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1</b> - Ternary phase diagram of polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol (PPG-5-CETETH-20), oleic acid and 0.5% C974P dispersion. F1-C, F2-C and F3-C were the selected formulations for the structural characterization.....	57
<b>Figure 2</b> - Polarized light microscopy photomicrographs of the formulations F1-C, F2-C and F3-C.....	58
<b>Figure 3</b> - SAXS results obtained for the formulations F1-C, F2-C and F3-C.....	58
<b>Figure 4</b> – Flow properties of formulations F1-C, F2-C and F3-C.....	60
<b>Figure 5</b> - Variation of the storage module (G' - filled symbol) and loss module (G''- empty symbol) as a function of the frequency to F1-C, F2-C and F3-C.....	61
<b>Figure 6</b> – Quantification of <i>S. mutans</i> biofilm biomass after 24h of the treatments applications in the surface-bound salivary phase.....	62
<b>Figure 7</b> – Quantification of <i>S. mutans</i> biofilm biomass after 24h of the treatments applications in the salivary fluid-phase.....	63
<b>Figure 8</b> - Epithelial cell viability after 5, 30 and 60 min of the treatments and growth for 24h.....	64

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Table 1</b> – Results of in vitro bioadhesion strength in F and F100. Values represent means $\pm$ standard deviations.....	36
<b>Table 2</b> – Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of D1-23 and CHX solution against planktonic <i>S. mutans</i> .....	37

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1</b> – Composition (%) of the selected formulations for the characterization.....	57
<b>Table 2</b> - Values of $q_{max}$ (Å) and distance (d) between lamellae.....	59
<b>Table 3</b> – Work of the bioadhesive strength (mN.s) of the formulations. Values represent the mean $\pm$ standard deviation at 37 ° C.....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm - micrômetro

Å – angstrom

Ag I/II – antígeno I/II

AMP – peptídeo antimicrobiano

AO – ácido oleico

C971 - Carbopol® 971P

C974 - Carbopol® 974P

CAMP – peptídeo catiônico antimicrobiano

CFU/mL – unidades formadoras de colônias por mililitro

CH<sub>3</sub>COOH – ácido acético

CHX – diacetato de clorexidina

cm – centímetro

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

D1-23 – fragmento peptídico da β-defensina 3

F – formulação

g/mol – massa molar

G' – módulo de armazenamento

G'' – módulo de perda

h – hora

hBD - β-defensinas

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HNP – peptídeo neutrofílico humano

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

Hz – hertz

kDa – kilodalton

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio monobásico

L – litro

LCS – sistema líquido cristalino

MBC – concentração bactericida mínima

mg/mL – miligrama por mililitro

MIC – concentração inibitória mínima

min – minuto

mm – milímetro

mm/s – milímetro por segundo

mN – milinewton

MS – estreptococos mutans

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – fosfato dissódico

NaCl – cloreto de potássio

nm – nanômetro

OD – densidade óptica

OVS – sistema viscoso opaco

p – nível de significância

P1025 – peptídeo análogo a antígeno I/II de *S. mutans*

Pa – pascal

pH – potencial hidrogeniônico

PLM – microscopia de luz polarizada

PPCA - polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol

PPG-5-CETETH-20 - polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol

PRO - polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol

PS – separação de fases

rpm – rotação por minuto

s – segundo

*S. mutans* - *Streptococcus mutans*

SA I/II – antígeno I/II de *S. mutans*

SAXS – espalhamento de raios X a baixo ângulo

SLC – sistema líquido cristalino

SM – *streptococcus mutans*

TLS – sistema líquido transparente

TrLS – sistema líquido translúcido

TrVS – sistema viscoso translúcido

TTO – óleo de melaleuca

TVS – sistema viscoso transparente

W – água

$\mu\text{m}$  – micrômetro

$\mu\text{mol/L}$  – micromolar por litro

$k$  – índice de consistência

$\gamma$  – taxa de cisalhamento

$\eta$  – índice de fluxo

$\tau$  – tensão de cisalhamento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
REFERÊNCIAS .....	23
<b>2 CAPÍTULO 1 - Antimicrobial Peptide-loaded Liquid Crystalline Precursor Bioadhesive System for the Prevention of Dental Caries</b> .....	26
ABSTRACT .....	26
1 INTRODUCTION .....	27
2 MATERIALS AND METHODS .....	28
3 RESULTS .....	34
4 DISCUSSION .....	38
5 CONCLUSIONS.....	42
REFERENCES .....	42
<b>3 CAPÍTULO 2 - Nanostructured Bioadhesive Liquid Crystalline System as Carrier for Antimicrobial Peptide P1025 for Prevention of Dental Caries</b> .....	48
ABSTRACT.....	48
1 INTRODUCTION .....	49
2 MATERIALS AND METHODS.....	50
3 RESULTS .....	56
4 DISCUSSION .....	64
5 CONCLUSIONS.....	69
REFERENCES .....	69
<b>GLOSSÁRIO</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	76

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária é a doença bucal mais comum no mundo, atingindo todas as faixas etárias. No Brasil, em crianças muito jovens é denominada de cárie precoce da infância e apresenta-se como um grave problema de saúde pública, com prevalência de 43% em crianças de cinco anos de idade (SBBRASIL, 2003). É conceituada atualmente como uma doença biofilme-dependente associada à ingestão frequente de carboidratos da dieta. A fermentação desses carboidratos pelos microrganismos do biofilme leva à produção de ácidos o que perturba a homeostase do biofilme e pode causar a dissolução dos tecidos minerais do dente (MARSH, 2009).

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) tem sido considerado o principal agente etiológico da cárie dentária, devido à sua capacidade de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos e produzir grandes quantidades de ácidos, e ao mesmo tempo, tolerar altas concentrações de açúcares e ácidos (HAMADA & SLADE, 1980). *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa que participa de duas fases da formação do biofilme dental. Na fase de adesão, proteínas da superfície de *S. mutans* denominadas adesinas ou antígeno I/II (Ag I/II ou SA I/II) interagem com proteínas salivares adsorvidas na superfície do dente, permitindo a adesão bacteriana. Na fase de proliferação, *S. mutans* e outras bactérias, principalmente aquelas resistentes aos ácidos, acumulam-se por agregação com a mesma ou outras espécies e produzem uma matriz polissacarídica por degradação dos açúcares da dieta (SMITH, 2003). Embora o biofilme dental seja composto por múltiplas espécies bacterianas, agentes antimicrobianos que interfiram na adesão e proliferação de *S. mutans* poderiam ser utilizados como estratégias para auxiliar na prevenção da cárie dentária.

Substâncias naturais com propriedades antimicrobianas têm sido estudadas como agentes tópicos para aplicação na cavidade bucal, a fim de reduzir patógenos com menor risco de desenvolver resistência bacteriana (MARSH, 2012). Os peptídeos catiônicos antimicrobianos são sintetizados pelas mucosas e apresentam a função de barreira física contra a entrada de organismos estranhos. Entre esses peptídeos, estão as  $\beta$ -defensinas que foram introduzidas como futuros agentes antimicrobianos devido ao seu rápido início de ação e atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus, aliados a níveis potencialmente baixos de resistência induzida (GORR & AGDOLHOSSEINI, 2011; MCCORMICK & WEINBERG, 2010; WIESNER & VILCINSKAS, 2010).

As defensinas são peptídeos pequenos, de 15 a 45 aminoácidos, que dependendo do padrão de pareamento de seus resíduos de cisteína, são subdivididas em duas principais

subfamílias:  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas. Foram identificadas seis  $\alpha$ -defensinas em humanos, sendo que quatro são produzidas pelos neutrófilos e denominadas de peptídeo neutrofílico humano (HNP-1 a 4) e as outras duas são produzidas por células de Paneth nas criptas intestinais. As  $\beta$ -defensinas (hBDs) são produzidas por células epiteliais de diversos órgãos como olhos, pele, pulmão, rim, pâncreas, mucosa nasal e oral e embora tenham sido encontradas quase 40 regiões gênicas potenciais para hBDs, as mais bem caracterizadas são hBD 1 a 4. As  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas apresentam função imunomoduladora, modificando a migração e maturação celular, induzindo citocinas e a liberação de histamina e prostaglandina A2 de mastócitos. (McCORMICK & WEINBERG, 2010; WIESNER & VILCINSKAS, 2010; ABIKO, NISHIMURA & KAKU, 2003).

A hBD-3 mostrou ação contra importantes colonizadores primários e secundários de biofilme relacionados à cárie dentária, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, com doses inibitórias mínimas variando de 1,25 a 200  $\mu\text{g/mL}$  (OUHARA et al., 2005). Contudo, a grande sequência de aminoácidos (45 resíduos) e a presença de ligações de cisteína na estrutura tornam a síntese de hBD-3 muito onerosa. Adicionalmente, os peptídeos em sua forma nativa tendem a ser facilmente degradados por fatores externos, tais como temperatura e pH, e apresentarem uma redução na sua atividade na presença de sal, soro e proteinases (GORDON, ROMANOWSKI & MCDEROTT, 2005). Por conseguinte, modificações na sequência ou estrutura de peptídeos naturais poderiam gerar um novo peptídeo sintético ou fragmento de peptídeo que teria a mesma ou superior ação de largo espectro contra agentes patogênicos bacterianos, baixa toxicidade para o hospedeiro e um tamanho molecular mínimo para produção de baixo custo (ZHANG & FALLA, 2009). Recentemente, fragmentos ou análogos de peptídeos foram sintetizados e suas funções imunológicas e microbiológicas estudadas. Reynolds et al. (2010) avaliaram a atividade bactericida de fragmentos peptídicos de um derivado de  $\beta$ -defensina 3 e descobriram que a metade N-terminal de 23 aminoácidos (D1-23) de Defb14-1Cv (ortólogo de rato da  $\beta$ -defensina 3 humana) é um potente agente antimicrobiano. Kreling et al. (2016) verificaram que D1-23 apresentou baixa toxicidade sobre células epiteliais e melhor atividade contra *S. mutans*, em condições planctônicas e em biofilme, quando comparado a outros fragmentos de peptídeos.

Ensaio *in vitro* avaliando a capacidade de adesão de *S. mutans* à superfície dentária identificaram que a aglutinina salivar presente na saliva atua como receptor do antígeno I/II (Ag I/II) de *S. mutans*, e, portanto, medeia a ligação entre esse antígeno e a película adquirida (LEE et al., 1989; CARLÉN, 1995; YOUNSON & KELLY, 2004). Evidências de que Ag I/II facilita a adesão bacteriana têm sido obtidas por estudos com linhagens de *S. mutans*

deficientes desse antígeno, que demonstraram diminuição na adesão sobre a superfície de hidroxiapatita. Este mediador compreende a glicoproteína 440 kDa e componentes de baixo peso molecular (YOUNSON et al., 2004). Agregados entre a glicoproteína 440 kDa de *S. mutans* também podem exercer papel na defesa humana, uma vez que podem ser eliminados, por exemplo, pela deglutição. Por outro lado, em condições favoráveis de crescimento, esses agregados podem aderir às superfícies dos dentes, iniciando a formação do biofilme dental.

Estudo realizado por Kelly et al. (1999) identificaram os resíduos 1025-1044 na região C-terminal de Ag I/II como o epítipo de adesão desse antígeno. Nesse estudo, foi demonstrado que o peptídeo sintético (P1025) correspondente a esses resíduos pode inibir a ligação *in vitro* entre a adesina de *S. mutans* e a aglutinina salivar. Em estudos *in vivo*, observou-se que o peptídeo P1025 reduziu também a recolonização de *S. mutans* (KELLY et al., 1999). Outro estudo realizado por Li et al. (2009) demonstraram, *in vitro*, que dentifrício contendo peptídeo P1025 diminuiu a aderência de *S. mutans* à superfície de hidroxiapatita coberta por saliva. Adicionalmente, um estudo clínico comprovou que o efeito do dentifrício contendo o peptídeo diminuiu o índice de biofilme dental após 1 mês de tratamento.

Embora a etiologia da doença cárie seja multifatorial, a maioria dos seus fatores causadores é controlável, como a dieta, hábitos de higiene bucal, entre outros. Entretanto, a susceptibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento da doença, representada pelas respostas imaturas ou deficientes do sistema imune, considerando principalmente as crianças, poderia ser contornada utilizando-se peptídeos antimicrobianos como medida terapêutica direta para a redução da microbiota cariogênica, minimizando a possibilidade de resistência bacteriana, por seu caráter natural ou ainda como medida indireta, modulando a resposta imunológica, que favoreceria o melhor desempenho do organismo contra os patógenos. Apesar de todas as vantagens que os peptídeos antimicrobianos demonstram, existem algumas limitações para o seu uso terapêutico. Uma limitação da maioria dos peptídeos, em condições não fisiológicas, é que sua atividade antimicrobiana é significativamente reduzida em fluidos biológicos como o plasma, saliva ou soro. Assim, altas concentrações seriam necessárias para manter sua ação, o que aumentaria sua toxicidade. Aliando essa desvantagem ao fato dos peptídeos apresentarem uma rápida excreção por via renal, é difícil ou impossível administrá-los rotineiramente por via oral ou parenteral. (BATONI et al., 2011).

A eficácia dos agentes antimicrobianos no tratamento de infecções orais não está unicamente relacionada com a atividade antimicrobiana *in vitro*. Para ser adequadamente eficaz, é necessário conseguir um suprimento adequado do fármaco por um período prolongado. No entanto, as formulações tópicas normalmente utilizadas (enxaguatórios,

pulverizações, géis e pastilhas) são frequentemente caracterizadas por um tempo de retenção de fármaco limitado na cavidade bucal e tendem a ser rapidamente deslocadas, diluídas ou removidas, o que pode alterar a eficácia do medicamento. Dessa maneira, são necessárias numerosas e repetidas administrações dos medicamentos para atingir e manter níveis eficazes do fármaco (GAJDZIOK et al., 2010; LOFTSSON et al., 1999).

Os lipossomas, os cristais líquidos, as microemulsões e as nanopartículas representam uma estratégia interessante para a administração local de peptídeos (na cavidade bucal), porque estes sistemas podem promover liberação controlada de fármacos, protegerem os princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação, além de aumentarem a eficácia dos fármacos (GUTERRES, ALVES & POHLMANN, 2007; KANG, CHO & YOO, 2009). O sistema de cristais líquidos ou líquido-cristalinos (SLC) tem recebido considerável atenção devido ao seu excelente potencial como veículos de fármacos. Entre estes sistemas, as mesofases reversas cúbicas e hexagonais são as mais importantes e têm sido amplamente investigadas quanto à sua capacidade de manter a liberação de uma gama de bioativos a partir de fármacos de baixo peso molecular para proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (GUO et al., 2010).

Os SLC apresentam propriedades tanto de sólidos quanto de líquidos. Possuem ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (CHORILLI, et al., 2009). Em se tratando da aplicação bucal de peptídeos, uma estratégia interessante a ser adotada é a utilização de polímeros mucoadesivos nas formulações. O termo mucoadesivo é comumente usado para substâncias que se ligam à camada de mucina das membranas biológicas, sendo essenciais para permanência íntima e prolongada da formulação no local de ação (PATEL, LIU & BROWN, 2011). Os polímeros mucoadesivos podem ser empregados objetivando manter uma alta concentração do peptídeo no local de ação por um longo período, além de protegê-lo da degradação ambiental, pelo fato de terem grande afinidade pela mucosa bucal (VEUILLEZ et al., 2005). Também, eles podem competir com enzimas proteolíticas, o que é muito importante para fármacos propensos à degradação enzimática, como fármacos peptídicos (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG & JOHNSTON, 2005). Na literatura, poucos são os trabalhos que avaliaram os sistemas de liberação controlada contendo fragmentos de peptídeos visando à prevenção da cárie dentária (BERNEGOSSI et al., 2015). Calixto et al. (2016) avaliaram um sistema líquido cristalino desenvolvido a partir de polyoxypropylene-(5)-polyoxyethylene-(20)-cetyl alcohol (PPCA), óleo de melaleuca (tea tree oil – TTO) e policarbophil contendo P1025 e observaram boas propriedades reológicas e capacidade mucoadesiva, porém a ação antimicrobiana de P1025



contida no sistema não foi avaliada. Assim, os objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar sistemas de liberação nanoestruturados para a incorporação dos fragmentos peptídicos D1-23 ou P1025 e avaliar sua atividade contra biofilme de *S. mutans* e citotoxicidade.

## REFERÊNCIAS

1. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc.* 2003;36(4):247-252.
2. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem.* 2011;18(2):256-279.
3. Benergossi J, Calixto G, Fonseca-Santos B, Aida KL, de Cássia Negrini T, Duque C, Gremião MP, Chorilli M. Highlights in peptide nanoparticle carriers intended to oral diseases. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(4):345-355.
4. Calixto GM, Garcia MH, Cilli EM, Chiavacci LA, Chorilli M. Design and Characterization of a Novel P1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. *Molecules.* 2016 Jan 28;21(2):158.
5. Carlén A, Olsson J. Monoclonal antibodies against a high-molecular-weight agglutinin block adherence to experimental pellicles on hydroxyapatite and aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1995;74(4):1040-1047.
6. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Scarpa MV. Development of liquid-crystalline systems using silicon glycol copolymer and polyether functional siloxane. *Quím Nova.* 2009;32(4):1036-1040.
7. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral Biofilm: emerging concepts in microbiol ecology. *J Dent Res.* 2010;89(1):8-18.
8. Gajdziok J, Bajzerová M, Chalupová Z, Rabisková M. Oxycellulose as mucoadhesive polymer in buccal tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010;36(9):1115–1130.
9. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Cur Eye Res.* 2005;30(7):505-515.
10. Gorr, SU, Abdolhosseini, M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2011;38:126-141.
11. Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov Today.* 2010;15(23-24):1032-1040.
12. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. *Drug Target Insights* 2007;2:147-157.

13. Hamada S, Slade HD. Biology immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44(2): 331-384.
14. Kang ML, Cho CS, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. Biotechnol Adv. 2009;27(6):857–886.
15. Kelly CG, Younson JS, Hikmat BY, Todryk SM, Czisch M, Haris PI, Flindall IR, Newby C, Mallet AI, Ma JK, Lehner T. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. Nat Biotechnol. 1999;17(1):42-47.
16. Kreling PF, Aida KL, Massunari L, Caiaffa KS, Percinoto C, Bedran TB, Spolidorio DM, Abuna GF, Cilli EM, Duque C. Cytotoxicity and the effect of cationic peptide fragments against cariogenic bacteria under planktonic and biofilm conditions. Biofouling. 2016;32(9):995-1006.
17. Lee SF, Progulsk-Fox A, Erdos GW, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ, Bleiweis AS. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). Infec Immun. 1989;57(11):3306-3313.
18. Li MY, Wang J, Lai GY. Effect of a dentifrice containing the peptide of streptococcal antigen I/II on the adherence of mutans streptococcus. Arch Oral Biol. 2009;54(11):1068-1073.
19. Loftsson T, Leeves N, Bjornsdottir B, Duffy L, Masson M. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and sub-stantivity in toothpastes in vivo. J Pharm Sci. 1999;88(12):1254–1258.
20. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. Compend Contin Educ Dent. 2009;30 (2): 76-8, 80, 83-7; quiz 88, 90.
21. Marsh, PD. Contemporary perspective on plaque control. Br Dent J. 2012;212(12): 601-606.
22. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. Periodontol 2000. 2010;54(1):195–206.
23. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides. {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. J Antimicrob Chemother. 2005;55(6):888-896.
24. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. J Control Release. 2011;153(2):106–116.

25. Reynolds NL, De Cecco M, Taylor K, Stanton C, Kilanowski F, Kalapothakis J, Seo E, Uhrin D, Campopiano D, Govan J, Macmillan D, Barran P, Dorin JR. Peptide fragments of a beta-defensin derivative with potent bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1922-9.
26. Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1666– 1691.
27. SBBRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, abr. 2010. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/projeto\\_sb2004.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/projeto_sb2004.pdf). Acesso: 16/01/2016.
28. Smith DJ. Caries vaccines for the twenty-first century. *J Dent Educ.* 2003;67(10): 1130-1139.
29. Veuillez F, Kalia YN, Jacques Y, Deshusse J, Buri P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *Eur J Pharmac and Biopharm.* 2001;51(2):93-109.
30. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides – the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010;1(5):440-464.
31. Younson J, Kelly C. The rational design of an anti-caries peptide against *Streptococcus mutans*. *Mol Divers.* 2004; 8(2):121–126.
32. Zhang L, Falla TJ. Host defense peptides for use as potential therapeutics. *Cur Opin Investig Drugs.* 2009;10(2):164-171.