

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA-ARARAQUARA**

JÉSSICA ÉLLEN DE OLIVEIRA

**ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPOSSOMAS
ASSOCIADOS À PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 VISANDO O COMBATE DE *CANDIDA ALBICANS***

**Araraquara, SP
2022**

Jéssica Éllen de Oliveira

**ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPOSSOMAS
ASSOCIADOS AO PEPTÍDEO ANTIFÚNGICO DERIVADO DA HISTATINA-5
VISANDO O COMBATE DE *CANDIDA ALBICANS***

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Instituto
de Química- Unesp Araraquara,
como requisito para obtenção do
título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

**Araraquara
2022**

O48e Oliveira, Jéssica Ellen de
Estudos de caracterização e aplicação de lipossomas associados ao peptídeo antifúngico derivado da Histatina-5 visando o combate de Candida albicans / Jéssica Ellen de Oliveira. -- Araraquara, 2022
112 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Saulo Santesso Garrido

1. Lipossomas. 2. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 3. Candidíase. 4. Biofilmes. 5. Candida albicans. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudos de caracterização e aplicação de lipossomas associados à peptídeos antifúngicos derivados da Histatina-5 visando o combate de *Candida albicans*"

AUTORA: JÉSSICA ELLEN DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Por:

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES (Participação Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto



Por:

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Tupã

Araraquara, 19 de agosto de 2022

Dados curriculares

Atividades acadêmicas relevantes (Monitorias, Estágio-docência, Palestras, etc):

Projetos de extensão:

Ações voltadas para questões de saúde na região de Londrina realizadas por estudantes do curso de farmácia da Uel e o Conselho Regional de Farmácia Junior (CRF-JR)

Colaboração: Conselho Regional de Farmácia Paraná.

Início: 2013.

Término: 2014.

Desenvolvimento de habilidades práticas no laboratório de análises clínicas- Setor de Urgência- Hospital Universitário de Londrina.

Docente Responsável: Jair Aparecido de Oliveira.

Início: 2014.

Término: 2014.

Projetos de desenvolvimento:

INCT MPCPAGRO FASE II- Microrganismos promotores do crescimento de plantas visando à sustentabilidade agrícola e à responsabilidade ambiental – (CNPQ 465133/2014-4, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-STI, CAPES).

Docente responsável: Elisete Pains Rodrigues.

Início: 2019

Término: 2021

Curso de férias:

11ª GENÉTICA NAS FÉRIAS-Promovido pelo(a) Departamento de Biologia Geral Do(a)centro de Ciências Biológicas, realizado no período de 11 a 13 de setembro de 2017, na qualidade de ministrante.

Carga horária: 8 hs.

1. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

RAMOS L, L; RODRIGUES E, P; SILVA M, B; OLIVEIRA J, E; ZULUAGA M, Y, A; MILANI, K M L; OLIVEIRA A, L, M. Ammonium excretion, auxin production and effects of maize inoculation with ethylenediamine-resistant mutant of *Pseudomonas* sp. **Bragantia**, v. 77, n. 3, p.415-428, 2018.

Submetido: 4 de junho de 2017

Aceito: 14 de novembro de 2017

DOI:<https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017190>

JARDIM, A, A; OLIVEIRA, J, E; ALVES, L, M; GUTUZZO, G, O; OLIVEIRA, A, L, M; RODRIGUES, E, P. RODRIGUES E, P. Diversity and antimicrobial potential of the culturable rhizobacteria from medicinal plant. *Baccharis trimera* Less D.C. Brazilian Journal of **Microbiology**.

Submetido: 29 de abril, 2022.

2. Participação em eventos científicos:

Congresso

“XIX Congresso Farmacêutico de São Paulo, XI Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Expofar 2017”, realizado no período de 06 a 08 de outubro de 2017, no Centro de Convenções Frei Caneca -São Paulo - SP, como congressista.

Carga Horária: 24 hs.

Simpósio

“XIII Simpósio de experiências e pesquisas integradas de ensino, serviços e comunidade-SEPIESC e VI Mostra Científica do CCS, realizado em novembro de 2013 e promovido pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade

Estadual de Londrina (UEL)”, Pesquisa sobre utilização correta do glicosímetro utilizados por portadores de diabetes *mellitus* da UBS do Jardim do Sol, como apresentadora oral.

Carga Horária: 3 hs.

“I Simal- I Simpósio de alimentos”, realizado em maio de 2017 e promovido pelo Centro de Ciências Agrárias e pelo Centro Acadêmico 5 de Maio, como integrante da comissão organizadora.

Carga Horária: 12 hs.

“II Simpósio de saúde da população negra da Universidade Estadual de Londrina”, promovido pelo departamento de Saúde Coletiva do Centro de Ciências da Saúde, realizado no dia 15 de dezembro de 2017, como participante.

Carga Horária: 9 hs.

Encontro

“I Encontro Científico de Pós-graduação em Ciências da Saúde”, realizado em maio de 2014, promovido Centro de Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), como integrante da comissão organizadora.

Carga Horária: 9 hs.

“I Encontro de Ciclos em Serviços Farmacêuticos Clínicos da Universidade Estadual de Londrina”, realizado no período de 7 fevereiro a 13 de junho de 2014, como integrante da comissão organizadora.

Carga Horária: 40 hs.

“4º Encontro Anual de Iniciação Tecnológica, Melhoramento genético de *Penicillium pinophilum* para eficiência de solubilização de fosfato mineral”, realizado nos dias 30 a 31 de outubro de 2014, na Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), como apresentadora oral.

“XXVI Encontro Anual de Iniciação da Uel (EAIC), Avaliação de biossurfactantes associativos a planta medicinal *Baccharis trimera*”, realizado no período de 25 a 27 de outubro de 2017, como apresentadora oral.

Carga Horária: 16 hs

Curso de férias

3. Outros:

2013

Campanha 05 de maio “Pelo uso racional de medicamentos”, realizado no dia 4 de maio 01.

Carga Horária: 8 hs.

Curso sobre as diferentes áreas de atuação de profissional farmacêutico, realizado

no período de 20 a 24 de maio de 2013.

Carga Horária: 6 hs.

2013-2014

Bolsista do Programa de Iniciação Tecnológica (PROITI), desenvolvendo atividades relativas à pesquisa no projeto 8785, intitulado: “Desenvolvimento de fertilizantes fosfatado e potássicos a partir de rochas marginais e subprodutos da mineração”

2014

Campanha de Prevenção à Obesidade, realizado no dia 11 outubro de 2014.
Carga Horária: 6 hs.

2014-2015

Bolsista do Programa de Iniciação Tecnológica (PROITI), desenvolvendo atividades relativas à pesquisa no projeto 7565, intitulada: "Bioprospecção de microrganismos endofíticos com atividade antimicrobiana”.

2015-2016

Bolsista do Programa de Iniciação Tecnológica (PROITI), desenvolvendo atividades relativas à pesquisa no projeto 9140, intitulada: "Estudo da diversidade de bactérias endofíticas da planta medicinal *Baccharis trimera* (Asteraceae) e avaliação do potencial biotecnológico dos isolados quanto à produção com atividade antimicrobiana”.

2016

IV Curso de atualização em tecnologias farmacêuticas aplicadas (ATEFA)- Farmacêutico generalista, realizado no período de 21 a 23 de junho de 2016.
Carga Horária: 16 hs.

2016-2017

Bolsista do Programa de Iniciação científica (PROIC), desenvolvendo atividades relativas à pesquisa no projeto 9609, intitulada: "Isolamento seletivo de bactérias com atividade promotora do crescimento em tomate (*SOLANUM LYCOPERSIUM* L.) a partir de comunidades microbianas do solo buscando a obtenção de candidatos ao desenvolvimento de bioprodutos compatíveis com manejo de produção”

2018

“VII FEIRA DAS PROFISSÕES: CONHECENDO A UEL”, promovido pela Pró-Reitoria de Graduação, da Universidade Estadual de Londrina, realizado no dia 26 de junho de 2018, como comissão organizadora.
Carga Horária: 30 hs.

2020

II Simpósio de Empreendedorismo e Inovação em Biotecnologia – SEI BIOTEC realizado no dia 5 de outubro.
Carga Horária: 10 hs.

X Four Biotec - Quatro dias pela Biotecnologia (ProEx/UFSCar 23112.008498/2020-49), realizado de 30 de outubro a 02 de novembro de 2020.

Carga Horária: 14 hs.

I Semana Bioquímica Aplicada, promovida pelo Grupo de Estudos em Bioquímica

Aplicada da Universidade Federal de Viçosa (GEBQI/UFV), realizada de 9 a 13 de novembro de 2020.

Carga Horária: 12 hs.

2021

“3ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp (3ª EMMUnesp)”, realizada virtualmente entre 11 a 15 de Janeiro de 2021.

Dedicatória

“Teu passado é uma bandeira. Teu presente é uma lição...”
ao Oliveira Bernardes (avô), o mestre da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Doutor Saulo Santesso Garrido, pela oportunidade e confiança ao meu trabalho, exercido com total comprometimento e carinho.

A minha família pelo apoio nos momentos mais obscuros e pelo fortalecimento na minha busca por novos conhecimentos.

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

Ao Instituto de Química, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Unesp de Araraquara, pelo conhecimento herdado.

Ao Departamento de Físico-Química, no Instituto de Química, da Unesp de Araraquara, pela infraestrutura e análises que permitiram valiosas compreensões sobre o trabalho.

À faculdade de odontologia, em especial a Dra. Paula Aboud Barbugli que proporcionou imagens cruciais ao trabalho em um momento complexo para ocorrerem compartilhamentos de ideias ou análises.

Aos colegas de Londrina que hoje fazem parte da família e me emocionam a cada saudosismo que trazemos ao presente. Fomos e seremos sempre o “Chiuna”.

Aos colegas de laboratório, em especial José Gregório, Naiara Maia e Beatriz Sanches pelo carinho recebido, boas conversas e os “abraços à distância” que auxiliaram a ultrapassar as dificuldades do dia-a-dia.

Ao grupo do Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido pelos ensinamentos.

A todos que puderam fazer a diferença nos menores detalhes, Jonatas, Beatriz e Leonardo dos laboratórios parceiros.

Agradeço ao meu namorado Reginaldo Caldeira pela parceria, afeto, risadas e conversas incríveis.

Aos aprendizados da vida que fazem a diferença para acreditar em nossos propósitos e que mesmo nos momentos mais difíceis possamos encontrar paz e felicidade, ao entendermos que tudo somente faz parte do processo.

Oliveira, J.E. Estudos de caracterização e aplicação de lipossomas associados à peptídeo antifúngicos derivados da Histatina-5 visando o combate de *Candida albicans*. [Dissertação de mestrado em biotecnologia]. Araraquara. Instituto de Química.

Resumo

Os lipossomas PEGuilados apresentam capacidade de duração *in vivo* capaz de realizar a liberação prolongada de moléculas, esta ação, pode ser um fator capaz inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e a formação de biofilme. Assim, a proposta deste trabalho consiste no desenvolvimento de formulações PEGuiladas associada ao derivado de Histatina-5, 0WHistatina-5, para tratamento de candidíase oral e inibição de biofilmes orais formadas por *Candida albicans*. Para isso, foi aplicado o método de síntese de peptídeo em fase sólida, utilizada a cromatografia de alta eficiência e caracterização em espectrometria de massas com ionização por eletrospray modo positivo (LC/ESI-MS+) para obtenção dos derivados de 0WHistatina-5 e 1WHistatina-5, com obtenção dos peptídeos foram realizadas as análises antimicrobianas de concentração inibitória mínima (CIM), no qual 0WHistatina-5 demonstrou atividade inibitória a 1,03 µg/mL, sendo o peptídeo escolhido para as demais análises. Para os sistemas lipossomais foi proposto o método de evaporação em fase reversa, o qual, permitiu a associação aos derivados peptídicos em até 88,65% de eficiência para o peptídeo 0WHistatina-5. Visando a caracterização morfológica, os lipossomas foram analisados por técnica de espalhamento de luz dinâmico com estabilidade a 4°C por 42 dias, tendo como desestruturação em pH 4,5 sendo um fator de seletividade. As análises de variação de temperatura de 0°C a 100°C por calorímetro diferencial de varredura e dicroísmo circular evidenciaram a interação entre o sistema lipossomal PEGuilado e o peptídeo 0WHistatina-5. Para curva de crescimento e cinética de morte, ensaio de morte celular, viabilidade celular por resazurina (AlamarBlue®) e microscopia confocal com aplicação de calcofluor-white, Concanavalina A e isocianato de fluoresceína foi utilizada a cepa ATCC 10231 resistente ao fluconazol e produtora de biofilme orais. Tais, técnicas permitiram inferir que a formulação composta por fosfolípido e polietilenoglicol (PP) gerou a liberação prolongada do peptídeo antifúngico 0WHistatina-5 após 12 horas com inibição parcial do microrganismo, assim como as células presente no biofilme. Portanto, o método de evaporação reversa demonstrou-se eficiente para associação de macromoléculas em sistemas lipossomais de segunda geração, como os lipossomas PEGuilados gerando efeito prolongado do peptídeo 0WHistatina-5.

Key-words: Lipossomas, liberação prolongada, peptídeos catiônicos, peptídeos antimicrobianos, *Candida albicans*.

Oliveira, J.E. Estudos de caracterização e aplicação de lipossomas associados à peptídeos antifúngicos derivados da Histatina-5 visando o combate de *Candida albicans*. [Dissertação de mestrado em biotecnologia]. Araraquara. Instituto de Química.

Abstract

PEGylated liposomes have the ability to last in vivo capable of carrying out the prolonged release of molecules and this action may be a factor capable of inhibiting the growth of pathogenic microorganisms and the formation of biofilms. Thus, the purpose of this work is the development of PEGylated formulations associated with the Histatin-5 derivative, 0WHistatin-5, for the treatment of oral candidiasis and inhibition of oral biofilms formed by *Candida albicans*. For this, the solid phase peptide synthesis method was applied, using high performance chromatography and characterization in positive mode electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS+) to obtain the 0WHistatin-5 and 1WHistatin-5 derivatives to obtain the peptides, antimicrobial analyses of minimal inhibitory concentration (MIC) were performed, in which 0WHistatin-5 showed inhibitory activity at 1.03 µg/mL being the peptide, 0WHistatin-5 chosen for the other analyses. For liposomal systems, the reversed-phase evaporation method was proposed, which allowed the association with peptide derivatives in up to 88.65% efficiency for the 0WHistatin-5 peptide. Aiming at morphological characterization, the liposomes were analysed by dynamic light scattering technique with stability at 4°C for 42 days, with destructuring at pH 4.5 being a selectivity factor. The analysis of temperature variation from 0°C to 100°C by differential scanning calorimeter and circular dichroism showed the interaction between the PEGylated liposomal system and the 0WHistatin-5 peptide. For the growth curve and death kinetics, cell death assay, cell viability by resazurin (AlamarBlue®) and confocal microscopy with application of calcofluor-white, Concavalin A and fluorescein isocyanate, fluconazole-resistant strain ATCC 10231 was used oral biofilm. Such techniques allowed us to infer that the formulation composed of phospholipid and polyethylene glycol (PP) generated the prolonged release of the antifungal peptide 0WHistatin-5 after 12 hours with partial inhibition of the microorganism, as well as the cells present in the biofilm. Therefore, the reverse evaporation method proved to be efficient for the association of macromolecules in second-generation liposomal systems, such as PEGylated liposomes, generating a prolonged effect of the 0WHistatin-5 peptide.

Keywords: Liposomes, extended release, cationic peptides, antimicrobial peptides, *Candida albicans*.

Figura 1 - Visão geral da formação do biofilme da levedura <i>C. albicans</i> estruturada em quatro etapas	26
Figura 2 - Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i>	27
Figura 3 - Interações <i>Candida</i> -estreptocócicas e doenças bucais.....	29
Figura 4 - Polimorfismo de <i>Candida albicans</i>	30
Figura 5 - Manifestações clínicas da candidíase oral.....	33
Figura 6 - Família das histatinas e os fragmentos menores.....	35
Figura 7 - Modo de ação do Hst 5 através de diferentes mecanismos.....	38
Figura 8 - Estrutura de bicamada lipídica e tipos de lipossomas.....	41
Figura 9 - Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).....	47
Figura 10 - Diagrama de Jabloski para fluorescência.....	51
Figura 11 - Sequência de aminoácidos da estrutura primária de histatina-5 e derivados após adição de triptofano.....	52
Figura 12 - Esquema representativo da formação de lipossomas (PP) associado ao peptídeo 0Whst-5 pelo método de evaporação em fase reversa.....	52
Figura 13 -Representação do crescimento microbiano em um sistema controlado.....	61
Figura 14 - Análise das massas obtidas após processo de purificação por CLAE em modo analítico por método UV/Vis com detecção de 220nm.....	69
Figura 15 - Curva espectrofotômetro 0Whst-5 em tampão Tris-HCl.....	71
Figura 16 - Curva espectrofotômetro 0Whst-5 em metanol.....	71
Figura 17 - Curva espectrofluorimetria de 0Whst-5 em tampão Tris-HCl.....	71
Figura 18 - Curva espectrofluorimetria de 0Whst-5 em metanol.....	71
Figura 19 - Curva espectrofluorimetria de 0Whst-5 em tampão Tris-HCl.....	72
Figura 20 - Curva espectrofluorimetria de 0Whst-5 metanol.....	72
Figura 21 - Concentração inibitória mínima dos derivados de histatina-5 em comparação a histatina-5.....	73

Figura 22 - Espectro de fluorescência dos derivados peptídicos de histatina-5.....	74
Figura 23 - Microscopia de transmissão eletrônica das vesículas lipossomais PEGuilados produzidos pelo método de fase reversa.....	79
Figura 24 - Estabilidade dos sistemas lipossomais vazios e associado ao peptídeo 0Whst-5.....	82
Figura 25 - Análise de calorimetria diferencial de varredura dos lipossomas PP e PPC vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5.....	85
Figura 26 - Análise do dicróismo circular do peptídeo 0whst-5 e estão associados aos lipossomas PEGuilados PP e PPC.....	87
Figura 27 - Ensaios de Time-Kill dos lipossomas PEGuilados vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5 contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	88
Figura 28 - Ensaios de Time-Kill de lipossoma PEGuilado vazio e associado 0whst-5 contra ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i>	90
Figura 29 –Análises de viabilidade celular e formação de biofilme em adsorção aos sistemas lipossomais.....	92
Figura 30 - Porcentagem de células viáveis de <i>Candida albiens</i> após aplicação dos sistemas lipossomais, peptídeo livre e fluconazol em diferentes tempos de maturação do biofilme.....	94
Figura 31 - Microscopia eletrônica de varredura de ATCC 10231 para aproximação de 10 µm após 48 horas de crescimento.....	95
Figura 32 - Formação de biofilme em adsorção ao lipossoma PEGuilado.....	97

Tabelas

Tabela 1- Método de purificação do peptídeo OWhistatina-5.....	49
Tabela 2 - Constituintes dos sistemas lipossomais.....	54
Tabela 3 - Morfologia dos lipossomas PEGuilados após 24 horas de preparação.....	76
Tabela 4 - Estabilidade dos lipossomos.....	77
Tabela 5 - Máximo de emissão de fluorescência medidos a 360 nm obtidos pelas formulações da porção retida pelo filtro e do filtrado após tratamento com metanol.....	80

Abreviaturas

Aminoácidos

Ala (A) – Alanina

Arg (R) – Arginina

Asn (N) – Asparagina

Asp (D) – Ácido Aspártico

Cys (C) – Cisteína

Gln (Q) – Glutamina

Glu (E) – Ácido Glutâmico

Gly (G) – Glicina

His (H) – Histidina

Ile (I) – Isoleucina

Leu (L) – Leucina

Lys (K) – Lisina

Met (M) – Metionina

Phe (F) – Fenilalanina

Pro (P) – Prolina

Ser (S) – Serina

Thr (T) – Treonina

Trp (W) – Triptofano

Tyr (Y) – Tirosina

Val (V) – Valina

Outras

AIDS- síndrome da imunodeficiência adquirida

ACN – Acetonitrila

ALS- Proteína semelhante a aglutinina

ATP – Adenosina trifosfato

Ca – Cálcio

Chol – Colesterol

COL- Colesterol

CIM – Concentração inibitória mínima

COVID-19-Coronavírus

CWP1- Proteína de membrana

DCM – Diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DIEA – N-Diisopropiletilamina

DLS – Dynamic Light Scattering

DLVO- Derjaguin Landau Verwey Overbeek

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDT – 1,2-Etanoditiol

EE – Eficiência de encapsulação

Efg1- gene responsável pela alteração de cor em *Candida albicans*

EPS- Exopolissacarídeos

ERO's – Espécies reativas de oxigênio

ESI-MS – Electron Spray ionization-Mass spectrometry

FLU- Fluconazol

Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonila

0WHST-5- Derivado de histatina-5

1WHST-5- Derivado de histatina-5

H₂O – água

HAGs- genes associadas a formação de hifas

HST-5 – histatina-5

HCl – Ácido clorídrico

HD- Raio hidrodinâmico

HOBt – N-Hidroxibenzotriazol

HOG1- Gene de *Candida albicans*

HPLC - High performance liquid chromatography

HWP1- Proteína de membrana

IPD – índice de polidispersividade

KDa – quilodalton

LUV – Large Unilamellar Vesicles

MAP- Proteína de membrana

MAPK- Proteína quinase

MLV – Multilamellar Large Vesicles

NaCl – Cloreto de sódio

NADH- Nicotinamina adenosina de nucleotídeo

Nrg1- Promotor de HAGs

O₂- gás oxigênio

OPAS- Organização Pan Americana Mundial da Saúde

PEG – Polietilenoglicol

POPG - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol

PP- PEG200 e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol

PPC- PEG200, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol e colesterol

PP-0whst-5 - PEG200 e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol com peptídeo 0whistina-5 associado.

PPC-0whst-5- PEG200, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol e **colesterol** com peptídeo 0whistatin-5 associado.

PH- Potencial de hidrogenação.

SPFS – Síntese de peptídeos em fase sólida

SUV – Small Unilamellar Vesicles

TFA – Ácido Trifluoracético

TFE – Trifluoretanol

TIS – Triisoproplisilano

T_c – Temperatura de transição de fase

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Wor1- gene responsável pela alteração de cor em *Candida albicans*

Zn- Zinco

Sumário

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Figuras.....	III
Tabelas.....	IV
Abreviaturas.....	V
1. Introdução.....	21
1.1 Candidíase oral e fatores de virulência.....	24
1.1.1 Adesão à mucosa oral.....	24
1.1.2 Biofilme de <i>Candida albicans</i>	25
1.1.3 Dimorfismo celular	30
1.1.4 Manifestações clínicas.....	31
1.2 Peptídeos antimicrobianos.....	33
1.2.1 Peptídeos de saliva humana.....	33
1.2.2 Família das histatinas.....	34
1.2.3 Atividade anticandida de Hst-5.....	36
1.2.4 Histatina-5 e a veiculação a sistemas lipídicos.....	39
1.3 Lipossoma associado ao peptídeo.....	39
1.3.1 Estrutura lipossomal.....	39
1.3.2 Associação e encapsulação.....	41
1.3.3 Lipossomas associados à peptídeos antimicrobianos.....	42
1.3.4 Lipossomas e biofilmes microbianos.....	43
2. Objetivos.....	44
3. Material e métodos.....	46
3.1 Material.....	46
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Síntese de peptídeos.....	44
3.2.2 Clivagem de peptídeos.....	48
3.2.3 Purificação e caracterização de peptídeos.....	48
3.2.4 Quantificação do peptídeo.....	49
3.2.5 Análise fluorescência.....	50
3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos peptídeos livres.....	51

3.3.1 Preparo dos inóculos para ensaio.....	52
3.3.2 Metodologia de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	52
3.4 Desenvolvimento das formulações.....	53
3.4.1 Preparo dos lipossomas.....	53
3.4.2 Extrusão.....	55
3.5 Caracterização morfológica e estabilidade.....	56
3.5.1 Caracterização física dos lipossomas.....	56
3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (<i>TEM</i>).....	57
3.5.3 Eficiência de encapsulação.....	58
3.5.4 Estudo de estabilidade.....	59
3.5.5 Variação de pH.....	59
3.5.6 Variação de temperatura (Calorímetro diferencial de varredura).....	60
3.5.7 Dicroísmo circular.....	60
3.6 Análise microbiológica dos sistemas associados ao peptídeo selecionado 0whst-5.....	61
3.6.1 Curva de crescimento microbiano e cinética de morte.....	61
3.7. Atividades microbiológicas do sistema (PP) mais eficiente.....	62
3.7.1 Ensaio de morte celular.....	62
3.7.2 Preparo do inóculo para biofilme e viabilidade celular.....	63
3.7.3 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	64
3.7.4 Viabilidade celular.....	64
3.8 Análise em microscopia confocal e microscopia de varredura eletrônica.....	65
3.8.1 Microscopia confocal.....	65
3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
3.9 Estatísticas.....	68
4. Resultados e discussão.....	68
 4.1 Síntese, clivagem, purificação e caracterização dos peptídeos...68	
4.2 Curvas analíticas de 0whst-5.....	70

4.3 Concentração inibitória mínima dos peptídeos.....	72
4.4 Estudos de fluorescência da associação do peptídeo 0Whst-5 em lipossomas PEGuilados.....	73
4.5 Caracterização morfológica do peptídeo selecionado derivado de histatina-5.....	75
4.5.1 Caracterização morfológica.....	75
4.5.2 Análise de estabilidade dos sistemas.....	77
4.5.3 Eficiência de associação.....	79
4.5.4 Avaliação da eficiência de associação do peptídeo 0Whst-5 nos sistemas lipossomais.....	79
4.5.5 Estudos calorimétricos com as formulações lipossomais.....	83
4.5.6 Estudos de dicroísmo Circular.....	86
4.6 Estudos de atividade antifúngica dos sistemas lipossomais.....	87
4.6.1 Curva de crescimento e morte celular de <i>Candida albicans</i>	87
4.6.2 Análise da capacidade antifúngica do sistema selecionado visando a inibição do biofilme por <i>Candida albicans</i>	89
4.6.3 Ensaio de morte.....	89
4.6.4 Estudo de viabilidade celular por microscopia confocal.....	91
4.6.5 Estudo de viabilidade celular por rezasurina.....	93
4.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	94
4.6.7 Microscopia confocal e FITC.....	97
5. Conclusão.....	100
6. Referências.....	101

1. Introdução

Os fungos patogênicos de maior prevalência nas infecções de mucosas bucais e vaginais ocorrem através da espécie *Candida albicans*, levedura dimórfica, comensal presente na microbiota geniturinária, gastrointestinal e oral. Contudo, frente a um desequilíbrio do sistema imunológico dos indivíduos ou comprometimento do tecido mucocutâneo por lesões e ulcerações este fungo tornar-se invasivo, desenvolvendo células com capacidade de virulência (DOMINGUEZ et al., 2019).

Na fase de patogenia de *Candida albicans* os tecidos epiteliais são afetados e como consequência há o surgimento do processo infeccioso. Ação em que as manifestações clínicas podem variar de ausência de sintomas ao surgimento de alterações locais, como descamação tecidual, dor, vermelhidão, prurido. Além disso, a forma invasiva de *Candida albicans* pode disseminar e promover a infecção sanguínea, estado que ocasiona desequilíbrio homeostático nos hospedeiros e comprometimento nas funções fisiológicas dos órgãos, um quadro clínico que pode evoluir à septicemia e possível morte do indivíduo infectado (HENRIQUES e WILLIAMS, 2020).

As infecções micóticas geradas por *Candida albicans*, devem-se ao fato, deste microrganismo possuir adaptação metabólica, morfológica e genética, características que conferem adesões e estabilidade a diferentes tecidos e aos materiais sintéticos; alterações pós traducional nas quais permitem a interação com hospedeiro; modificações estruturais resultantes do crescimento celular e a presença de mecanismo de resistência aos antifúngicos (BARVEDO e SGARBI, 2010; CALDERONI e FONZI, 2001).

Entre os diferentes mecanismos de resistência gerado por *Candida albicans* decorrem a formação do biofilme. Constituído a partir da agregação celular, o biofilme é um mecanismo de resistência extracelular composto, em sua maior parte, por polissacarídeos e permite a estabilização das células às superfícies ocasionando também em proteção e coesão do microrganismo. Como resultado são geradas novas células com capacidade de virulência, hábeis para aderir a novos locais (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; NOBILE; JOHNSON, 2015; TALAPKO et al., 2021).

Na cavidade os biofilmes orais são gerados a partir do comprometimento do tecido da mucosa e também através da associação aos biofilmes polimicrobianos, como os ocasionados por bactérias como *Streptococcus mutans*. Os biofilmes polimicrobianos são rígidos e complexos, dentro da estrutura são exercidas interações mutualísticas entre os microrganismos que possibilita o fungo à aderência na cavidade bucal (CHEVALIER *et al.*, 2018; MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; NOBILE; JOHNSON, 2015;).

Em indivíduos saudáveis os biofilmes orais formados por *Candida albicans* podem ser inibidos devido a atividade salivar. A saliva é um fluido biológico com capacidade de desempenhar inúmeras funções com alta relevância para manutenção da saúde bucal. Sendo composta por minerais, eletrólitos, água, tampões, peptídeos antimicrobianos entre outros componentes. A saliva permite, entre diversas funções, a digestão de alimentos, pH neutro, remineralização dos dentes e especificamente através dos peptídeos antimicrobianos impede a aderência dos microrganismos patogênicos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; PUY, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas formadas por 12-50 resíduos de aminoácidos unidos entre si por ligações amida (denominadas peptídicas), apresenta carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico e uma estrutura anfipática (LAI; GALLO, 2009). Os peptídeos antimicrobianos são capazes de agir sobre os microrganismos patogênicos por meio da interação com as superfícies das membranas microbianas ou constituintes celulares. Ao depositar na membrana os peptídeos causam lise, levando as células à morte. Alguns peptídeos como os presentes na família das histatinas ultrapassam a membrana plasmática e atuam sobre organelas impedindo a funcionalidade das células (HELMERHORST *et al.*, 2006; PURI; EDGERTON, 2014).

As histatinas corresponde uma família de 12 peptídeos antimicrobianos com baixo peso molecular, ricas em histidina. Presentes na saliva humana, as histatinas exibem atividades contra ao desenvolvimento de fungos patogênicos, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Em relação a *Candida albicans*, especificamente a histatina-5 pode gerar efluxo de ATP e desequilíbrio osmótico nas mitocôndrias de *Candida albicans*, entre

outros mecanismos não totalmente elucidados, impedindo a célula de executar a respiração celular e liberar componentes extracelulares como os exopolissacarídeos. (HELMERHORST et al., 2006; PURI; EDGERTON, 2014)

Devido à atividade anticandida gerada pela histatina-5, este peptídeo torna-se uma alternativa terapêutica aos antifúngicos existentes atualmente que apresentam baixa sensibilidade devido ao desenvolvimento de biofilme (HELMERHORST et al., 2006; MOFFA et al., 2011; PURI; EDGERTON, 2014; SHARMA et al., 2021).

No entanto, imunossupressão, neoplasias, baixa produção salivar e idade diminuem a produção de histatina-5, o que aumenta a incidência de infecções fúngicas orais. Ao associar o peptídeo a formulações lipídicas, como os lipossomas, podem ser gerados transportadores e agente de proteção contra ação de enzimas proteolíticas levando a histatina-5 aos locais de infecção (ZAMBOM et al., 2020).

Os lipossomas são formulações lipídicas, constituídas por camadas unilamelares ou multilamelares, automoldáveis, circundadas por um compartimento central aquoso (CARITA et al., 2018). Em razão da presença de fosfolípidios em sua composição, os lipossomas podem se agrupar em bicamadas formando uma estrutura mimética às membranas celulares. A constituição dos lipossomas pode ocorrer de forma diversificada, com modificações na estrutura por PEGuilação. A adição de polietilenoglicol aumenta o tempo de circulação dos lipossomas, a hidrofiliabilidade e diminui uma possível toxicidade dos ativos associados (ELERAKY et al., 2020; GUPTA et al., 2019).

Nas últimas décadas, a aplicação de lipossomas para liberação de fármacos implica em melhorias farmacocinéticas e farmacodinâmicas para compostos encapsulados ou associados. Portanto, o presente estudo visa realizar a associação do derivado da histatina-5 (OWhistatina-5) ao lipossoma PEGuilado, com o objetivo de compreender as possíveis modificações estruturais realizadas em *Candida albicans* para prevenir a formação de biofilme na cavidade oral e o desenvolvimento de candidíase oral.

1.1 Candidíase oral e fatores de virulência

1.1.1 Adesão à mucosa oral

A candidíase oral é a infecção mais comum presente nas mucosas bucais e, nas últimas décadas, tem demonstrado aumento significativo na população, sendo *Candida albicans* responsável por 80-95% dos casos. A candidíase oral pode afetar a mucosa bucal e em conjunção aos biofilmes polimicrobianos proporciona o desenvolvimento de cárie dental e periodontites (DANGI *et al.*, 2010; GARCIA-CUESTA *et al.*, 2014; VILA *et al.*, 2018).

Os fatores predisponentes na população, tais como a síndrome da imunodeficiência humana adquirida (*AIDS*), alterações endócrinas, xerostomia, uso de corticosteróides, antibióticos de amplo espectro, neoplasias também proporcionam o desenvolvimento oportunista de *Candida albicans* (EPSTEIN *et al.*, 2002; FARAH *et al.*, 2000; FARAH *et al.*, 2010; GONSALVES, *et al.*, 2007; SCULLY, 2003).

As infecções micóticas decorrentes de *Candida albicans* são geradas principalmente, ao fato deste microrganismo possuir adaptação metabólica, morfológica, genética e alterações pós-traducionais que conferem adesões e estabilidade a diferentes tecidos e materiais sintéticos (BARVEDO; SGARBI, 2010; CALDERONI; FONZI, 2001). Tais adaptações partem inicialmente da adesão do microrganismo no tecido da mucosa, o qual necessita de uma somatória de fatores para ocorrer em razão da incompatibilidade de cargas superficiais entre *C. albicans* e a mucosa bucal (KAPTEYN *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2013).

Em parte, as interações de Van-der-Waals, movimentos brownianos e repulsão da dupla camada das membranas formam a base para teoria de Derjaguin Landau Verwey Overbeek (DLVO), que descreve que a força repulsiva entre duas superfícies carregadas negativamente envolvidas por um líquido interposto, somada a energia livre das superfícies tornam a termodinâmica das células do microrganismo e mucosa oral estáveis (WILLIAMS *et al.*, 2013)

A estabilidade termodinâmica permite que as moléculas adesinas presentes em *Candida albicans* façam interação com a mucosa oral. Proteínas com sequência semelhante à aglutinina (Als), principalmente Als3 possuem sequências repetidas ricas em aminoácidos polares como treonina e serina, nas quais, ancoram glicosilfosfatidilinositol e, através da exposição nas superfícies de *Candida albicans*, ligam-se de forma covalente à parede celular da mucosa (GAUR; KLOTZ *et al.*, 1997; LIU; FILLER *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2013).

A proteína HWP1 presente na parede celular das hifas também possui grande relevância para a adesão de *Candida albicans* na mucosa oral. Codificada pelo gene *hwp1*, a proteína liga-se covalentemente ao glicosilfosfatidilinositol da parede celular do fungo. Após realizar esse processo permite que as regiões N-terminais dos aminoácidos da proteína fiquem livres para realizar as interações com as transglutaminases dos hospedeiros, fazendo uma ligação cruzada da proteína com a superfície das células dos indivíduos. As interações da célula do microrganismo e célula da mucosa geradas pela proteína HWP1 permitem a adesão e o início da formação do biofilme (ENE; BENNETT, 2009; NOBILE *et al.*, 2006; ORSI *et al.*, 2014).

1.1.2 Biofilme de *Candida albicans*

O biofilme é o principal fator de patogenicidade na cavidade oral, sendo dividido em quatro estágios sequenciais. No primeiro estágio ocorrem as adesões das células planctônicas na mucosa oral. Em seguida, no segundo estágio, as divisões celulares assexuadas como brotamento geram a proliferação celular que, conseqüentemente, acarreta na agregação das células. No terceiro estágio são liberados exopolissacarídeos (EPS) responsáveis pela matriz extracelular, que após um período de maturação formam o biofilme. No quarto e último estágio ocorrem rupturas no biofilme com a liberação de novas células, como pode ser observado na Figura 1 (CHEVALIER *et al.*, 2018; MAYER *et al.*, 2013; VILA *et al.*, 2018).

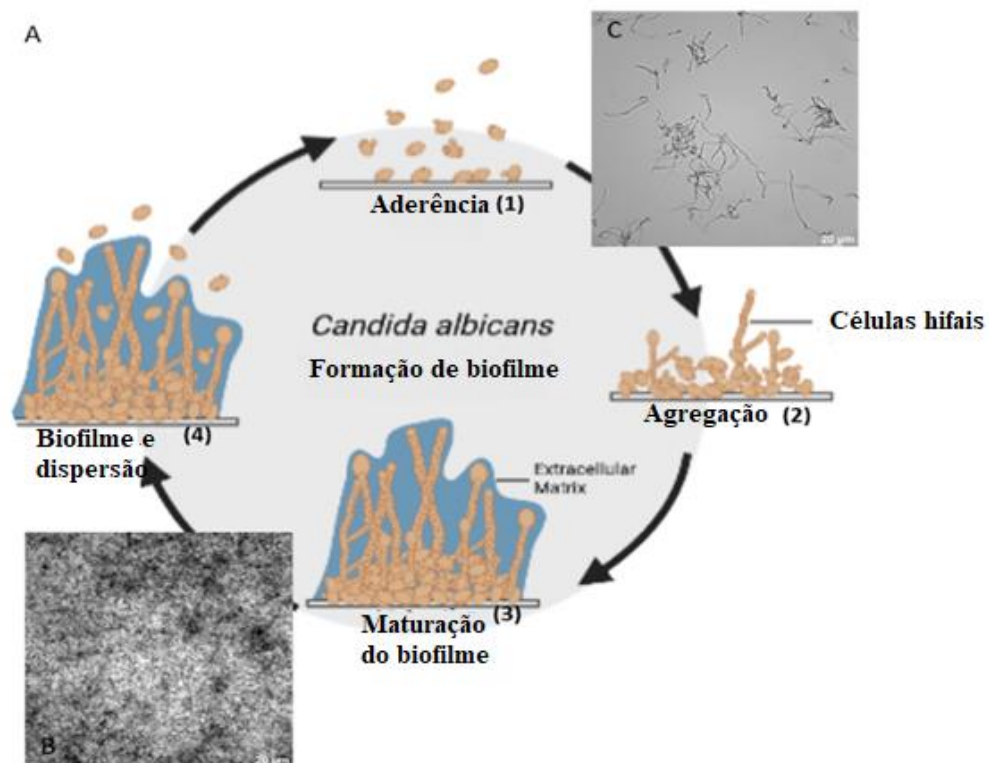


Figura 1. Visão geral da formação do biofilme da levedura *C. albicans* estruturada em quatro etapas (A). (1) Fixação de células de levedura planctônicas a uma superfície, (2) agregação e proliferação de células, (3) formação de um biofilme maduro com matriz extracelular, (4) e desprendimento de células de levedura do biofilme para formar mais biofilmes. Micrografias fotografadas com luz de transmissão usando um microscópio codificado Leica DMI8 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemanha) após 24 h de crescimento a 37 °C. Biofilme de *C. albicans* (B) e células planctônicas (C).
Fonte: AMANN et al., 2021.

A formação do biofilme por microrganismos patogênicos confere vantagens como captação de nutrientes, estabilidade, proteção das células imunológicas do hospedeiro à ação dos antimicrobianos, à radiação e desidratação. Ao longo do período de maturação do biofilme a estrutura polimérica modifica-se, os componentes da matriz extracelular de *Candida albicans* compostos por polissacarídeos β -1,3-glucanos, β -1,6-glucanos, mananos e quitina são alterados em um período 24-48 horas (FINKEL; MITCHELL, 2010). A estrutura da parede celular que compõem o biofilme pode ser observada na Figura 2.

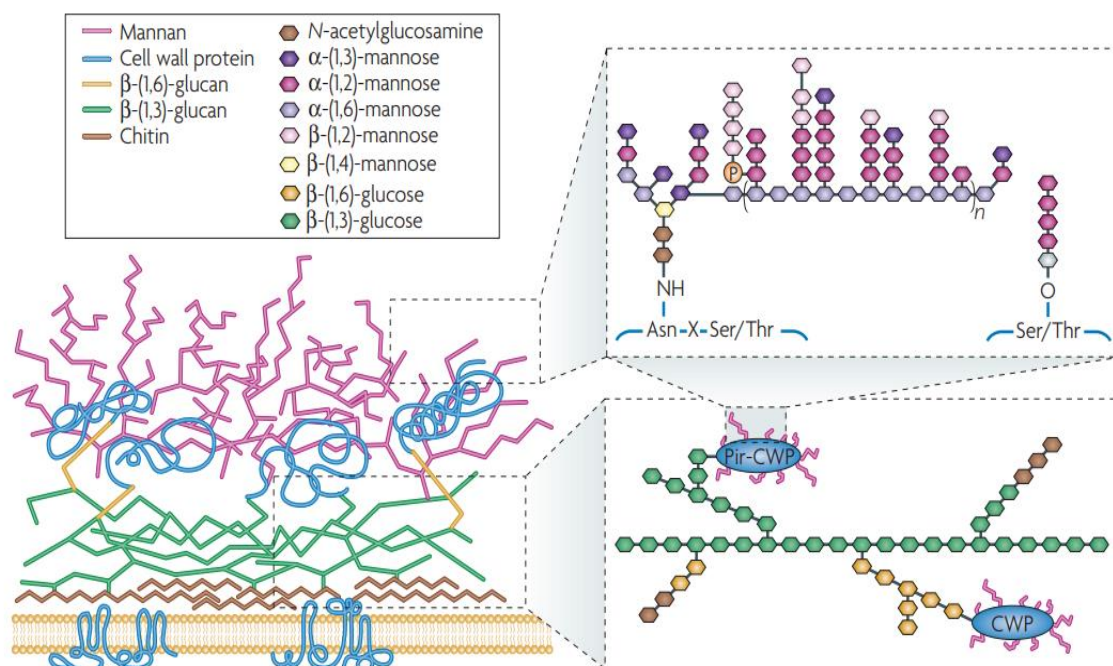


Figura 2. Estrutura da parede celular de *Candida albicans*. O esquema mostra os principais componentes da parede celular e suas distribuições. β -(1,3)-glucana e quitina (poli- β -(1,4)-*N*-acetilglucosamina) são os principais componentes estruturais, e estes estão localizados no interior da parede celular. A camada externa é enriquecida com proteínas da parede celular (CWP) que são ligada a este esqueleto principalmente via glicosilfosfatidilinositol remanescentes de β -(1,6)-glucano ou, para manoproteínas com domínios de repetição internos (Pir-CWP), através de ligações sensíveis a álcalis para β -(1,3)-glucano. As inserções mostram a estrutura dos componentes glucano e manano.

Fonte: NETEA et al., 2008.

Em razão da complexidade dos biofilmes são exigidas maiores produções das glicoproteínas β -1,3-glucanos, os quais, ficam próximo a membrana e exercem a ligação aos β -1,6-glucanos (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020). A glicoproteína β -1,6-glucano está presente na camada externa e exerce a interação com proteínas, como as responsáveis pela adesão e alongamento das hifas. Além disso, as β -1,6-glucanos realizam interações com as mananas e quitina presente na parede celular; (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020; NETT *et al.*, 2007).

As mananas e manoproteínas em conjunto com a quitina compõem 40% do peso seco das leveduras, sendo as principais glicoproteínas responsáveis pela adesão, regulação e permeabilidade da célula. Em virtude da conservação estrutural, tornam-se imunoestimuladoras de citocinas e células T (NETEA et al., 2008). Embora as atuações de mananas e quitinas não estejam totalmente elucidadas, acredita-se que possam contribuir para a

alteração morfológica da levedura para hifas (DALLE *et al.*, 2003; D'ENFERT *et al.*, 2020; MAYER *et al.*, 2013;).

As proteínas de membranas também são grandes contribuidoras para o desenvolvimento do biofilme. Essa classe de proteínas de *Candida albicans* pode ser dividida em duas categorias: as proteínas secretadas e as proteínas de parede celular (*CWP-cell wall protein*). As proteínas de parede fazem a interação aos polissacarídeos. Já as proteínas secretadas podem possuir atividades enzimáticas que contribuem para a adesão e obtenção de nutrientes por *C. albicans* (CHAFFIN, 2008).

Como exemplo dessas atividades enzimáticas são as exercidas por enzimas hidrolíticas como as aspartato hidrogenases (Sap), que atuam em pH ácido e promovem a quebra de colágeno, laminina, fibronectina, mucina e a lactoferrina salivar. Já as enzimas fosfolipases, hidrolisam uma ou mais ligações em glicerofosfolipídeos do hospedeiro permitindo a invasão das hifas formadas por *C. albicans*. Os transportes das enzimas extracelulares são realizados via vesículas intermembranas e extracelulares, as quais, também realizam o transporte de lipídeos, RNA e DNA configurando na maturação do biofilme (GIL-BONA *et al.*, 2018).

Além da matriz extracelular a formação do biofilme de *Candida albicans* pode ocorrer através da interação com os biofilmes bacterianos (METWALLI *et al.*, 2013). Na cavidade oral os biofilmes bacterianos são predominantemente formados pelo gênero *Streptococcus* sp., os quais aderem aos dentes e gengivas causando doenças orais como cárie dental (WILLEMS *et al.*, 2018). Esta bactéria produz glicosiltransferases que sintetizam polímeros de glicano solúveis e insolúveis a partir da sacarose. Tal atividade permite a proliferação celular e a colonização de bactérias cariogênicas que são capazes de promover a formação de biofilme na superfície dos dentes e a interação com *Candida albicans* (BAMFORD *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2020).

O desenvolvimento do biofilme polimicrobiano conduz para formação de uma estrutura complexa e rígida que pode ser mediada pelas interações eletrostáticas, proteína-proteína, lecitina-carboidratos e interações de Van-der-Waals as quais permitem que os microrganismos estabeleçam uma relação mutualística (SHIRTLIFF *et al.*, 2009).

Através da atividade respiratória de *Candida albicans*, os altos níveis de oxigênio que seriam nocivos para as bactérias, são reduzidos, enquanto *Streptococcus* sp., fornece adesão e estabilidade para o fungo. Outra relação estabelecida pelos microrganismos é a acidez do meio, devido a atividade metabólica de *Streptococcus* sp., liberar ácidos orgânicos ao meio extracelular. A acidez do meio aumenta a interação do zinco, um metal essencial para crescimento de *C. albicans*. (METWALLI *et al.*, 2013; MORALES; HOGAN, 2010).

A associação entre *Streptococcus* sp. e *C. albicans* gera aumento na capacidade de virulência da cárie dental e das doenças na mucosa que podem ser acompanhadas por processos inflamatórios e estomatites (METWALLI *et al.*, 2013; O'DONNELL *et al.*, 2015), evoluindo para o desenvolvimento de cárie severa em crianças com completa destruição dos dentes (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017), como pode ser observado no biofilme de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans* na Figura 3.

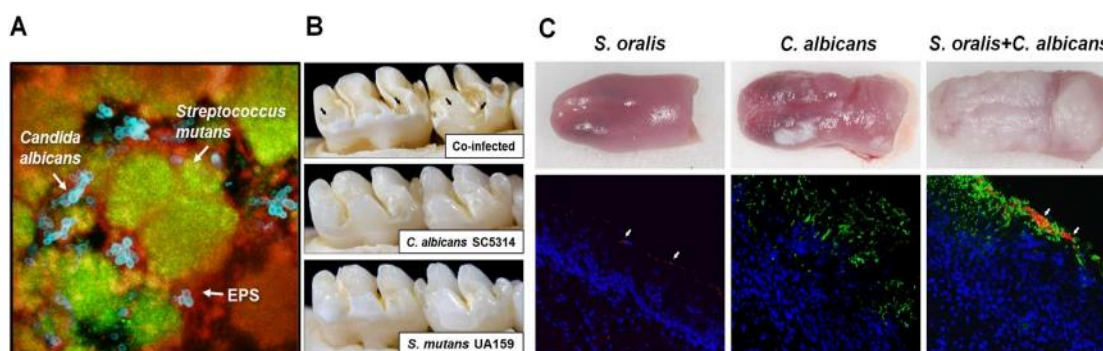


Figura 3. Interações Candida-estreptocócicas e doenças bucais. A. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de *C. albicans*–*S. mutans* em biofilmes mistos, ilustrando a relação espacial entre *C. albicans* (azul), *S. mutans* (verde) e exopolissacarídeos (vermelho). B. Imagens de dentes de ratos infectados com *S. mutans*, *C. albicans*, ou coinfectados. As setas pretas indicam lesões cáries graves de coinfeções nas quais o esmalte está ausente, o que expõe a dentina subjacente. Essa cárie desenfreada foi ausente nos animais infectados apenas por *S. mutans* ou *C. albicans*. C. Imagens de microscopia de fluorescência de línguas de camundongos infectadas com *S. oralis* (vermelho, apontado nas setas), *C. albicans* (verde) e ambos. A coinfeção aumentou substancialmente o acúmulo de biofilme bacteriano-fúngico e a invasão de tecidos moles que gerou resposta inflamatória. Imagens originais fornecidas pela Dra. Anna Dongari-Bagtzoglou; adaptado de Sobue T. e colegas, *Methods Mol Biol.* 1356:137–52, 2016, com permissão. EPS, exopolissacarídeos.

Fonte: KOO *et al.*, 2018.

1.1.3 Dimorfismo celular

A morfologia das células de *Candida albicans* encontra-se diversificada nos biofilmes (SUDBERTY, 2011). A capacidade de transitar de levedura para pseudohifas ou para forma hifal, permite a adaptação aos diferentes ambientes como; pH, nutrientes, temperatura, baixa concentração de oxigênio (O₂), alta concentração de gás carbônico (CO₂) e pequenas moléculas de sinalização, que estimulam ou reprimem a formação das hifas (D'ENFERT *et al.*, 2021). Tais fatores também contribuem para as modificações das células planctônicas comensais para células com capacidade de virulência (KADOSH; RIBOT, 2013; LU *et al.*, 2013).

Devido a esta diversidade morfológica é exigido um ambiente fenotípico transitório (switching) capaz de modificar a forma e também a coloração das células de *Candida albicans* que passam de branca, verde à opaca (POLKE *et al.*, 2015). Os fenótipos presentes no polimorfismo são controlados por diferentes genes como Wor1 e Efg1 responsáveis pela cor ou Nrg1 promotor da região HAGs (genes associados a transcrição de hifas) responsáveis por recrutar histonas deacetilase Hda1, que por sua vez, remodelam as cromatinas das células (LU *et al.*, 2011).

A maioria das variações morfológicas de *Candida albicans* possuem capacidade de virulência. As leveduras em ambiente ácido e alta densidade celular podem disseminar e realizar invasões em novos locais da mucosa. Já em ambiente alcalino, as células possuem a forma de pseudohifas e são encontradas extensivamente em feridas. Os clamidósporos não possuem capacidade de virulência definida, porém ocorre em ambientes complexos com alta concentração de açúcar e baixa concentração de oxigênio, enquanto as hifas estão presentes no processo de invasão tecidual, crescem em temperaturas superiores a 36°C e na alta concentração de gás carbônico, como pode ser observado na Figura 4 (D'ENFERT *et al.*, 2021; GOW *et al.*, 2002; STAIB, MORSCHHÄUSER, 2007; SUDBERTY; GOW, 2004).

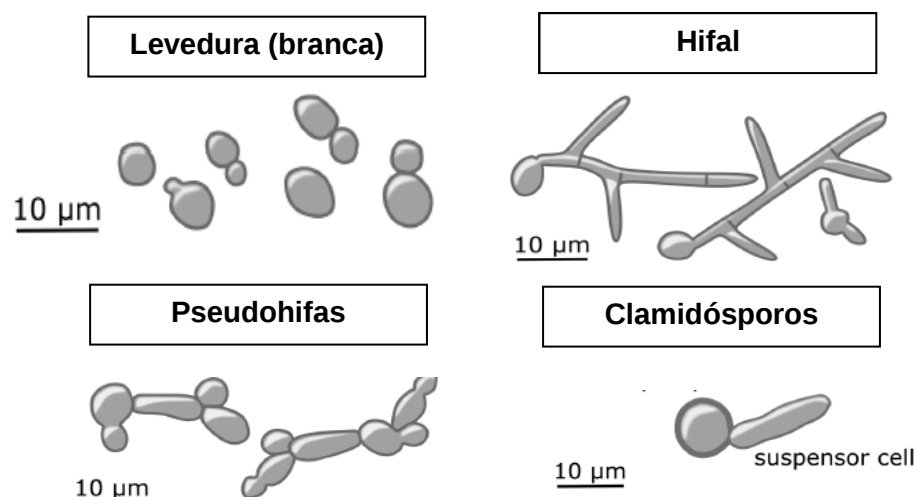


Figura 4. Polimorfismo de *Candida albicans*. A transição de células de levedura (brancas) para pseudo-hifas a hifas é estimulada por uma ampla variedade de fatores ambientais, que incluem temperaturas elevadas, pH e peptidoglicano. Pseudo-hifas podem ser distinguidas de hifas com base na posição da junção septal entre uma célula-mãe de levedura e seu filamento. A *Candida albicans* pode ser induzida a formar clamidósporos sob condições ambientais específicas, mas o significado desta forma de crescimento permanece obscuro.
Fonte: Adaptado de D'ENFERT et al., 2021).

1.1.4 Manifestações clínicas

Além da morfogênese, a *Candida albicans* apresenta diversidade nas manifestações clínicas geradas pelas infecções do microrganismo. Na mucosa oral a candidíase pode ser acompanhada pela ausência de sintomas ou apresentar diferentes sintomas que podem ser classificados em: manifestação aguda, manifestação crônica e síndromes associadas a candidíase (FARAH et al., 2010; VILA et al., 2018).

As manifestações agudas são formadas por pseudomembranosa caracterizada pelo aparecimento de manchas brancas arredondadas ou disformes nas regiões palatais, lábios, língua e mucosa oral, sendo frequente nos pacientes recém-nascidos, usuários de inaladores esteroidais, imunocomprometidos e aos indivíduos com baixa produção salivar (FARAH et al., 2010). Em alguns casos há evolução para candidíase eritematosa, a qual é caracterizada pelo aparecimento de manchas avermelhadas em toda região bucal, acompanhada por inchaço, dor e dificuldade de deglutição resultante da resposta inflamatória aguda (HELLSTEINS; MAREK, 2019).

O diagnóstico tardio contribui para o desenvolvimento das infecções crônicas por *Candida albicans* (FARAH et al., 2010). No estado crônico, a

infecção é capaz de gerar alterações na estrutura celular da mucosa do hospedeiro com o desenvolvimento da hiperplasia. Os sintomas podem ser acompanhados por dor, sangramento, halitose, xerostomia (BAILLIE *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2010; RAMAGE *et al.*, 2001; ZARNOWSKI *et al.*, 2014).

A candidíase crônica é também frequentemente encontrada em indivíduos que apresentam imunodeficiência humana adquirida (*HIV*) ou são portadores de prótese dentária (FARAH *et al.*, 2010; VILA *et al.*, 2018). Em média 75% dos usuários de prótese dental desenvolvem candidíase crônica, devido à má higienização, uso contínuo, baixo fluxo salivar e os ajustes incorretos das próteses dentárias que auxiliam o crescimento oportunista de *Candida albicans* (GENDREAU; LOEWY, 2011). Além disso, o material acrílico presentes na composição de próteses dentárias torna-se um reservatório para o desenvolvimento do biofilme que, por sua vez, provoca constante resposta inflamatória no local tornando a candidíase eritematosa em hiperplásica (GENDREAU; LOEWY, 2011; VILA *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2000;).

Outros fatores associados podem gerar candidíase como o observado em queilite angular que afeta os ângulos ou comissuras da boca e apresenta eritema, maceração, fissuras e crostas. O desenvolvimento de queilite angular está associada a alta disseminação ou autoinfecção, sendo um local propício para infecções bacterianas como as causadas por *Staphylococcus aureus* (LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020; MILLSOP *et al.*, 2016; VILA *et al.*, 2018).

A queilocandidíase está associada à constante umidade da cavidade oral, que pode ser gerada por produtos químicos à base de petrolato como os presentes em protetores bucais, lambedura crônica de lábios ou acompanhada pelo hábito de chupar os dedos, os quais, resultam no desenvolvimento crônico de candidíase com formação de crostas e ulcerações nos lábios (LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020, VILA *et al.*, 2018;)

A glossite rombóide mediana, também conhecida como glossite atrófica apresenta-se como uma área central elíptica ou rombóide no dorso da língua. A condição é frequentemente associada ao uso frequente de inaladores de esteróides ou tabagismo. Já a síndrome de candidíase ocorre por processo de reinfecção sendo comum em pacientes com debilidades imunológicas, neoplasias que afetam a região da cabeça e pescoço, baixa ou total ausência

de produção salivar presente em pacientes com xerostomia, como pode ser observado na Figura 5 (MILLSOP *et al.*, 2016; LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020, VILA *et al.*, 2018;).

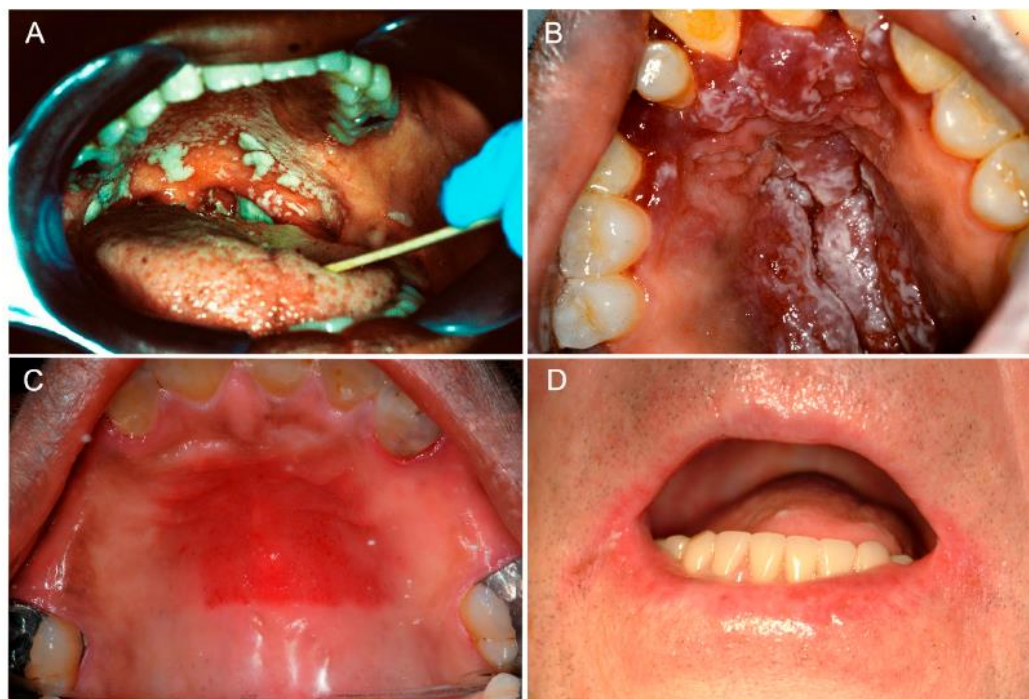


Figura 5. Manifestações clínicas da candidíase oral. (A) Candidíase orofaríngea caracterizada por placas brancas. **(B)** Candidíase pseudomembranosa em um indivíduo positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Múltiplas placas brancas elevadas coalescentes na mucosa palatina dura. **(C)** Estomatite protética, manifestando-se clinicamente como candidíase eritematosa da mucosa palatina dura média em um usuário de prótese parcial. **(D)** Queilite angular apresentando-se como eritema bilateral e maceração dos ângulos da boca. Imagens clínicas de consentimento para pacientes que frequentam a Faculdade de Odontologia da Universidade de Maryland.

Fonte: VILA *et al.*, 2018.

1.2 Peptídeos antimicrobianos

1.2.1 Peptídeos de saliva humana

Na cavidade bucal o crescimento de *Candida albicans* assim como os demais microrganismos pertencentes à microbiota oral, podem ser limitados. A força mastigatória, descamação tecidual, a correta higienização bucal e, principalmente, a produção salivar impedem a proliferação ou invasão dos microrganismos no tecido da mucosa oral nos indivíduos saudáveis (HELMERHORST *et al.*, 2006).

A produção salivar exercida pelas glândulas submandibulares, parótidas e sublinguais secretam um fluido translúcido capaz de lubrificar e proteger a cavidade bucal (LAMKIN; OPPENHEIM, 1993). A saliva produzida por essas glândulas pode desempenhar a função tamponante, auxiliar na limpeza dos dentes, dissolução dos alimentos e, por meio das ações bactericida e fungicida promovida por peptídeos antimicrobianos presentes naturalmente na saliva, realiza a proteção na cavidade bucal (ARWEILER; NETUSCHIL, 2016; FRANK; DOWD, 1999).

Os peptídeos antimicrobianos tais como a lactoferrina, siliperoxidase, mucinas, lisozima e a família das histatinas atuam nas membranas ou em organelas das células dos patógenos causando a morte celular e, por isso, são responsáveis pela primeira linha de defesa nos indivíduos. Para *Candida albicans* as atividades inibitórias são, majoritariamente, formadas pela família das histatinas (ARWEILER; NETUSCHIL, 2016).

1.2.2 Família das histatinas

As histatinas são peptídeos de cadeias pequenas, inferiores a 50 aminoácidos, sendo ricas em resíduos de histidina e lisina que configuram às cadeias polipeptídicas, o caráter catiônico. As principais cadeias das histatinas são compostas pelos peptídeos histatina-1 (Hst-1), histatina-3 (Hst-3), os quais são clivados por enzimas proteolíticas gerando cadeias menores que variam de histatinas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, como pode ser observado na Figura 6 (KAVANAGH; DOWD, 2010; OPPENHEIM *et al.*, 1988;).

Família das histatinas	Sequências
Histatina 1	DSpHEKRHHGYRRKHEKHHSHREFFYGDYGSNYLYDN
Histatina 3	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
Histatina 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY
Fragmentos presentes na saliva	
Histatina 2	RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Histatina 4	KFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
Histatina 6	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYR
Histatina 7	RKFHEKHHSHRGY
Histatina 8	KFHEKHHSHRGY
Histatina 9	RKFHEKHHSHRGYR
Histatina 10	KFHEKHHSHRGYR
Histatina 11	KRHHGYKR
Histatina 12	KRHHGYK

Figura 6. Família das histatinas e os fragmentos menores.

Fonte: KHURSHID et al., 2016.

Estas atividades proteolíticas podem ocorrer de forma intracelular e extracelular. Em histatina-1 a clivagem dá origem a histatina-2, enquanto as clivagens em histatina-3 geram as cadeias peptídicas de histatina 4 a 12. Nas cadeias menores as enzimas proteolíticas exercem quebra das ligações peptídicas até completa inativação e desestruturação dos peptídeos (KAVANAGH; DOWD, 2004; WANG, 2014).

A obtenção das histatinas foi realizada inicialmente, por meio das técnicas de extração, purificação e identificação que permitiram obter histatina-1, histatina-3 e histatina-5 (Hst-5) (WANG, 2014). No entanto, tais técnicas podem gerar baixo rendimento e alto consumo de solventes.

Porém, o método de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) proposto por Merrifield (1963) permite a otimização e obtenção de peptídeos sintéticos de forma precisa. Através do meio reacional são realizadas interações covalente na região C-terminal de um aminoácido a um suporte polimérico insolúvel, os quais, realizam a iniciação das cadeias peptídicas. De

forma distinta à síntese clássica, a SPFS utiliza aminoácidos que apresentam regiões protetoras que ficam livres no meio reacional. Para diminuir a contaminação, são adicionados somente o aminoácido presente na sequência da cadeia, o que potencializa o processo sintético e permite o desenvolvimento dos polipeptídeos desejados. Para completa obtenção da cadeia peptídica, ao final do processo, são realizadas clivagem permitindo a separação do peptídeo de interesse do suporte polimérico. Através do método de peptídeo em fase sólida é possível obter peptídeos catiônicos como Histatina-5, os quais, podem ser rapidamente degradados por atividade hidrolíticas ou enzimática existentes nas técnicas de extração e purificação.

1.2.3 Atividade anticandida de Hst-5

As funções exercidas pelas histatinas Hst-1, Hst-3 e Hst-5 são diversificadas podendo variar de desintoxicação de elementos prejudiciais presentes nos alimentos, inibição da desmineralização do esmalte e, especificamente histatina-1, auxilia na adesão das células epiteliais melhorando a capacidade de cicatrização tecidual. Por sua vez, as Histatina-3 e Histatina-5 (Hst-5) são caracterizadas quanto às atividades antifúngicas em *Candida albicans* (TORRES *et al.*, 2018).

A Hst-5 proveniente de proteólise de Hst-3, apresenta maior capacidade anticandida em comparação com Hst-3. Alguns mecanismos de Hst-5 reportados na literatura indicam a disrupção das membranas das mitocôndrias, geração de espécies reativas de oxigênio e efluxo de ATP, que são fatores que pode levar a morte celular de *Candida albicans* (SWIDERGALL; ERNST, 2014, ZAMBOM *et al.*, 2020).

Em altas concentrações extracelulares de Hst-5 são gerados acúmulos na membrana dos blastóporos de *Candida albicans* e por meio de transportadores, como as proteínas de choque térmico Ssa 1p/2p independentes de ATP e Dur3 e Dur31 dependentes de ATP, o peptídeo é captado para meio citoplasmático (MOCHON *et al.*, 2008; PURI; EDGERTON, 2014).

As ações de Hst-5 no meio citoplasmático são diversificadas. Swidergall e Ernst (2014), reportam que a Hst-5 possui um papel eficiente nos blastosporos de *Candida albicans*, ao bloquear os canais transportadores de potássio Trk1. Koshlukova e colaboradores (2000) sugeriram que Hst-5 atua como antagonista das proteínas purinérgicas P2X existentes nas membranas celulares de *Candida albicans* (DI VIRGILIO *et al.*, 2001; ROBSON *et al.*, 2006).

As proteínas purinérgicas funcionam como receptores ionotrópicos, metabotrópicos e realizam a mediação entre ATP intracelular e extracelular. Hst-5 ao interagir de forma antagonista a estes receptores gera aumento do efluxo de ATP e consequentemente desregulação das atividades metabólicas das células de *Candida albicans* levando a morte celular (KOSHLUKOVA *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 2021).

Ainda, Hst-5 pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) capaz de gerar citotoxicidade para células de *Candida albicans* que, por consequência, induz a morte celular. Helmerhorst e colaboradores (2000), apontou que os mecanismos da ação de Hst-5 necessitam de mais estudos para serem totalmente compreendidos. No entanto, foi possível associar nas análises Helmerhorst e colaboradores (2000) que em *Candida albicans* as ROS mitocondriais são formadas através NADH: ubiquinona redutase (complexo I) e ubiquinol: citocromo c redutase (complexo III) (KOSHLUKOVA *et al.*, 2000).

Tais enzimas redutases são capazes de liberar radicais livres e que através da transferência de elétrons dos citocromos (*b566* e *b562*), presentes na cadeia respiratória de *Candida albicans*, são neutralizados. Entretanto a inibição dos citocromos leva ao acúmulo de radicais livres que são capazes de reagir ao oxigênio (HELMERHORST *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2021)

Como resultado as espécies reativas de oxigênio geram estresse oxidativo em proteínas quinases MAP quinase e no gene Hog 1, moléculas responsáveis pelas sinalizações mitocondriais para transcrição celular. Ainda, o estresse oxidativo em Hog 1 pode também gerar a fosforilação da molécula induzindo a produção de glicerol e consequentemente leva à morte celular. O estresse em Hog 1 também é capaz de induzir as alterações morfogênicas que geram a filamentação e a formação de clamidósporos. Todos os

mecanismos são observados na Figura 7 (ALONSO-MONGE *et al.*, 2003; MONGE *et al.*, 2006).

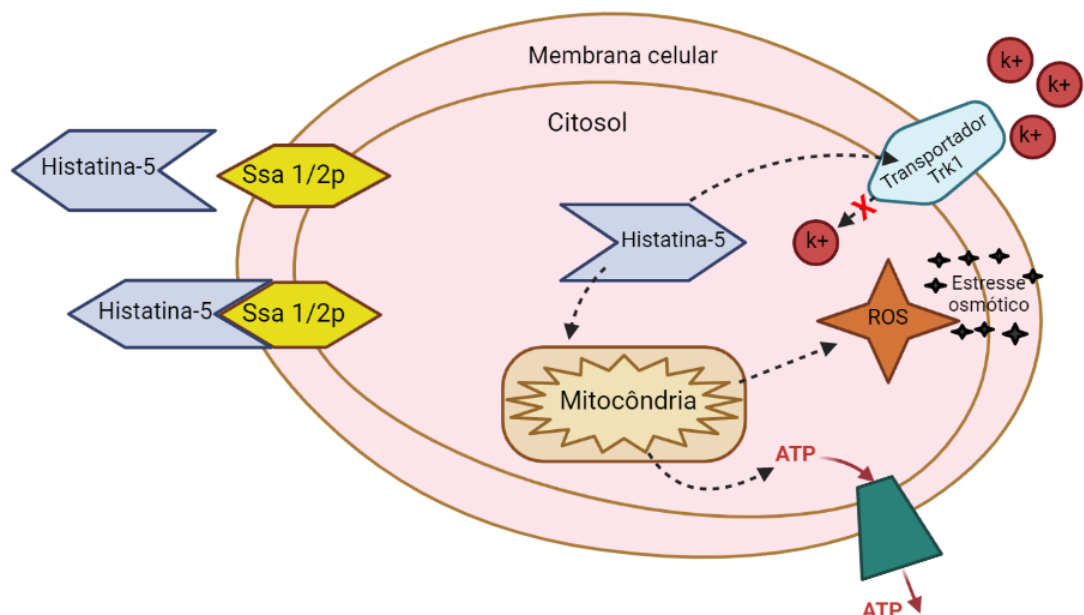


Figura 7. Modo de ação do Hst 5 através de diferentes mecanismos. (1) Ligação e captação do Hstn 5; (1.1) Direcionamento de intracelulares componentes; (2) Efluxo do conteúdo intracelular; (3) morte celular mediada por ATP e mitocôndria; (3.1) Exsudação de ATP; (3.2) Geração de ROS; (4) A sinalização MAPK induziu a morte celular.

Fonte: Adaptado, SHARMA *et al.*, 2021.

Apesar dos mecanismos de ação de Hst-5 ainda não serem totalmente elucidados, a compreensão existente na literatura demonstrou que este peptídeo se torna um potencial candidato para aplicação terapêutica para tratamento de candidíase (HELMERHORST *et al.*, 2001; MOFFA *et al.*, 2015)

Além disso, Hst-5 assume estruturas secundárias que diferem dos peptídeos antimicrobianos. De maneira geral, os peptídeos antimicrobianos apresentam estrutura secundária em alfa hélice e são ativos nas membranas dos patógenos, porém Hst-5 apresenta dificuldade para estruturar em alfa hélice em ambientes hidrofóbicos, como os presentes nas membranas celulares (SHARMA *et al.*, 2021; SITU, 2000).

A própria interação de Hst-5 nas membranas das mitocôndrias ou blastoconídios de *C. albicans* não resulta em lise celular ou despolarização maciça dos fosfolípidios, o que torna possível sua aplicação em formulações lipídicas como os lipossomas (HELMERHORST *et al.*, 2001).

1.2.4 Histatina-5 e a veiculação a sistemas lipídicos

As veiculações de histatina-5 aos sistemas lipídicos, como lipossomas, podem conferir seletividade ao peptídeo, uma vez que os lipossomas apresentam diferentes componentes e estruturas fosfolipídicas capazes de gerar sensibilidade ou resistência às alterações de pH, interações eletrostáticas e solubilidade diversificada, o que permite o desenvolvimento de formulações norteadoras para liberação dos compostos ativos nos locais de ação.

Tal ação permite que os lipossomas ofereçam vantagens farmacocinética e farmacodinâmica, como o aumento da biodisponibilidade, bloqueio do efeito de primeira passagem e inibição das ações de enzimas proteolíticas. Além disso, os lipossomas podem agir permeando os tecidos das mucosas.

De fato, Hertog e colaboradores (2004) observaram em estudos com histatina-5 e derivados de histatina-5 associados a lipossomas aniônicos que os peptídeos foram capazes de translocar sobre a bicamada de fosfolípidos sem a intervenção de sistemas de transportes dependentes de ATP. Zambom e colaboradores (2019) relataram que o derivado de histatina-5 denominado Owhst-5, preserva a atividade antifúngica contra cepa ATCC 90028 de *Candida albicans*, tornando-se um peptídeo promissor para o combate da candidíase oral.

1.3 Lipossoma associado ao peptídeo

1.3.1 Estrutura lipossomal

Os lipossomas são formulações lipídicas, consistindo em camadas unilamelares ou multilamelares, auto moldável, envolta a um compartimento central aquoso (HERBRECHT *et al.*, 2020). Em virtude da presença de fosfolípidos em sua composição, os lipossomas podem se agrupar em bicamadas formando uma estrutura anfifílica mimética às membranas celulares.

A natureza anfifílica deste sistema permite que a cabeça hidrofílica do fosfolípido determine as propriedades de superfície dos lipossomas, enquanto a cauda hidrofóbica, interna à bicamada, determina a fluidez das membranas lipossomais (AHMED *et al.*, 2019). Tais, características realizam interações tanto com camada externa quanto com a região central, enquanto as substâncias hidrofóbicas realizam interações com os ácidos graxos insaturados e saturados presentes nas regiões hidrofóbicas do fosfolípido, como consequência, diversos compostos podem ser encapsulados ou associados a este sistema.

Ainda, diferentes das demais formas farmacêuticas, os lipossomas possuem transições de fase (T_c) em que passam de uma estrutura rígida para uma estrutura fluida permitindo a liberação das substâncias nos locais de ação, uma propriedade que também auxilia no aumento da eficiência de encapsulação (AHMED *et al.*, 2019).

Além da transição de fase, os lipossomas podem ser classificados de acordo com carga superficial geradas pelos fosfolípidos, tamanho vesicular e quantidade de camadas. Sendo divididos em neutro, positivo e negativo para as cargas superficiais e unilamelares e multilamelares na formação de vesículas, os quais, são subdivididos em quatro categorias principais: multilamelares (MLV), vesículas oligolamelares (OLV), vesículas multilamelares (MVV) e vesículas unilamelares (ULV). Além disso, o ULV pode ser dividido em grupos de vesículas unilamelares gigantes (GUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares médias (MUL) e vesículas unilamelares pequenos (SUV), com base no tamanho, como representado na Figura 8. (NAKHAEI *et al.*, 2021).

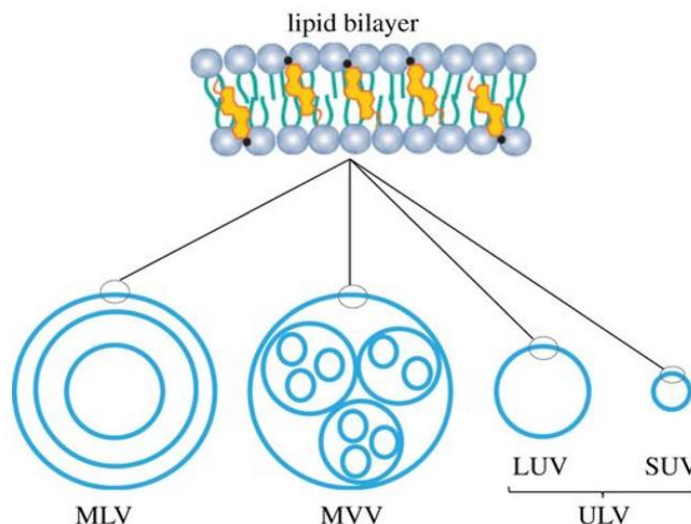


Figura 8. Estrutura de bicamada lipídica e tipos de lipossomas: MLVs, MVVs, ULVs. Além disso, os ULVs podem ser subclassificados como LUVs e SUVs.

Fonte: Adaptado de GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2004.

1.3.2 Associação e encapsulação

A interiorização dos princípios ativos e bioativos devem estar em adequação às propriedades dos lipossomas, os quais variam de acordo com tamanho, carga superficial, composição fosfolipídica e número de lamelas. Essas características modificáveis são essenciais para estabelecer o método para a formação da estrutura e aplicação desse sistema, assim como a concentração dos agentes associados. No entanto, algumas alterações nas propriedades podem gerar efeitos indesejados como agregação, desestabilização, oxidação e baixa eficiência (AHMED *et al.*, 2019).

Uma alternativa para evitar as implicações no sistema são a associação do colesterol na composição lipossomal, o qual gera rigidez na estrutura permitindo a estabilidade ao longo do tempo (ALLEN; CULLIS, 2013). As interações eletrostáticas aos componentes proteicos podem ser outro fator capaz de realizar a dissociação ao sistema. Para evitar esse processo, emprega-se polietilenoglicol (PEG), um polímero que gera forças repulsivas suficientes para manter estável os lipossomas em meio biológico. Somada a esta ação, o PEG pode realizar ligação a moléculas direcionadoras, composição capaz de conferir seletividade às nanoestruturas (HARRIS; CHESS, 2003; SOPYAN *et al.*, 2020).

Dentre as características dos lipossomas, a alta solubilidade em membranas celulares e a baixa toxicidade faz com que haja a interação aos tecidos epiteliais tornando-se uma opção ao carregamento de fármacos sintéticos, peptídeos ou oligonucleotídeos, compostos que podem exibir baixa solubilidade, rápida degradação, diminuição de dose disponível, entre demais fatores (MADNI et al., 2014). Um exemplo, ocorre com anfotericina B, um antifúngico eficaz ao tratamento das infecções micóticas, mas que possuem alta toxicidade aos indivíduos. Entretanto, a anfotericina B ao ser encapsuladas aos lipossomas denotam um perfil de segurança viável, sendo atualmente uma opção terapêutica aos quadros graves de infecção fúngica (ADLER-MOORE; PROFFITT, 2002).

1.3.3 Lipossomas associados à peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são extensivamente estudados quanto ao potencial de aplicação terapêutico e capacidade de atuar em alvos moleculares que diferem dos antimicrobianos sintéticos. Provenientes de plantas, animais e microrganismos, os peptídeos antimicrobianos são extremamente eficazes no controle de microrganismos patogênicos (LEI et al., 2019).

No entanto, as aplicações orais dos peptídeos para tratamentos de patologias humanas levam a baixa disponibilidade, em virtude de enzimas proteolíticas que clivam as ligações peptídicas das estruturas. A associação dos peptídeos antimicrobianos com sistemas lipossomais, pode gerar proteção, aumentar a estabilidade e disponibilidade dos AMPs. Para isso é necessário a identificação de métodos de encapsulação ou associação.

Atualmente diferentes métodos podem ser atribuídos para a encapsulação dos peptídeos antimicrobianos, como: solvente evaporação, *spray-dry*, emulsificação e polimerização, *salting out* entre outros, os quais, podem gerar a encapsulação parcial ou total da concentração dos peptídeos antimicrobianos. Já para a associação aos sistemas lipossomais, o método de reidratação tem demonstrado alta eficácia. Nesta técnica os filmes lipídicos são reidratados contendo os peptídeos antimicrobianos em tampão, resultando em

vesículas multilamelares que posteriormente pode ser homogeneizada em extrusoras ou sonicação (BRANDELLI, 2012; YADAV *et al.*, 2011).

Outro método aplicado aos AMPs associados aos lipossomos é a técnica de fase-reversa. Nesta técnica os peptídeos antimicrobianos são misturados aos filmes lipídicos formando uma emulsão. Ao agitar manualmente ou através de sonicação são geradas micelas já associadas aos peptídeos. Após a secagem são geradas organogeis viscosos que são revertidos em lipossomas com adição de água ultrapura. Para fosfolipídeos com carga aniônica a utilização desta técnica pode resultar em alta associação (BRANDELLI, 2012; SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1978).

1.3.4 Lipossomas e biofilmes microbianos

Biofilmes são estruturas extracelulares compostas principalmente por polissacarídeos e também proteínas, lipídeos, água e ácidos nucleicos. Diferentes estágios que levam à formação dessa estrutura são complexos e multifatoriais e, quando produzidos, auxiliam na estabilidade e adesão de microrganismos, liberando células planctônicas na cavidade oral (JENKINSON; LAMONT, 2005; O'TOOLE *et al.*, 2000; RAMAGE *et al.*, 2005).

A associação de agentes antifúngicos a lipossomas auxilia sua translocação nas barreiras dos biofilmes. Vera-González e colaboradores (2011) sugerem que a anidulafungina foi capaz de penetrar o biofilme de *Candida albicans* de forma superior do que comparada à anidulafungina livre. Smistad e colaboradores (2011) observaram que lipossomas negativos geraram adsorção superior aos lipossomas neutros.

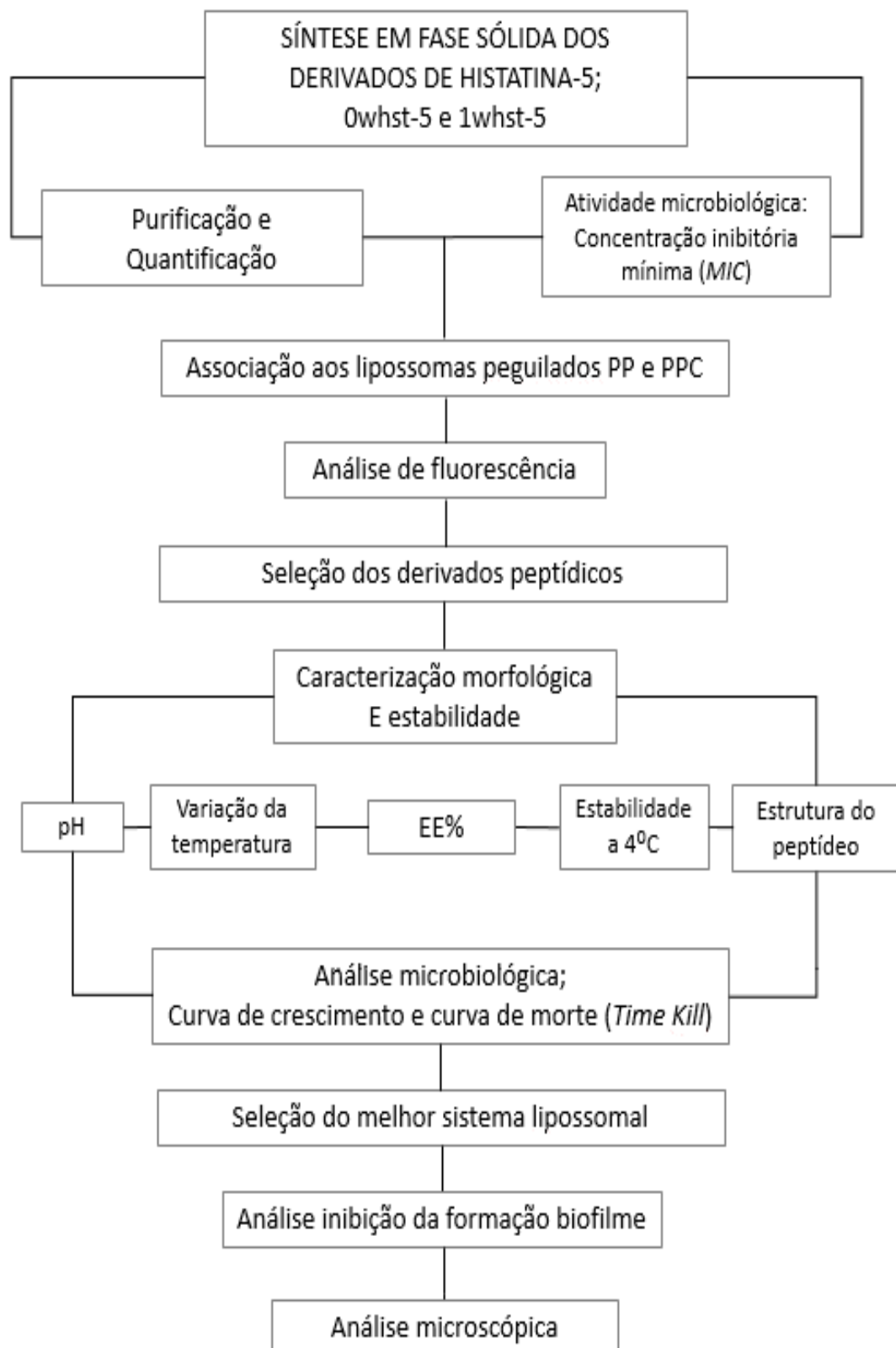
As análises realizadas com *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus salivarius* apresentaram inibição da formação do biofilme através da ação dos lipossomas catiônicos por meio da interação eletrostática, enquanto que lipossomas aniônicos, através de ligações de hidrogênio e repulsão eletrostática (WANG, 2021).

2. Objetivos

O objetivo central deste projeto consiste no desenvolvimento de lipossomas, utilizando uma metodologia de evaporação em fase reversa, na intenção de aumentar a eficiência de encapsulação do peptídeo OWhistatina-5, um derivado de histatina-5, para que o sistema possa ser aplicado em candidíase oral e formação de biofilme por *Candida albicans*. Para alcançar tal objetivo central, são propostos os objetivos específicos:

- Sintetizar o peptídeo OWhst5 e hst-5 através da técnica de síntese em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc;
- Purificar e caracterizar os peptídeos sintetizados utilizando técnicas de cromatografia líquida e espectroscopia de massas;
- Produzir lipossomas PEGuilados através do método de evaporação em fase reversa;
- Caracterizar os sistemas lipossomais produzidos, na tentativa de identificar a localização dos peptídeos nos lipossomas;
- Avaliar a eficiência de incorporação dos peptídeos nos lipossomas e a estabilidade dos sistemas lipossomais produzidos;
- Realizar testes antifúngicos para avaliação do potencial de ação dos peptídeos sintetizados e dos sistemas lipossomais contra biofilme de *Candida albicans*;
- Avaliação microscópica da morfologia das células de *Candida albicans* após contato com os sistemas lipossomais.

Para melhor visualização das etapas a serem desenvolvidas neste projeto, um fluxograma é apresentado abaixo:



3 Material e métodos

3.1 Material

Reagentes: Resina Fmoc-tyr-wang da Novabiochem® (grau de substituição: 0,43mmol/g), resina Fmoc-trp-wang da Novabiochem® grau de substituição: 0,69 mmol/g), N-hidroxibenzotriazol (HOBt), todos 9-fluorenilmetiloxycarbonil-aminoácidos (Fmoc-aminoácidos) em suas formas adequadamente protegidas foram adquiridos da AAPPTec® (Louisville, KY, EUA), N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) foi adquirido da Sigma-Aldrich® (DIC, >98%). Diclorometano (DCM) e clorofórmio grau HPLC foram adquiridos da Êxodo Científica®, dimetilformamida (DMF) foi adquirida da Merck®, ácido trifluoroacético (TFA) e triisopropilsilano (TIS) foram adquiridos Sigma-Aldrich®. Ácido acético glacial e acetonitrila de grau HPLC (ACN) foram adquiridos da Merck®. 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-(fosfo-rac-(1-glicerol)) (POPG, >99%) foi adquirido Sigma-Aldrich®, PEG 2000 foi adquirido Fluka® e colesterol (Chol, >99% de pureza) foi adquirido da Avanti Polar Lipids, Inc (Alabastro, AL, EUA). O microrganismo *Candida albicans* (ATCC 10231) foi doado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – Fundação Oswaldo Cruz Brasil). O Caldo Sabouraud Dextrose foi adquirido pela Kasvi®. Concanavalina A conjugada com Tetrametilrodamina (555/580 nm) foi obtida de Molecular Probes. Calcofluor-white (423/443 nm) foi adquirido pela Sigma-Aldrich®. Isocianato de fluoresceína adquirido de Sigma-Aldrich®.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de peptídeos

Para a síntese de histatina-5 e os derivados OWhistatina-5 (OWhst-5) e histatina-5 (hst-5) foi empregado o método SPFS, sendo utilizada a estratégia Fmoc/t-Bu onde o grupo base-lábil 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) é utilizado como grupo protetor da região α -amínica dos aminoácidos e o grupo terc-butil (t-Bu), como protetores ácido-lábil das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. A resina polimérica aplicada para síntese desse peptídeo foi Wang contendo o primeiro aminoácido da sequência (Tyr) já acoplado, o qual permitiu

o desenvolvimento inicial da síntese de OWhst-5 e hst-5 e, para a síntese de OWhst-5, o aminoácido triptofano (Trp) foi acoplado na extremidade amino-terminal com o intuito de acrescentar uma sonda fluorescente ao peptídeo, permitindo estudos posteriores. A desproteção dos grupos alfa-amínicos foi realizada através da solução de 4-metilpiperidina a 20% (v/v) em dimetilformida (DMF) por 15 minutos. Já os agentes de condensação foram N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), sendo responsáveis pelo acoplamento de cada aminoácido. Para completa reação e formação da ligação peptídica foi necessário um processo reacional de 2 horas e na tentativa de obter um bom rendimento aplicou-se três vezes o excesso molar dos reagentes DIC, HOBt e Fmoc-aminoácido, como pode ser observado na Figura 9.

Para o acompanhamento dos acoplamentos dos resíduos foi realizado o teste de ninhidrina proposto por Kaiser e colaboradores (1970) no qual permitiu detectar grupo alfa-amino livre. Os grupos N-terminal livres ao interagir com duas moléculas de ninhidrina gerou uma coloração violeta na solução indicando um acoplamento incompleto dos resíduos. Na ausência de grupos N-terminal livres, o ensaio de ninhidrina indicou a coloração amarela, o que foi possível concluir que a reação de acoplamento do resíduo ocorreu de forma completa formando a sequência peptídica.

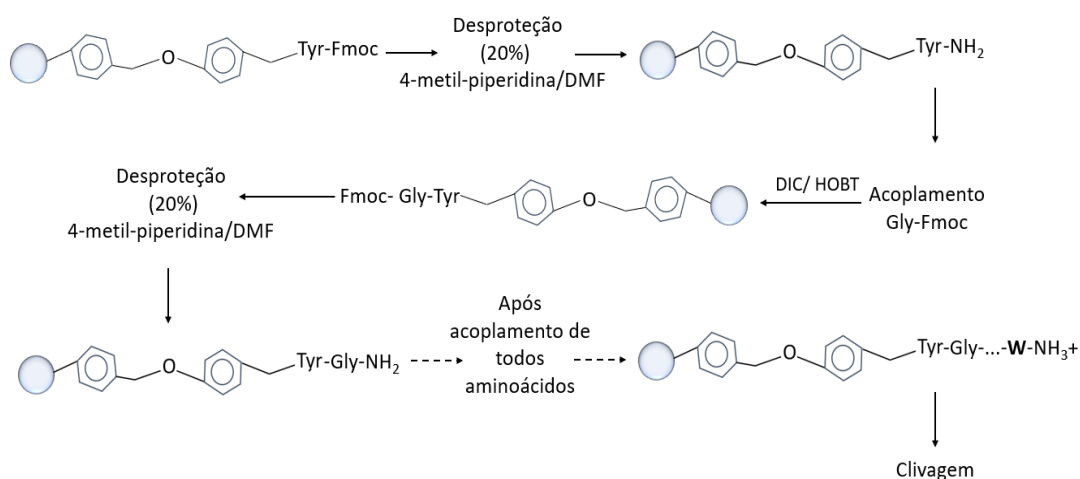


Figura 9. Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)

Fonte: Própria autora, 2021.

3.2.2 Clivagem de peptídeos.

Após a síntese da cadeia peptídica o grupo alfa-carboxílico ligado a resina deve ser clivado e, para isso, adiciona-se uma solução ácida responsável pelo rompimento entre a cadeia peptídica e a resina polimérica, bem como pela desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Em conjunto, supressores de reações colaterais, realizam o sequestro dos protetores liberados em solução. Para clivagem de OWhst-5 e hst-5 foi adicionado 95% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% (v/v) de água deionizada, 2,5 % (v/v) triisopropilsilano (TIS), na proporção de 2 mL por cada 100 mg de peptidil-resina, durante um período de 3 horas a 25 °C.

Posteriormente, para remoção dos produtos de clivagem, o conteúdo foi lavado com éter etílico gelado e centrifugado (3 vezes, consecutivamente), o que permitiu a precipitação do peptídeo bruto. O excesso de éter existente após as lavagens foi removido em temperatura ambiente próximo a 26 °C, sendo posteriormente o conteúdo seco em dessecador sob vácuo, por período de 24 horas. Após completa remoção de éter foram adicionados aos peptídeos uma solução aquosa de ácido acético a 10%, o qual, permitiu a solubilização do peptídeo e completa remoção de resina por meio de filtração. Para concentração do peptídeo em solução foi realizada a rotaevaporação a 55 °C por 40 minutos com remoção do ácido acético e posteriormente liofilização em um período de 48 horas, obtendo ao final do processo um conteúdo em pó branco, que é denominado peptídeo bruto.

3.2.3 Purificação e caracterização de peptídeos

O material floculoso obtido (peptídeo bruto) após a liofilização foi submetido ao processo de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 µm). A análise qualitativa foi realizada em modo analítico utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu LC-10A/C-47A, com uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm e 5µm).

Para o método de purificação utilizou-se para método semi preparativo TFA a 0,045% diluído em água ultrapura e TFA a 0,036% diluído em acetonitrila e uma proporção de 3:1, por 90 minutos com fluxo mantido 5 mL por minuto onde foi executada a coleta dos compostos. Para purificação dos compostos coletados foi utilizado método analítico contendo TFA a 0,045% diluído em água ultrapura e TFA a 0,036% diluído em acetonitrila em uma variação de 5-35% de TFA em acetonitrila com período total de análise de 30 minutos e fluxo de 0,6 mL por minutos. Como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Método de purificação do peptídeo OWhistatina-5.

	Modo semi preparativo	Modo analítico
Solvente A Solvente B Modo de eluição	0,045% TFA em H ₂ O 0,036% TFA em ACN 0,33% de solvente B em 90 minutos	0,045% TFA em H ₂ O 0,036% TFA em ACN 5-35% de solvente B em 30 minutos
Fluxo	5 mL min ⁻¹	0,6 mL min ⁻¹
Deteção (λ)	220 nm	220 nm

Fonte: Própria autora, 2020.

Após o procedimento de purificação, a caracterização do peptídeo foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo eletrospray positivo (ESI-MS⁺) por injeção direta das amostras do peptídeo puro em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Bruker®. Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para o peptídeo de acordo com sua sequência de aminoácidos.

3.2.4 Quantificação do peptídeo

A quantificação dos peptídeos é essencial para as análises de atividade química e biológicas, permitindo de forma direta ou indireta determinar a concentração dessas macromoléculas de origem proteica. Entre os testes de alta precisão encontra-se a análise de absorção no UV-VIS, um método que confere especificidade aos peptídeos, visto que somente ocorrem na presença

dos aminoácidos triptofano e tirosina, os quais conseguem absorver energia em um comprimento de onda de 280 nm.

Para padronização da concentração molar dos derivados foi realizada a curva-padrão somente do peptídeo OWhst-5, já aplicado e estudado por Zambom e colaboradores (2019). Para hst-5 utilizou-se o cálculo de absortividade molar expresso pela equação de Lambert-Beer (1870) determinada pela Equação 1.

$$Abs = \epsilon . b . c \quad (1)$$

Em que Abs corresponde absorbância; ϵ expressa o coeficiente de absortividade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$); b (cm) a distância percorrida pela luz quando incide na cubeta contendo amostra até o momento excedente e c ($mol \cdot L^{-1}$) determinado pela concentração molar da substância em análise. Sendo utilizado para as análises o espectrofotômetro UV-1601PC-Shimadzu.

Para o desenvolvimento da curva analítica de OWhst-5 foram utilizadas As concentrações do peptídeo solubilizadas em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 foram 117; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20 e 10 μM , já as concentrações realizadas do peptídeo em metanol com grau de pureza 99,9% foram 125; 112,5; 100; 87,5; 75; 62,5; 50; 37,5; 25; 12,5 μM (ZAMBOM *et al.*, 2019).

3.2.5 Análise fluorescência

Os peptídeos OWhst-5 e hst-5 tem como o diferencial a adição de triptofano, um aminoácido de cadeia lateral aromática capaz de conferir fluorescência ao peptídeo. Este fenômeno é observado quando um elétron passa do estado de maior energia denominada, singleto excitado (S_1) para o estágio de menor energia (S_0) e ao realizar esse processo são emitidos fótons, como os representados na Figura 10.

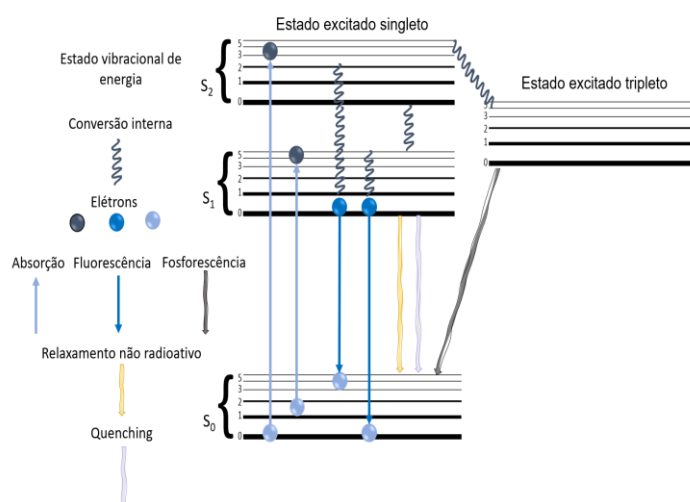


Figura 10. Diagrama de Jablonski para fluorescência.

Fonte: Adaptado ISLER, 2018.

Em proteínas e peptídeos, os resíduos de cadeias laterais aromáticas presentes em tirosina, triptofano e fenilalanina são potenciais para emissão de fluorescência, sendo ideais para identificação e quantificação das moléculas proteicas em baixa concentração como realizado em 0Whst-5.

Para estudos de fluorescência envolvendo o peptídeo 0Whst-5, foi utilizado o espectrofluorímetro modelo Varian® Cary Eclipse em comprimento de absorção de 280 nm e emissão de 360 nm. As padronizações das curvas analíticas foram analisadas somente para 0Whst-5 devido ao peso molecular e compatibilidade nos valores de absorvidade molar, como pode ser observado na Figura 11. Assim, para 0Whst-5 foram realizadas as curvas em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e metanol em um gradiente de 99,9% As concentrações de peptídeo utilizadas em tampão Tris-HCl foram de 1; 2; 3; 4; 5; 6 µM. Para o metanol foi utilizada as concentrações 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6 µM (ZAMBOM *et al.*, 2019).

Sequência peptídica	D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y				
	histatina-5				
Número de resíduos	Peso molecular (g/mol)	Absortividade M ⁻¹ cm ⁻¹	Carga em pH 7	Ponto isolétrico	Solubilidade em água
24	3036,3	2560	5,7	pH 10,79	Alta

Sequência peptídica	W D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y W				
	0Whistatina-5				
Número de resíduos	Peso molecular (g/mol)	Absortividade M ⁻¹ cm ⁻¹	Carga em pH 7	Ponto isolétrico	Solubilidade em água

25	3222,5	8250	5,7	pH 10,78	Alta
----	--------	------	-----	----------	------

Figura 11. Sequência de aminoácidos da estrutura primária de histatina-5 e derivados após adição de triptofano.
Fonte: Própria autora, 2022.

3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos peptídeos livres

3.3.1 Preparo dos inóculos para ensaio

Para os ensaios microbiológicos, foi inoculado a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz. Para reativação das cepas foi utilizado 6 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril, no qual, cada cepa foi inoculada, crescida separadamente em tubos de vidros de 15 cm e incubadas em estufa, a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente os inóculos foram plaqueados e crescidos em ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi®) e incubados a 37°C por 48 horas. Por fim, a cultura-estoque obtida foi armazenada em geladeira, a 4°C por um período de 2 meses.

3.3.2 Metodologia de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) permitiu identificar a sensibilidade dos microrganismos em contato com agente antimicrobiano. Para *Candida albicans* foi utilizado o protocolo recomendado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition Wayne-Penn: CLSI; M27-A3; 2008)*.

As cepas provenientes do estoque foram semeadas em caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril e incubadas a 37°C por um período de 18 - 24 horas. Após esse período, uma pequena alíquota referente a uma alça de platina, de 5 cm por 0,5 mm, do inóculo foi transferida para caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril, de modo a obter uma suspensão de microrganismos com densidade ótica (DO), a 530 nm, entre 0,10 e 0,15.

Valores referentes a escala 0,5 de McFarland, o qual indicou uma concentração aproximada de 1×10^6 UFC/mL.

Após a reativação das cepas e mensuração da DO foi realizado a primeira diluição, em tubo de vidro de 15 cm contendo 9900 μ L do meio de cultivo caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril foi adicionado 100 μ L dos inóculos. Seguindo para uma nova diluição, no qual, foi transferindo 1 mL dos inóculos para tubos de 50 mL esterilizado, contendo 19 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®), após duas diluições os inóculos encontravam-se em uma concentração 1×10^3 UFC/mL, quantidade ideal para execução do ensaio antimicrobiano.

Para análise da atividade antimicrobiana de 0Whst-5 foram utilizadas duas placas de 96 poços contendo 12 colunas. Na primeira coluna até a décima primeira coluna foi realizado o preenchimento dos poços com 100 μ L do caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril, já na décima segunda coluna foi adicionado 200 μ L do meio do cultivo. A partir do meio de cultura presente nas placas foi aplicado à primeira coluna o peptídeo 0Whst-5 em uma concentração inicial de 4,12 μ g/mL, em uma segunda placa foi adicionado à primeira coluna o fluconazol na concentração inicial de 256 μ g/mL. Em seguida foi procedido à diluição seriada até a décima primeira coluna e ao término das diluições foi inoculado a cepa em análise (ATCC 10231) em volume de 100 μ L com concentração inicial de 1×10^3 UFC/mL.

As placas, então, foram incubadas a 37°C por 48 horas, após este período as placas foram analisadas em espectrofotômetro de microplaca (BioteK Epoch®) em um comprimento de onda de 595nm sendo as análises realizadas em sextuplicata.

3.4 Desenvolvimento das formulações

3.4.1 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram constituídos por polietilenoglicol 2000 (PEG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (POPG), colesterol, utilizando-se duas formulações com diferentes composições e proporções.

Inicialmente, os constituintes foram solubilizados em clorofórmio, o PEG2000 solubilizado em 10 mL e o colesterol, POPG solubilizado em 2 mL, formando os filmes lipídicos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Constituintes dos sistemas lipossomais.

Formulation	POPG ^b (mmol/L)	PEG2000 ^c (mmol/L)	Chol ^d (mmol/L)
PP	0.06	1.6	-
PPC	0.06	1.5	0.13

Observação: ^aPP e ^aPPC corresponde respectivamente as formulações lipossomais preparadas e associadas a 0Whst-5, ^b1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-phospho-rac-1-glicerol; ^cpolietileneglicol volume 2000; ^dcolesterol.

Fonte: Própria autora, 2020

A construção das formulações seguiu os passos de A a F, os quais estão ilustrados na **Figura 12**.

- A.** Foram coletados 920 µl de PEG 2000 e 80 µl POPG para formação de PP e 885 de PEG 2000, 80 µl de POPG e 35 µl de colesterol para constituição de PPC, sendo posteriormente depositados os respectivos volumes em um tubo de vidros de 5 mL.
- B.** Em seguida foi adicionado 500 µL solução tamponada com Tris HCl 10mM, pH 7,4, contendo o peptídeo 0Whst-5 em concentração de 100 µM correspondente a 0,322 µg/mL e, para controle, foram produzidos também lipossomas “branco”, contendo somente solução tampão Tris HCl 10 mM em pH 7,4.
- C.** A mistura foi agitada manualmente com a formação de suspensão branca.
- D.** Simultaneamente à agitação foi realizado a evaporação dos solventes sob fluxo de gás nitrogênio (N₂) até a completa secagem do material.
- E.** Após a secagem foram formados os micélios nas paredes laterais dos tubos.
- F.** Por fim, foi adicionado água 1 mL de água ultrapura sob agitação para formação das vesículas lipossomais

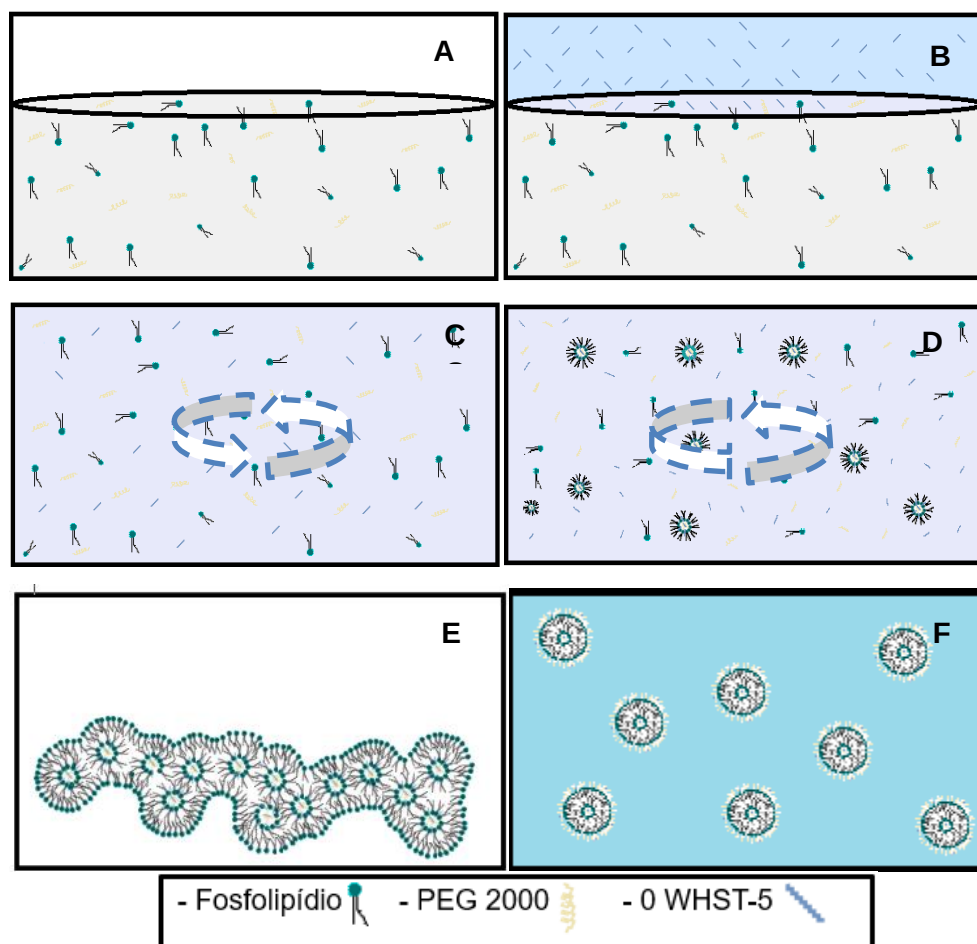


Figura 12. Esquema representativo da formação de lipossomas (PP) associado ao peptídeo OWhst-5 pelo método de evaporação em fase reversa.

Fonte: Própria autora, 2021.

3.4.2 Extrusão

Os lipossomos foram preparados de acordo com metodologia de evaporação em fase reversa, método no qual as micelas são associadas aos ativos para posterior formação dos lipossomas, o que proporciona maior interação com o peptídeo. Esta técnica pode gerar lipossomas multilamelares (MLVs) com diâmetro que médio próximo a 400 nm (MERTINS, 2004; RODRIGUEZ, 2003). No entanto, vesículas multilamelares acarretam em heterogeneidade no sistema. Assim, para minimizar este efeito foi utilizado o procedimento de extrusão com a utilização de membrana de policarbonato com poros de 400 nm realizando 8 ciclos de extrusão, no qual, pode homogeneizar

o sistema evitando a alteração no tamanho médio com formação de vesículas unilameres (ULVs).

3.5 Caracterização morfológica e estabilidade

3.5.1 Caracterização física dos lipossomas

Os lipossomas em solução apresentam movimentos brownianos, os quais podem ser medidos e caracterizados através do espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering-DLS). Esta técnica, por meio da emissão de um comprimento de luz específico, é capaz de mensurar os tamanhos hidrodinâmicos dos sistemas, os quais, após extrusão encontravam-se monodispersos, gerando dados estabelecidos pela Lei de Stokes-Einstein determinado pela Equação 2.

$$d = k \cdot \frac{T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \left(\frac{\Gamma}{q^2} \right)} \quad (2)$$

Onde, **d** corresponde ao diâmetro médio da vesícula; **K** sendo a constante de Boltzmann; **T** a temperatura termodinâmica; **η** a viscosidade do meio em Pa·s; **Γ** taxa de decaimento em 1/s e q equivalente ao vetor dispersão em m⁻¹ calculado pela Equação 3.

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin \sin \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (3)$$

Em que o valor de **q** corresponde ao vetor de dispersão em m⁻¹; **n** referente ao índice de refração do meio de dispersão (adimensional); **θ** o ângulo de espalhamento em rad e **λ** referente ao comprimento de onda em m.

Outra relação obtida através do espalhamento de luz dinâmica foi o cálculo do potencial zeta, medida utilizada para avaliar a estabilidade das formulações, determinada pela mobilidade eletroforética, o qual, foi gerado por meio do campo elétrico, é mensurada pela equação de Henry representada pela Equação 4.

$$\mu_e = [2 \cdot \epsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa a)] / 3\eta \quad (4)$$

Sendo μ_e condizente a mobilidade eletroforética; ϵ constante dielétrica; ζ corresponde ao potencial zeta; $f(\kappa a)$ sendo a função de Henry e η referente a viscosidade.

O espalhamento de luz dinâmica gerou simultaneamente a medição do tamanho médio hidrodinâmico e o índice de polidispersão. O índice de polidispersão foi obtido através do parâmetro calculado a partir de análise da função de autocorrelação da intensidade da dispersão da luz, obtido através da Equação 5.

$$\rho(k) = E[(Xt - \mu)(Xt + k - \mu)]/\sigma^2 \quad (5)$$

Em que E é dado pelo valor médio; k é o deslocamento no tempo (s) e σ^2 a variável do deslocamento. Esta análise permitiu identificar se as formulações (PP e PPC) somente com tampão e associado ao peptídeo estavam um sistema de monodisperso ou polidisperso e realizar o acompanhamento de estabilidade.

As associações de peptídeos aos lipossomas podem gerar interações intermoleculares que acarretam agregação e desestabilização das estruturas fosfolipídicas, fator que pode impedir a liberação do peptídeo. Assim, após a formação e associação de 0Whst-5, os lipossomas foram analisados quanto ao tamanho médio vesicular, potencial zeta e índice de polidispersividade em equipamento ZetaSizer Nano NS, Malvern Instruments UK, com fonte high power laser, 50mW, 532 nm. Cada suspensão de lipossomas, vazios ou incorporados com os peptídeos, foram lidas em triplicata a 25°C, e os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para analisar a estrutura e morfologia dos lipossomas. O lipossoma foi diluído numa solução tamponada com Tris HCl 10 mM, pH 7,4 numa proporção de 1:1. Após isso, uma alíquota de 20 μ L de cada amostra (lipossomas vazios e contendo

peptídeo) foi carregada em uma grade de cobre revestida com filme de carbono e deixada em repouso por 10 min, seguida da remoção do excesso de amostra com papel de filtro. As grades carregadas de amostra foram coradas usando uma gota de solução contendo 1% de acetato de uranila (p/v) em água. Após 2 min, o excesso de líquido foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas usando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CX (Jeol USA, Inc, Peabody, MA, EUA) operando em uma voltagem de aceleração de 100 kV.

3.5.3 Eficiência de encapsulação

Os lipossomas produzidos pela técnica de fase reversa foram centrifugados em microtubos Amicon® Ultra de 500 µL, com cut-off de 30 kDa a uma rotação de 14000g e temperatura de 4°C por 15 minutos, para separação de peptídeos não associados nos lipossomas. Para a quantificação do peptídeo associado, 1 mL de cada formulação contendo o peptídeo (PP-0Whst-5 e PPC-0Whst-5) foi centrifugada. Os conteúdos retidos nos filtros foram vertidos em microtubos e centrifugados a 1000g a uma temperatura de 4°C por 15 minutos. O mesmo procedimento foi feito com os lipossomas branco (PP-T e PPC-T).

Em seguida as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas. Após liofilização, foram acrescentados 3 mL de metanol em cada amostra, com intenção de romper os lipossomas e liberar seu conteúdo interno. Uma alíquota dessa solução foi analisada em espectrofluorímetro com excitação de 280 nm e emissão em 360 nm para quantificação do peptídeo encapsulado. Uma vez determinada a concentração do peptídeo encapsulado, a eficiência de encapsulação foi calculada conforme a Equação 6, em que o valor do lipossoma contendo peptídeo foi subtraído do valor lipossoma branco, seguindo para Equação 7, onde a quantia de peptídeo inicial foi subtraída da quantia observada em espectrofluorímetro e dividida pela quantidade inicial sendo o valor total multiplicado por 100 para obtenção da porcentagem de eficiência, de acordo com método de (Adaptado SANCHES *et al.*, 2021).

$$Emissão\ real = lipossoma\ associado - lipossoma\ tampão \quad (6)$$

$$EE\ (\%) = \frac{Total\ Adicionado - Total\ Associado}{Total\ adicionado} \times 100 \quad (7)$$

3.5.4 Estudo de estabilidade

Os sistemas lipossomais podem sofrer processos de alteração de pH, que pode promover um efeito de diminuição da eficiência da encapsulação devido à degradação dos fosfolipídios, os quais, realizam os processos hidrolíticos, oxidação, além de liberar radicais livres através das ligações insaturadas. A alteração dos fosfolipídios acarreta a desestruturação nas bicamadas lipídicas e desfuncionalização dos lipossomas (AKBARZADEH *et al.*, 2013). Por isso, foi acompanhado a estabilidade das formulações (PP e PPC) armazenadas a 4°C, por um período de 70 dias, analisado o tamanho vesicular médio, potencial zeta e o índice de polidispersão no 1º, 14º, 28º, 42º e 70º dia, através do método de espalhamento de luz dinâmico pelo equipamento ZetaSizer Nano NS, Malvern Instruments UK, com fonte de high power laser, 50mW, 532 nm.

3.5.5 Variação de pH

Na cavidade bucal os biofilmes orais gerados por *Candida albicans* apresentam pH ácido que podem variar de pH 6,5 a pH 5,5. Em contraste, os biofilmes mistos gerados por bactérias e fungos podem apresentar acidificado em pH 4,5 a 4,7 o que contribui para remoção do esmalte do dente e desenvolvimento de processo cariogênico. Assim, para avaliar a estabilidade dos sistemas em meio ácido, foram realizadas análises morfológicas por espalhamento de luz dinâmico pelo equipamento ZetaSizer Nano NS, Malvern Instruments UK, com fonte de high power laser, 50mW, 532 nm em meio ácido pH 5,5 e pH 4,5 analisando somente a carga superficial e tamanho vesicular médio.

3.5.6 Variação de temperatura (Calorímetro diferencial de varredura)

Os lipossomas, assim como as membranas celulares, possuem movimentos fluidos organizados pelos fosfolipídios que variam da fase gel para a fase líquido-cristalina. Essas alterações ocorrem devido as ligações carbono-carbono e geram estruturas *trans* e *cis*. Na fase líquido cristalina, todas as configurações estão em *cis* e, na fase gel, todas as configurações estão em *trans*. No entanto, a associação e interações com diferentes moléculas como colesterol, proteínas, peptídeos e polímeros podem alterar a temperatura de transição de fase. No atual trabalho, o fosfolipídio (POPG) possui transição de fase em -2°C. Porém, 70% da composição do lipossoma é relativa ao polímero PEG2000. Assim, para avaliar as alterações exercidas pela adição do polímero, foi feita análise da calorimetria dos sistemas lipossomais vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5 em modelo Nanodsc com varredura de 0 a 100°C. As análises foram realizadas utilizando um calorímetro de varrimento diferencial para nanopartículas capaz de medir a temperatura de transição térmica (temperatura de fusão; T_m) e a energia necessária para romper as interações de estabilização da estrutura terciária (entalpia; ΔH) de proteínas e peptídeos.

3.5.7 Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram conduzidos usando um espectropolarímetro J-815 (JASCO) a 25°C. Os espectros na região do UV distante (200-280 nm) foram determinados em uma célula de quartzo com comprimento de caminho ótico de 0,1 cm com purga de gás nitrogênio, largura de banda de 1 nm e tempo de resposta de 1 segundo. Todas as amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,22 μm para evitar alterações na leitura.

3.6 Análise microbiológica dos sistemas associados ao peptídeo selecionado 0Whst-5

3.6.1 Curva de crescimento microbiano e cinética de morte celular

Em sistemas que apresentam parâmetros controlados de temperatura, pH, concentração de nutrientes, dentre outros, os microrganismos apresentam padrões de crescimento que podem ser determinados por uma curva de crescimento, a qual pode ser dividida em quatro fases distintas: i) fase Lag, período em que o microrganismo se adapta ao ambiente; ii) fase Log, determinada pelo crescimento populacional exponencial, absorção de nutrientes e divisão celular; iii) fase estacionária, compreendida pela ausência de proliferação celular e liberação de metabólitos secundários; iv) fase de declínio, período determinado pela morte celular. A representação esquemática de cada uma das fases de crescimento dos microrganismos pode ser observada na Figura 13.

A curva de crescimento pode determinar e gerar dados quanto ao período de crescimento, consumo de nutrientes, liberação de metabólitos, pH, temperatura ideal entre outros fatores que variam de intrínsecos e extrínsecos. Devido a esse crescimento controlado é possível inferir o comportamento e atividade dos antimicrobianos conforme o tempo do microrganismo gerando dados de cinética de morte celular (*Time Kill*).

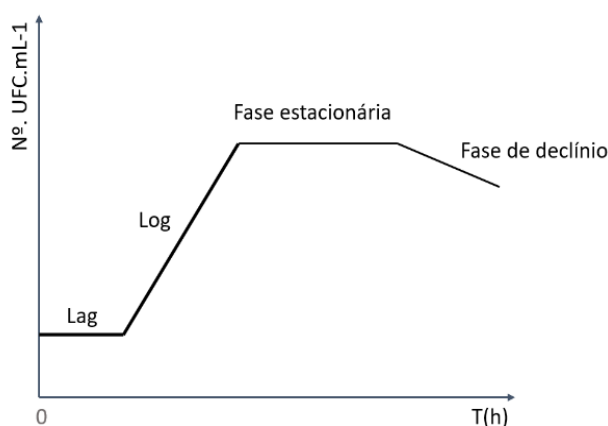


Figura 13. Representação do crescimento microbiano em um sistema controlado.
Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2021.

Para análise de cinética de morte celular, foi encapsulado 100 µM do peptídeo 0Whst-5 nas formulações PP e PPC. Posteriormente foram preparados os inóculos de acordo com método CLSI (*Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition Wayne-Penn: CLSI; M27-A3; 2008*), utilizando para o ensaio a cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 10231).

Em poços separados de uma placa de 24 poços foram adicionados 1 mL das formulações não associadas e associadas ao peptídeo (PP-T, PPC-T, PP-0W, PPC- 0W) e, posteriormente, foi adicionado 250 µL do inóculo a 1×10^3 UFC/mL, sendo incubado a 35°C por 48 horas. Nos tempos 1, 6 e 24 horas uma alíquota de 50 µL foi retirada de cada poço e diluída serialmente em 10 microtubos de 2,0 mL contendo 450 µL de solução salina. Uma alíquota de 30 µL foi retirada de cada microtubo e espalhada em placas contendo meio ágar Sabouraud Dextrose estéril e, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs), sendo realizado em duplicata (KLEPSE, 1998).

3.7. Atividades microbiológicas do sistema (PP) mais eficiente

3.7.1 Ensaio de morte celular

O ensaio de morte de *C. albicans* foi realizado para determinar a atividade inibitória dos lipossomas associados ao peptídeo 0Whst-5 em relação à cepa ATCC 10231 em uma concentração fúngica de 1×10^7 UFC/mL. Para isso foi preparada uma pequena alíquota referente a uma alça de platina, de 5 cm por 0,5 mm do inóculo, recolhido e crescido em uma placa de ágar Sabouraud Dextrose estéril, posteriormente a alíquota foi transferida para solução PBS (NaCl 100 mM, H_2NaPO_4 100 mM, pH 7,2) estéril.

Posteriormente foi realizada a quantificação por densidade ótica em um comprimento de onda de 620 nm, a qual ajustada para 0,3 com adição de solução salina, o que corresponde a uma concentração final equivalente de 1×10^7 UFC/mL (Adaptado de MOFFA *et al.*, 2015).

Na sequência, uma alíquota de 100 µL da suspensão de células foi adicionada a 100 µL do lipossoma associado ao peptídeo 0Whst-5 em concentração de 0,320 µg/mL somente tampão tris-HCL 10mM, pH 7,4, ou contendo fluconazol a uma concentração de 256 µg/mL, utilizado como controle. As misturas foram transferidas para uma placa de 96 poços por um período de 90 minutos a 30°C. Posteriormente uma alíquota de 50 µL dos poços selecionados foram diluídas dez vezes e serialmente em microtubos de 2 mL contendo 450 µL de solução PBS, pH 7,2. Em seguida, 50 µL de cada diluição foram semeadas em SDA e incubadas a 37°C por 48 horas (Adaptado; HELMERHOST, 2006; MOFFA *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 1991).

A viabilidade celular em cada concentração foi avaliada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹), segundo a fórmula: $UFC/ml = \text{número de colônias} \times 10 n/q$. Nessa fórmula, n é o valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 10) e q é a quantidade, em mL, colocada de cada diluição nas placas. Este experimento foi realizado em duplicata.

3.7.2 Preparo do inóculo para formação do biofilme e para ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a atividade do sistema frente ao biofilme, foi utilizado o microrganismo *C. albicans* (ATCC 10231), o qual foi semeado em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril, a 37°C por 48 horas. Em seguida, duas alçadas, referente a uma alça de platina de 5 cm por 0,5 mm, da levedura recém cultivada foram transferidas para solução PBS (NaCl 100 mM, H₂NaPO₄ 100 mM, pH 7,2) estéril. A espécie cultivada foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos e lavada duas vezes com solução PBS e agitada por 15 segundos. As células de *C. albicans* foram, então, ressuspensas em RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0. As densidades ópticas da suspensão de *C. albicans* foram padronizadas para 0,3 em um comprimento de onda de 620 nm concentração de 1x10⁷ UFC/mL comprimento de onda de 620 nm foi ajustada para 0,3, para os testes de células planctônicas e de biofilmes.

3.7.3 Formação do biofilme de *C. albicans*

Para formação do biofilme de *C. albicans*, um volume de 200 µL do meio de cultura contendo células fúngicas na concentração de 1×10^7 células.mL⁻¹ suplementados com meio RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0 foram adicionados a cada poço e incubados a 30 °C em um agitador orbital (75 rpm) durante 90 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS (NaCl 100 mM, H₂NaPO₄ 100 mM, pH 7,2) estéril, seguido da adição de mais 200 µL de meio de cultura RPMI-1640 tamponado com HEPES (pH 7,0). A placa foi incubada por 24 horas a 30 °C em agitação orbital (75 rpm). Após 24 h, 100 µL do meio foram retirados dos poços e o mesmo volume de HEPES fresco tamponado (pH 7,0) RPMI-1640 foi adicionado para incubação adicional de 24 horas. O biofilme maduro foi obtido após incubação total de 48 horas.

As amostras foram incubadas e avaliadas em três períodos diferentes de adsorção. No período de 90 minutos equivalente adesão de *C. albicans*, sendo avaliado após 48 horas, no período de 24 horas e equivalente a formação inicial do biofilme e avaliação após mais 24 horas e somente a adsorção no período inicial de 90 minutos.

3.7.4 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* foi realizada com a cepa ATCC 10231 e as amostras de lipossomas vazios (PP), lipossomas associados ao peptídeo 0Whst-5 (PP-0Whst-5), peptídeo livre (0Whst-5) e o fluconazol, nas concentrações de 0,320 µg/mL do peptídeo e 256 µg/mL do fluconazol.

Em volume de 100 µL de cada amostra foi adicionado a um poço de uma placa de poliestireno de 96 poços e, posteriormente adicionou-se ao mesmo poço 100 µL do inóculo em uma concentração anteriormente preparado, sendo em seguida incubados a 30°C por 90 minutos em uma agitação orbital (75 rpm). Decorrido o tempo, os poços foram lavados duas vezes com solução PBS (NaCl 100 mM, H₂NaPO₄ 100 mM, pH 7,2) estéril. Em

seguida, a placa foi incubada por 24 horas a 30°C em agitação orbital (75 rpm). Após 24 h, 100 µL do meio foram retirados dos poços e o mesmo volume de HEPES fresco tamponado (pH 7,0) RPMI-1640 foi adicionado para incubação adicional de 24 horas.

Os sistemas PP vazio, PP-0Whst-5, 0Whst5 e fluconazol foram então avaliados em relação as possíveis perturbações geradas na formação do biofilme por *C. albicans*. Assim, foram adicionadas as amostras no período de 90 minutos equivalente ao tempo de adesão do microrganismo na placa de poliestireno, avaliados também, na adsorção em 90 minutos e após 48 horas e avaliados quanto ação após adesão, com a formação de inicial do biofilme em 24 horas e análise final após mais 24 horas.

Posteriormente a cada ensaio foi adicionado aos poços contendo inóculo e amostras, 20 µL de resazurina (AlamarBlue®) 0,30 mg mL⁻¹, anteriormente filtrada em membrana 0,22 µm. Em seguida, incubou-se por 1 hora, a 37 °C. Ao final desse período foi feita leitura em espectrofotômetro de microplaca (Biotek Epoch®) a 570 nm (DO). O teste foi realizado em triplicata, sendo calculada a média das DO e a inibição do crescimento do microrganismo produzida pelas diferentes concentrações de cada sistema e do peptídeo livre determinadas pela Equação 8.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(DO \text{ poço} - DO \text{ meio de cultura})}{(DO \text{ controle negativo} - DO \text{ meio de cultura})} \times 100\% \quad (8)$$

3.8 Análise em microscopia confocal e microscopia de varredura eletrônica

3.8.1 Microscopia confocal

Para análise de microscopia confocal foi utilizado a cepa ATCC 10231 em adsorção com os lipossomas PP associado ao peptídeo 0Whst-5 (PP-0Whst-5) em uma concentração de 0,320 µg.mL⁻¹; lipossoma vazio contendo somente tampão tris-HCl a 10 mM, pH 7,4 (PP-T); peptídeo em uma

concentração de 0,320 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0Whst-5) e fluconazol em uma concentração de 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FLU).

As amostras foram aplicadas em volume de 100 μL , inicialmente no período de incubação de 90 minutos, posteriormente foram lavadas duas vezes com solução PBS (NaCl 100 mM, H_2NaPO_4 100 mM, pH 7,2). Em seguida adicionou-se 100 μL do meio de cultivo RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0 (estéril), incubando a 30°C, em uma rotação de 75 rpm. Após 24 horas foi retirado 100 μL do meio de cultivo e suplementado com tampão HEPES 50 mM, contendo, NaCl 0,15 M e EDTA 20 mM em pH 7,0, sendo novamente incubado por mais 24 horas a 30 °C em rotação de 75 rpm e avaliado posteriormente.

O inóculo foi novamente cultivado por um período de 90 minutos e realizada duas lavagens em PBS (NaCl 100 mM, H_2NaPO_4 100 mM, pH 7,2). Posteriormente foi adicionado 100 μL das amostras (PP-T, PP-0Whst-5, 0Whst-5, FLU) nas concentrações já descritas e 100 μL do meio de cultivo RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0 (estéril), sendo novamente incubados a 30 °C em uma rotação de 75 rpm. Após 24 horas foi retirado 100 μL do meio de cultivo mais as amostras e adicionado 100 μL do tampão HEPES, retornando para incubação por mais 24 horas, sendo avaliado após esse período.

Para análise no período de 90 minutos foi aplicado 100 μL das amostras (PP-T, PP-0Whst-5, 0Whst-5, FLU) e 100 μL do meio de cultivo RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0 contendo a cepa ATCC 10231 e, posteriormente a placa foi lavada duas vezes com solução PBS e analisado.

Após a formação do biofilme e exposição ao sistema PP-0Whst-5, PP-T e ao peptídeo antifúngico 0Whst-5 livre, os sobrenadantes foram eliminados e a placa foi lavada com PBS 10 mM estéril, pH 7,4. Posteriormente, os poços foram corados por 1 minuto com 20 μL de Calcofluor-White (0,05% [v/v]; Sigma-Aldrich®) e, após o período, a placa foi lavada com PBS e levada ao microscópio confocal para ser analisada em um comprimento de onda de 355 nm. Para confirmação do teste em todos os períodos foram cultivados somente a cepa ATCC 10231 em meio de cultivo RPMI-1640 tamponado com HEPES pH 7,0 (PERALTA *et al.*, 2015).

Outra análise aplicada foi a marcação com isocianato de fluoresceína (FITC) em proteínas totais presentes no inóculo de *Candida albicans*, com

intuito de analisar a adsorção dos sistemas lipossomais, peptídeo livre e fluconazol. FITC é capaz de reagir uma amina primária na proteína para formar uma ligação amida covalente. No entanto, a conjugação de FITC e 0Whst-5 exige meio reacional ácido e a molécula resultante pode inativar o peptídeo. Portanto, foi realizado somente a solubilização do peptídeo em isocianato de fluoresceína diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,4, em uma concentração 0,2 mg/mL, gerando uma proporção 2:1 de FITC e peptídeo 0Whst-5. A mistura foi armazenada a uma temperatura de 4°C por período de 8 horas.

Para análise dos lipossomas a mistura peptídeo e FITC foi associada através do método de fase reversa. Já para o controle foi adicionado o mesmo volume de FITC ausente de peptídeo, enquanto para fluconazol foi realizado a solubilização em FITC mantendo a concentração de 256 µg/mL. Ainda, para controle positivo foi somente aplicado FITC diluído em tampão ao inóculo. Em seguida foi realizado o método de formação de biofilme, já citado, com aplicação dos sistemas em análise (PP; PP-0Whst-5; Flu; Controle) em adsorção a *Candida albicans*, sendo incubado a 37°C por 48 horas (Adaptado de CIOCIOLA *et al.*, 2016; CHAGANTI *et al.*, 2018; JALAL *et al.*, 2019).

Após 48 horas foi adicionada concanavalina A conjugada com tetrametilrodamina (555/580 nm) em uma concentração de 25 µg/mL por 1 hora a 37°C e ausente de luz. O Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) (UPPULURI *et al.*, 2018).

3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), o biofilme foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Moffa e colaboradores (2015). O inóculo da cepa ATCC 10231 foi adicionado ao meio RPMI-1640 com tampão Hepes em placas de 6 poços (Kasvi®) contendo lipossomas associados ao peptídeo 0Whst-5 em outro poço contendo lipossoma vazio, peptídeo 0Whst-5 e outro poço apenas meio de cultura. Posteriormente, uma lamela de vidro de microscopia óptica (20x20mm) foi adicionada e incubada a 37°C por 48 horas a 75 rpm. Em seguida, as lamínulas foram preparadas de acordo com o método adaptado Yue e colaboradores (2018). Uma cepa ATCC

10231 foi fixada com glutaraldeído a 2,5% e lavada três vezes com solução PBS. As amostras foram então desidratadas usando concentrações gradualmente crescentes de etanol (50, 70, 85, 95 e 100%), secas e depois revestidas com carbono. Todas as amostras foram analisadas em microscopia JEOL, modelo JSM-7500F, com software operacional PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundários, retroespalhamento e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Científico, modelo Ultra Dry.

3.9 Estatística

Os dados de ensaio de CIM foram tratados por método estatístico descritivo com a utilização do método ANOVA e Tukey. A curva cinética de crescimento microbiano no ensaio de cinética de morte, foi plotada pelo log₁₀ UFC/mL em função dos intervalos de tempo. Todos os dados foram avaliados em um nível significância de $p < 0,05$.

4 Resultados e discussões

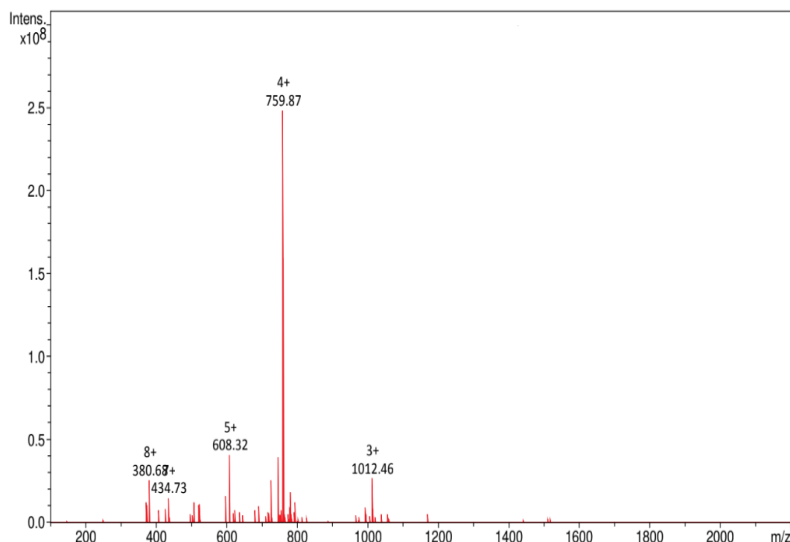
4.1 Síntese, clivagem, purificação e caracterização dos peptídeos

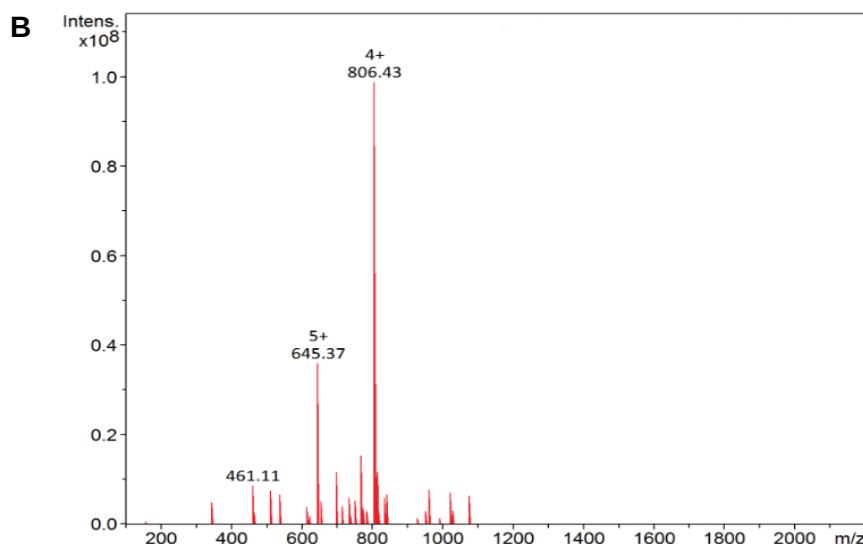
A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) permitiu a obtenção dos peptídeos histatina-5 (hst-5) e OWhistatina-5 (OWhst-5), o qual possui o aminoácido triptofano (W) na extremidade amino-terminal. A estratégia de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) como protetor base-lábil dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais permitiram o direcionamento e adição de triptofano na cadeia. A clivagem final dos peptídeos da resina Wang foi realizada através da desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais sendo efetuada pelo tratamento em TFA (95%), água deionizada (2,5%) e TIS (2,5%), a 25°C por 3 horas em agitação branda. Após a clivagem houve a purificação dos peptídeos, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com nível de pureza acima de 90%.

De modo a realizar a caracterização dos peptídeos, 1 mg de cada peptídeo puro foi solubilizado em 200 μL de solvente A (H_2O contendo 0,045% de TFA) e analisada em espectrômetro de massas, onde a razão massa/carga (m/Z) indicaram a caracterização do peptídeo. Os sinais observados na Figura 14 são referentes às massas de diferentes fragmentos gerados pelo processo de ionização (razões m/Z) do peptídeo. As cargas referentes aos prótons (H^+) são correspondentes à fração da massa molecular do peptídeo, que teoricamente é 3222,5 g.mol^{-1} para 0Whst-5 e 3036,3 para hst-5. Com isso foi possível confirmar a identidade do peptídeo sintetizado. Ao dividir a massa molecular pelo número de prótons de cada fragmento foi possível observar o valor correspondente a massa molecular dos peptídeos. Para hst-5 foram obtidos sinais de massa 380,68; 608,32; 759,87 e 1012,46, cujas razões m/Z foram 8+, 5+, 4+ e 3+, respectivamente. Para 0Whst-5 os valores de fragmentos das massas foram 645,37 e 806,43 e as cargas correspondentes foram 5+ e 4+, respectivamente.

Figura 14. Análise das massas obtidas após processo de purificação por CLAE em modo analítico por método UV/Vis com detecção de 220 nm. (A) Análise de histatina-5; (B) 0Whistatina-5.

A





Fonte: Elaborado pela própria autora, 2021.

4.2 Curvas analíticas de 0Whst-5

Para análise da eficiência de encapsulação e liberação do peptídeo 0Whst-5 das formulações lipossomais, foram traçadas curvas analíticas do peptídeo solubilizado em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e metanol. As informações das concentrações do peptídeo livre permitem avaliar a eficiência de associação e liberação do peptídeo das formulações propostas. Os valores das concentrações do peptídeo livre em tampão foram 117; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20 e 10 μ M sendo obtido uma linearidade de 0,9998, como pode ser visto na Figura 15. Para a curva analítica do peptídeo em metanol, foram utilizadas concentrações do peptídeo de 125; 112,5; 100; 87,5; 75; 62,5; 50; 37,5; 25; 12,5 μ M com linearidade de 0,9998, conforme foi observado no Figura 16. A relação linear de absorbância para diferentes concentrações do peptídeo, permitiu quantificar o peptídeo 0Whst-5 para os ensaios subsequentes. Para isso utilizou-se do método de validação em que os parâmetros de especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção e limite de quantificação foram respeitados para obter a precisão e exatidão na análise de 0Whst-5. Assim, valores inferiores a 10 μ M foram considerados imprecisos para análise em espectrofotômetro.

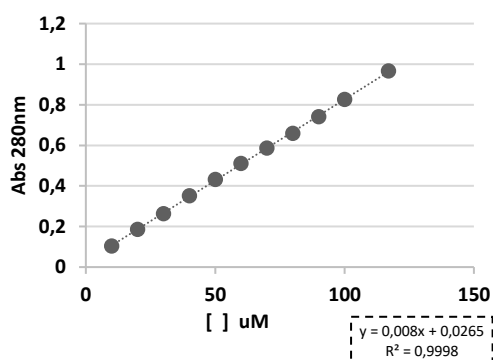


Figura 15. Espectro de absorção por concentração do peptídeo 0Whst-5 em tampão Tris-HCl

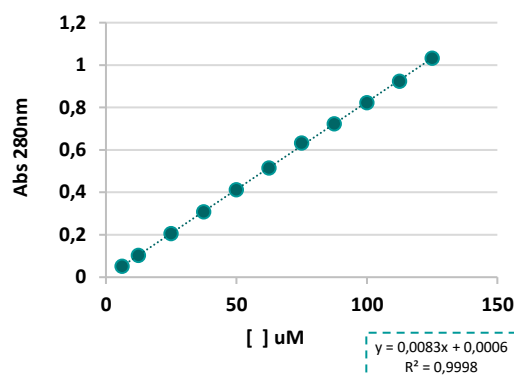


Figura 16. Espectro de absorção por concentração do peptídeo 0Whst-5 em Metanol.

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2020.

Com a adição de triptofano na extremidade amino-terminal da histatina-5, foi possível quantificar o peptídeo em baixas concentrações e analisar por espectrofluorimetria. Para essa análise foram traçadas novas curvas analíticas para 0Whst-5 em tampão Tris-HCl 10mM e metanol. As concentrações de peptídeo utilizadas em tampão Tris-HCl foram de 1; 2; 3; 4; 5; 6 μM e a linearidade obtida foi de 0,9991 como pode ser visto na Figura 17. Para metanol foram utilizadas as concentrações 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6 μM e a linearidade obtida foi de 0,9992, conforme Figura 18.

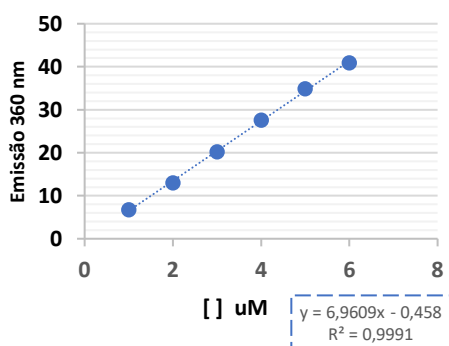


Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência por concentração do peptídeo 0Whst-5 em tampão Tris-HCl.

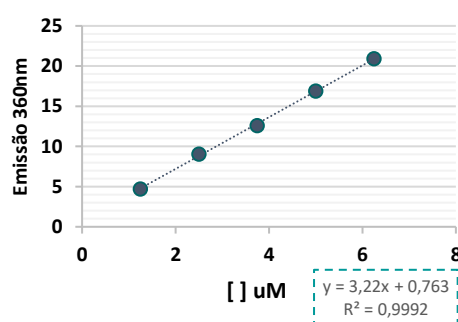


Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência por concentração do peptídeo 0Whst-5 em metanol.

Fonte: Própria autora, 2020.

Nas Figura 19 e 20 é possível ver que as concentrações excedentes a 6 µM do peptídeo 0Whst-5 geraram uma supressão dinâmica (*quenching*), no qual, a excitação de uma alta concentração de fluoróforo produziram processos colisionais não radioativos e emissões que não correspondem de forma linear às concentrações do analito, diminuindo assim a confiabilidade da quantificação do peptídeo.

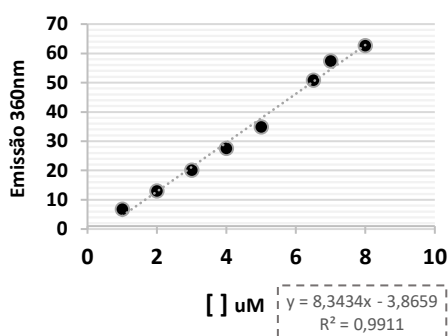


Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência por concentração do peptídeo 0Whst-5 em tampão Tris-HCl.

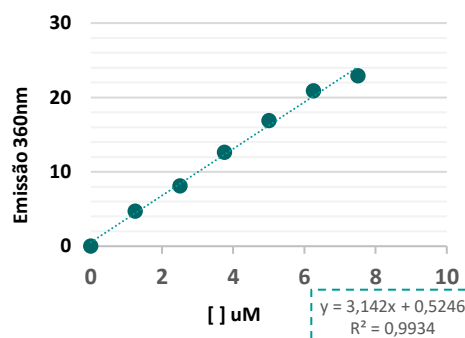


Figura 20. Espectro de emissão de fluorescência por concentração do peptídeo 0Whst-5 em metanol

Fonte: Própria autora, 2020.

4.3 Concentração inibitória mínima dos peptídeos

Utilizando a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, a qual apresenta resistência a fluconazol, foi realizado o teste de concentração mínima em microdiluição, considerando a inibição de 90% do microrganismo (CIM₉₀). Foi possível observar que a inibição ocorreu apenas para o peptídeo 0Whst-5 gerando uma inibição de 94,46% na concentração de 1,03 µg/mL (Figura 21). O antifúngico fluconazol na concentração de 64 µg/mL apresentou inibição de 63,84%, inferior à inibição necessária para atividade fungicida de 90%.

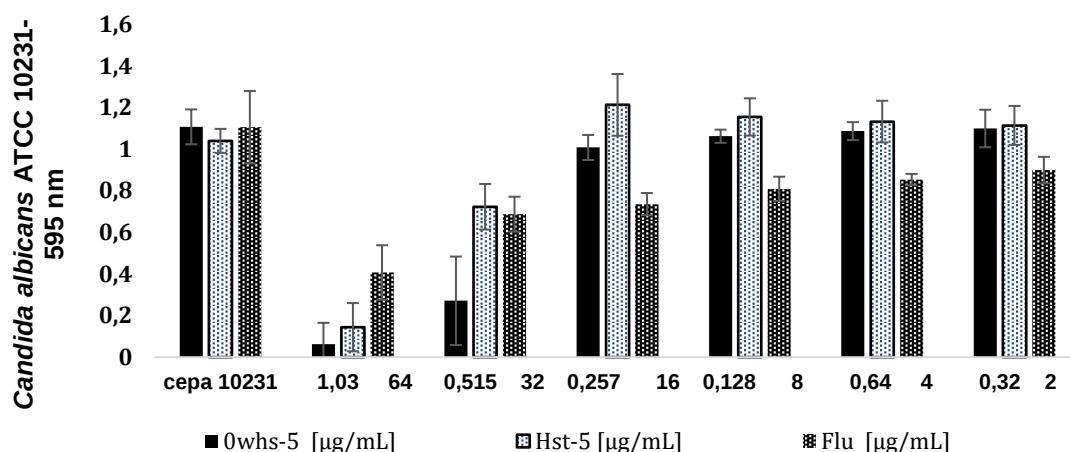


Figura 21. Concentração inibitória mínima dos derivados de histatina-5 e 0Whistatina-5.
Fonte: Própria autora, 2021.

Enquanto a concentração inibitória mínima para os peptídeos foi de 0,51 µg/mL equivalente a 160 mM, para fluconazol a concentração inibitória mínima observada de inibição ocorreu a 2 µg/mL. A análise estatística mostrou que não há alta significância entre as inibições dos peptídeos, assim como do fluconazol e, com o método de Tukey, foi possível observar que o grupo mais relevante é o 0Whst-5, pois este peptídeo apresentou maior inibição que hst-5 e fluconazol.

Apenas a média dos controles positivo e negativo não apresentou significância. Todos os controles positivos foram realizados apenas com o crescimento de cepas de *Candida albicans* e o meio de cultura Sabouraud, não apresentando alterações nas seis repetições realizadas. Os controles negativos foram realizados com adição de meio de cultura sem inóculo, observando-se ausência de turbidez ou crescimento microbiano.

4.4 Estudos de fluorescência da associação do peptídeo 0Whst-5 em lipossomas PEGuilados

O triptofano (W) em proteínas e peptídeos fornece informações que permitem a quantificação, identificação de macromoléculas, compreensão de conformações estruturais entre outras informações importantes a respeito da molécula estudada (EFTINK, 2000). No entanto, a emissão do resíduo W pode diferir nas conformações dobradas e não dobradas das proteínas, no

posicionamento extrínseco e intrínseco do W em peptídeos, concentração de macromoléculas, pH e temperatura, o que pode gerar supressão de sinal (ALSTON et al., 2008). A capacidade de extinguir a fluorescência intrínseca de resíduos de W é resultado de mudanças na polaridade do ambiente exercida pela ligação ou ligantes próximos ao resíduo de W. Em peptídeos a transferência de elétrons no estado excitado do anel indol do W para outros grupos carbonil de ligações peptídicas, é um dos principais mecanismos de supressão intramolecular (EFTINK, 2000; YAMMINE et al., 2019). Assim, para entender a associação do peptídeo aos lipossomas propostos nesse trabalho, foi sintetizado um novo análogo de histatina-5, o qual denominou-se 1Whst-5, que apresenta o aminoácido triptofano na extremidade carboxi-terminal. Com isso, através de estudos utilizando a técnica de emissão de fluorescência relativo a W, foi possível avaliar o efeito da posição deste aminoácido na cadeia do peptídeo, ao associar-se ao lipossoma. Os resultados obtidos por estes estudos estão representados na Figura 32.

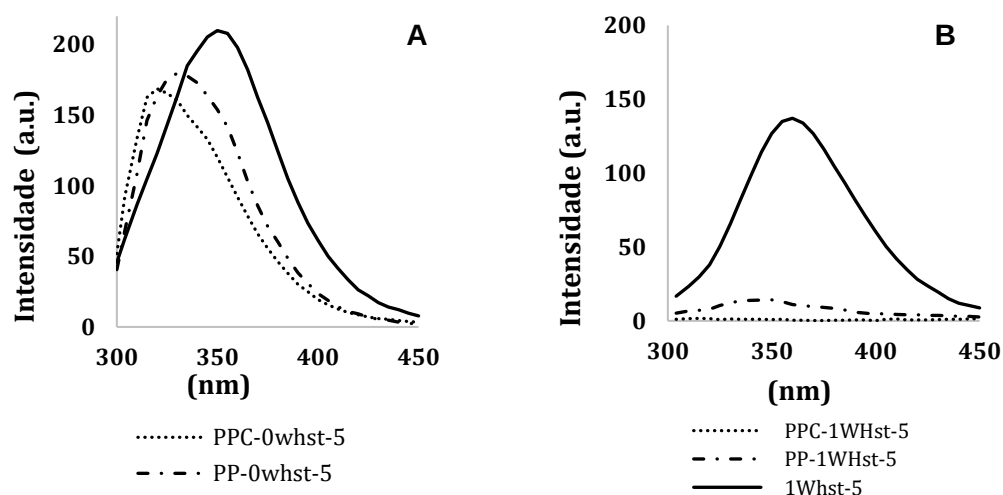


Figura 22. Espectro de fluorescência dos derivados peptídicos de histatina-5. (A) Fluorescência do espectro 0whst-5 a 100 mM e associado aos sistemas lipossomais PEG2000 e fosfolípido POPG (PP), assim como sistema formado por PEG2000, POPG e colesterol (PPC), (B) Emissão de fluorescência do peptídeo 1whst-5 a 100 mM e associado aos sistemas lipossomais PEG2000 e fosfolípido POPG (PP), assim como sistema formado por PEG2000, POPG e colesterol (PPC).

Fonte: Própria autora, 2022.

A associação dos peptídeos aos lipossomas PEGuilados PP e PPC apresentou fluorescência que resultou no deslocamento da emissão com

intensidade diminuída. Em comparação aos peptídeos, a adição de triptofano no final da cadeia gerou maior intensidade do que a presença de triptofano no início da cadeia. Na comparação do peptídeo 0Whst-5 associado ao sistema PPC e do peptídeo 1Whst-5, podemos observar a alteração espectral com a inexistência do sinal do peptídeo 1Whst-5.

O decaimento de intensidade ou supressão de fluorescência podem ocorrer por diversas razões e, para 1Whst-5 é possível estipular que parte da cadeia peptídica encontra-se na superfície e tal posicionamento pode gerar supressão aos sinais de fluorescência devido à carga superficial negativa presente nas estruturas lipossomais. A presença de tirosina próximo ao triptofano também pode ter gerado aumento na concentração de fluoróforos, diminuindo a intensidade da emissão da fluorescência.

No sistema PP pode-se observar que ambos os peptídeos apresentaram fluorescência com diferença de intensidade. Tais diferenças ocorreram devido às estruturas dos peptídeos e a presença ou ausência de colesterol que exerceu efeito lipídico, assim como o PEG2000, no qual, gera supressão de sinal, que indica o posicionamento do peptídeo na região intralamelar. Para continuidade das análises foram feitos ensaios somente com derivado 0Whst-5 devido à atividade biológica e capacidade de fluorescência.

4.5 Estudos de caracterização dos sistemas lipossomais contendo o peptídeo 0Whst-5

4.5.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos lipossomas foi avaliada pelo método de espalhamento dinâmico de luz. As análises obtidas por esta técnica permitiram caracterizar o tamanho vesicular médio, potencial zeta e índice de polidispersidade para os lipossomas (PP; PP-0Whst-5; PPC e PPC-0Whst-5) desenvolvidos pela técnica de evaporação em fase reversa. Para homogeneidade dos sistemas também foi aplicada a extrusão após a formação dos lipossomas e analisadas as características morfológicas por espalhamento

dinâmico de luz. Em comparação os sistemas de extrusão apresentaram tamanhos máximo de 202 nm (PPC-0Whst-5) e tamanho mínimo de 178 nm (PP-0Whst-5), dados obtidos após 24 horas do desenvolvimento dos lipossomas. Os sistemas sem o processo de extrusão apresentaram tamanhos maiores, chegando a 396 nm para o lipossoma vazio PP e o tamanho mínimo de 244,5 para o sistema vazio PPC, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Morfologia dos lipossomas PEGuilados após 24 horas de preparação.

	Sistemas ^a	lamelas ^b	HD (nm) ^c	PDI ^d	ZP ^e
Sem extrusão	PP	GUVs	396.06± 31.91	0.440±0.03	-99.63±3.06
	PPC	GUVs	244.50±19.47	0.442±0.03	-96.73±1.77
	PP-0Whst-5	GUVs	360.36±60.04	0.446±0.01	-88.76±2.13
	PPC-0Whst-5	GUVs	291.9±24.97	0.552±0.04	-90.26±2,57
Com extrusão	PP	LUVs	178.1±20.61	0.241±0.021	-22.8±4.43
	PPC	LUVs	189.83±0.88	0.317±0.088	-46.83±5.83
	PP-0Whst-5	LUVs	193.6±71.73	0.138±0.025	-66.9±6.41
	PPC-0Whst-5	LUVs	202.55±53.44	0.277±0.04	-55.36±4.80

Observação: ^alipossomas vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5; ^bGUVs: vesículas unilameares gigantes, LUVs: vesículas unilamelares grandes; ^cHD (raio hidrodinâmico); ^d PDI (índice de polidispersividade); ^eZP (potencial zeta).

Fonte: Própria autora, 2020.

Outros fatores observados foram o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta (ZP) dos sistemas extrusionados e não extrusionados (Tabela 3). Os resultados mostraram que os sistemas lipossomais produzidos apenas pela técnica de evaporação manual de fase reversa apresentam heterogeneidade nas estruturas, com valores de PDI acima de 0,300. Isto não ocorre com os sistemas extrusionados, que apresentaram PDI máximo de 0,317 com variação de 0,08 indicando homogeneidade no sistema. Tais diferenças podem implicar na liberação do peptídeo associado, bem como na estabilidade dos sistemas ao longo do tempo.

O potencial zeta indicou que as formulações sem extrusão possuem uma carga superficial negativa maior do que os sistemas extrusionados. Isso ocorre devido à diferença de tamanhos que pode aumentar a repulsão dos lipossomas, fato que também pode implicar na desestruturação dos sistemas impedindo um longo período de estabilidade.

4.5.2 Análise de estabilidade dos sistemas

A estabilidade dos lipossomas vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5 foi caracterizado pelo método de espalhamento de luz dinâmico. As análises realizadas permitiram monitorar os tamanhos médios vesiculares, potenciais zeta e polidispersividade para os lipossomas extrusionados e não extrusionados após armazenamento em temperatura de 4°C. Os sistemas extrusionados apresentaram tamanho máximo de 254 nm (PPC-0Whst-5) e tamanho mínimo de 165 nm (PP-0Whst-5), dados obtidos no primeiro dia de análise, como pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4. Estabilidade dos lipossomos.

Sistemas/ Dias	PP-T			PPC-T			PP 0Whst-5			PPC 0Whst-5		
	HD (nm) ^a	PDI ^b	ZP ^c (mV)	HD (nm) ^a	PDI ^b	ZP ^c (mV)	HD (nm) ^a	PDI ^b	ZP ^c (mV)	HD (nm) ^a	PDI ^b	ZP ^c (mV)
1º	178,6 ±0,52	0,231 ±0,01	-37,93 ±1,15	244,5 ±4,83	0,170 ±0,03	-47,13 ±1,28	165,43 ±0,76	0,203 ±0,08	-13,36 ±0,70	254,4 ±4,73	0,231 ±0,01	-18,23 ±0,55
14º	179,9 ±19,77	0,071 ±0,04	-47,23 ±1,02	195,93 ±4,25	0,120 ±0,03	-51,2 ±0,78	201,46 ±13,50	0,124 ±0,08	-45,03 ±1,28	189,96 ±3,00	0,140 ±0,043	-65,9 ±0,3
28º	165 ±4,61	0,233 ±0,009	-44,06 ±1,95	205,53 ±5,97	0,134 ±0,03	-45,46 ±0,73	242,7 ±21,59	0,158 ±0,11	-83,43 ±10,78	209,36 ±9,73	0,206 ±0,02	-37,10 ±0,36
42º	144,73 ±1,88	0,234 ±0,01	-35 ±2,56	145,66 ±4,11	0,179 ±0,06	-40,10 ±1,95	146,8 ±7,54	0,317 ±0,08	-29,30 ±3,98	199,73 ±10,36	0,188 ±0,01	-45,13 ±3,18
70º	534,96 ±12326	0,480 ±0,246	-37,46 ±1,32	132,93 ±9,32	0,373 ±0,08	-35,53 ±0,23	638,8 ±174,36	0,565 ±0,27	-68,60 ±4,95	139,43 ±0,25	0,441 ±0,05	-49,30 ±2,90

Observação: ^aHD (raio hidrodinâmico); ^bPDI (índice de polidispersividade); ^cZP (potencial zeta).

Fonte: Própria autora, 2020.

Um comportamento semelhante foi observado até o 42º dia de armazenamento, evidenciando uma boa estabilidade das formulações propostas. Observando os dados referentes ao 70º dia de armazenamento, é possível concluir que a formulação contendo PPC é mais estável que a contendo PP, a qual evidencia-se sofrer agregação tanto na ausência (PP-T) quanto na presença do peptídeo (PP-0Whst-5), as quais apresentaram tamanhos superiores a 500 nm.

Vale destacar que para as formulações utilizadas nestes estudos, foi utilizada uma membrana de extrusão de 400nm, o que não alterou o tamanho máximo dos lipossomas. Isso deve-se, ao fato, das interações dos fosfolipídios (POPG) ser restrita quanto a concentração e volume de moléculas, o qual impede a formação de vesículas unilameres estáveis superiores a 300 nm.

Outro fator observado foi índice de polidispersividade, os quais mantiveram abaixo 0,350 até o 42º dia de armazenamento (Tabela 4). Esses dados permitem concluir que os sistemas lipossomais mantiveram-se estáveis como sistemas vesiculares unilameres homogêneos, o que pode resultar em uma liberação controlada e prolongada do peptídeo.

Após o período de 70 dias de armazenamento, novamente os dados indicam para uma possível agregação vesicular, devido à grande variação do índice de polidispersividade. Novamente é possível observar que a formulação contendo PP é menos estável que a contendo PPC, o que está de acordo com o observado nas análises de tamanho médio das vesículas.

Os valores de potencial zeta representam a carga superficial e a interação eletrostática com sistema coloidal, podendo apresentar cargas com valores positivos ou negativos. Suspensões altamente defloculadas, costumam apresentar potencial zeta entre +60mV e -60mV. Para as formulações propostas neste projeto foi observado valores iniciais abaixo de -50mV, tendo alterações mais significativas no 28º dia e 70º dia de armazenamento para formulação PP-0Whst-5, como pode ser observado na Tabela 4. Novamente os dados sugerem uma maior heterogeneidade e possível floculação e SMISTAD e colaboradores (2011) afirmam que as formulações lipossomais com carga negativa, como presente na PPC e PP, não realizam interações positivas com *Candida albicans*, porém realizam adsorção significativamente melhor do que os lipossomas com carga positiva. Outro fator analisado nesse mesmo estudo foi a influência da carga dos lipossomas após a interiorização dos ativos. Para as formulações proposta nesse trabalho foi observado que os lipossomas associados ao peptídeo 0Whst-5 apresentaram uma carga superficial menor do que observado nos lipossomas não associados. Isso deve possivelmente às interações eletrostática entre a região lamelar e o peptídeo, devido a carga líquida de 0Whst-5 em meio neutro (pH 7,0) ser próxima a +5,7 e o fosfolípido POPG apresentar carga negativa.

4.5.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Os lipossomas também foram caracterizados quanto à morfologia da vesícula utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). As imagens apresentadas na Figura 22 revelaram que a extrusão permite a formação de lipossomas grandes homogêneos e, também, de pequenas estruturas dispersas no meio, o que explica a variabilidade de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta observados por meio de espalhamento dinâmico de luz. No entanto, quando a extrusão é realizada após a formação dos lipossomas a diferenciação de tamanho diminui.

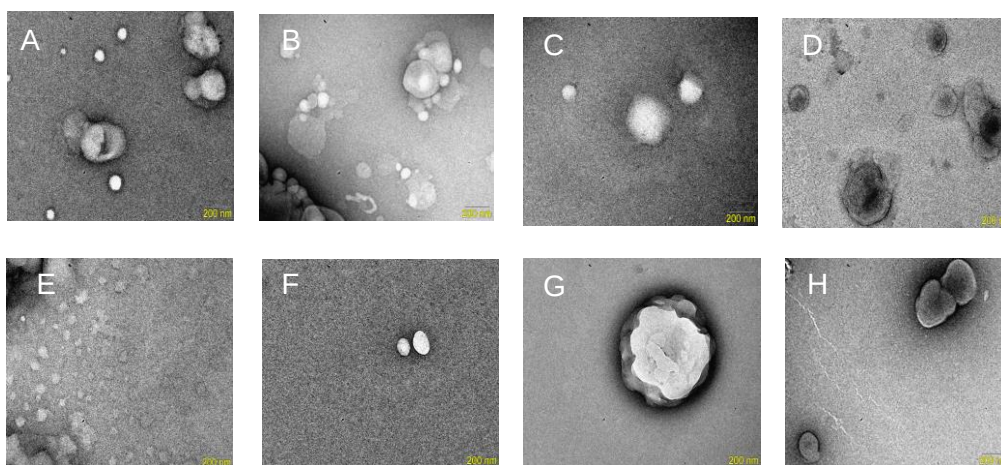


Figura 23. Microscopia de transmissão eletrônica das vesículas lipossomais PEGuilados produzidos pelo método de fase reversa. (A) PP vazio sem extrusão; (B) PP-0W sem extrusão; (C) PPC vazio sem extrusão; (D) PPC-0W sem extrusão; (E) PPC vazio com extrusão; (F) PPC-0W com extrusão; (G) PP vazio com extrusão e (H) PP-0W com extrusão.

Fonte: Própria autora, 2022.

4.5.4 Avaliação da eficiência de associação do peptídeo 0Whst-5 nos sistemas lipossomais

Posterior à análise morfológica, os lipossomas foram avaliados quanto a eficiência de associação ao peptídeo 0Whst-5, o qual foi escolhido por conter o aminoácido triptofano (W) em sua extremidade amino-terminal, podendo ser quantificado por fluorescência, que é uma técnica que permite maior sensibilidade para quantificação. Inicialmente foi realizado um procedimento de ultracentrifugação que permitiu a separação do sistema coloidal (lipossoma contendo peptídeo) do peptídeo que não se associou ao lipossoma (peptídeo

livre). Isto porque os lipossomas não ultrapassam a membrana do microtubo, visto que possuem tamanho superior aos poros existentes no filtro. No entanto, o peptídeo livre consegue permear pelo filtro, pois possui tamanho inferior aos poros da membrana. Com isso, o sistema coloidal retido no filtro foi tratado com 3 mL de metanol para desintegração dos lipossomas e, em seguida, analisado através de espectrofluorimetria, quantificando o peptídeo 0Whst-5 que foi associado aos lipossomas. Na Tabela 5 encontram-se os valores máximos de emissão de fluorescência medidos a 360 nm para as formulações estudadas.

Tabela 5. Máximo de emissão de fluorescência medidos a 360 nm obtidos pelas formulações da porção retida pelo filtro após tratamento com metanol e do conteúdo filtrado.

Retido		Filtrado	
Amostras	(nm)	Amostras	(nm)
PP-T	11,10	PP-T	11,10
PPC-T	11,90	PPC-T	8,59
PP-0Whst-5	48,44	PP-0Whst-5	7,48
PPC-0Whst-5	87,21	PPC-0Whst-5	3,20

Fonte: Própria autora, 2020.

Após a obtenção dos valores médios das amostras realizadas em triplicata, foi feito a subtração dos lipossomos associados ao peptídeo e lipossomas somente contendo tampão, o que permitiu a obtenção dos valores da emissão real, pois as formulações lipossomais apresentam turbidez, o que pode ser um interferente no momento da quantificação, como pode analisado na Equação 9.

Equação 9. Valores da diferença de emissão de fluorescência entre lipossomas.

$$\text{Emissão} = \text{lipossoma associado} - \text{lipossoma contendo tampão}$$

PP (retido)	PPC (retido)
$48,44 - 11,10 = 37,34$	$87,21 - 11,90 = 75,31$
PP (filtrado)	PPC (filtrado)
$11,10 - 7,48 = 3,62$	$11,90 - 8,59 = 3,31$

Os resultados das amostras obtidos após a subtração dos valores das formulações contendo somente tampão foram, então, submetidas a equação de regressão linear ($y = 3,22x + 0,763$, $R^2 = 0,9992$) correspondente a reta da curva padrão obtido por espectrofluorimetria para diferentes concentrações do peptídeo em metanol. Os valores da concentração molar para formulação (PP-retido), (PPC-retido), (PP-filtrado) e (PPC-filtrado) foram 11 μ M, 35 μ M, 23,15 μ M, 0,88 μ M e 0,79 μ M respectivamente. Posterior a submissão dos cálculos os valores obtidos foram utilizados para a determinação da eficiência na Equação 10.

Equação 10. Cálculo de eficiência de encapsulação.

$$EE (\%) = \frac{\text{Total Adicionado} - \text{Total Associado}}{\text{Total adicionado}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{\text{PP (retido)}}{100,07 - 11,35} \times 100 = 88,65\%$$

$$EE (\%) = \frac{\text{PPC (retido)}}{99,67 - 23,15} \times 100 = 76,77\%$$

As formulações apresentaram boa eficiência de encapsulação tendo o lipossoma PP uma taxa de associação ao peptídeo de 88,65%, valor próximo a 90% presente no trabalho de Szoka e Papahadjopoulos (1978). Assim, a associação do peptídeo antifúngico OWhst-5 em lipossomas através da técnica utilizada neste trabalho, mostrou-se eficiente. A associação de antifúngicos às estruturas lipossomais podem alterar a farmacocinética dos compostos, permitindo que os ativos tenham o potencial de ação frente ao patógeno, exercendo de forma conjunta a diminuição de efeitos adversos.

5.5.4 Estudos de estabilidade dos sistemas lipossomais em meio ácido

A saliva é a principal responsável pela proteção da cavidade oral através da liberação de íons, tampões alcalinos e peptídeos antimicrobianos que permitem que o pH oral seja mantido entre 6,8 a 7,5 (DAWES et al., 2019). No entanto, em indivíduos que apresentam doença bucal, devido à baixa produção salivar, o pH da cavidade oral pode mudar de neutro para 5,5 a 4,5 e

tornar-se prejudicial aos dentes e mucosa oral. Além disso, o ambiente ácido pode contribuir para a proliferação de microrganismos oportunistas como *Candida albicans*. Assim, os sistemas lipossomais após a extrusão foram testados em meio ácido e analisados quanto à degradação e morfologia por análise dinâmica de espalhamento de luz. Em meio tamponado em pH 5,5 os lipossomas contendo colesterol (PPC e PPC-0Whst-5) aumentaram o tamanho vesicular médio de 189 nm para 392 nm para PPC vazio e de 202,5 nm para 603 nm na formulação PPC-0Whst-5 (Figura 24). Este indicativo coincide com a degradação dos lipossomas vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5 devido à protonação das cadeias fosfolipídicas com desregulação das interações intermoleculares dos fosfolipídios, da cadeia polietilenoglicol e colesterol, atividade também analisada por Jacobsohn e colaboradores (1994) com vesículas lipossomais formadas por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. A formulação de PP em pH 5,5 permaneceu estável mesmo com um aumento no tamanho médio das vesículas de 178,1 nm para 265 nm em PP vazio e de 193,6 nm para 359,76 nm na formulação PP-0Whst-5, tendo valores médios de PDI de 0,192 e 0,156 respectivamente, valores que indicam homogeneidade nos sistemas devido à fluidez (Figura 23). Em meio ácido com pH 4,5 os sistemas PP e PP-0Whst-5 passam do tamanho vesicular médio para 341,3 nm (PP) e 308,4 nm (PP-0Whst-5) com PDI 0,293 e 0,367 confirmando a homogeneidade dos sistemas. Os valores de carga superficial de todos os sistemas em pH 5,5 e pH 4,5 diminuíram devido ao meio ácido.

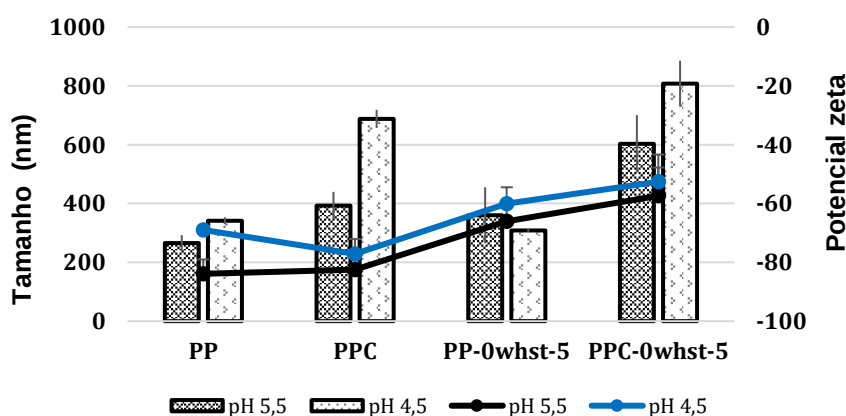


Figura 24. Estabilidade dos sistemas lipossomais vazios e associado ao peptídeo 0Whst-5 em meio ácido de pH 4,5 e pH 5,5.

Fonte: Própria autora, 2022.

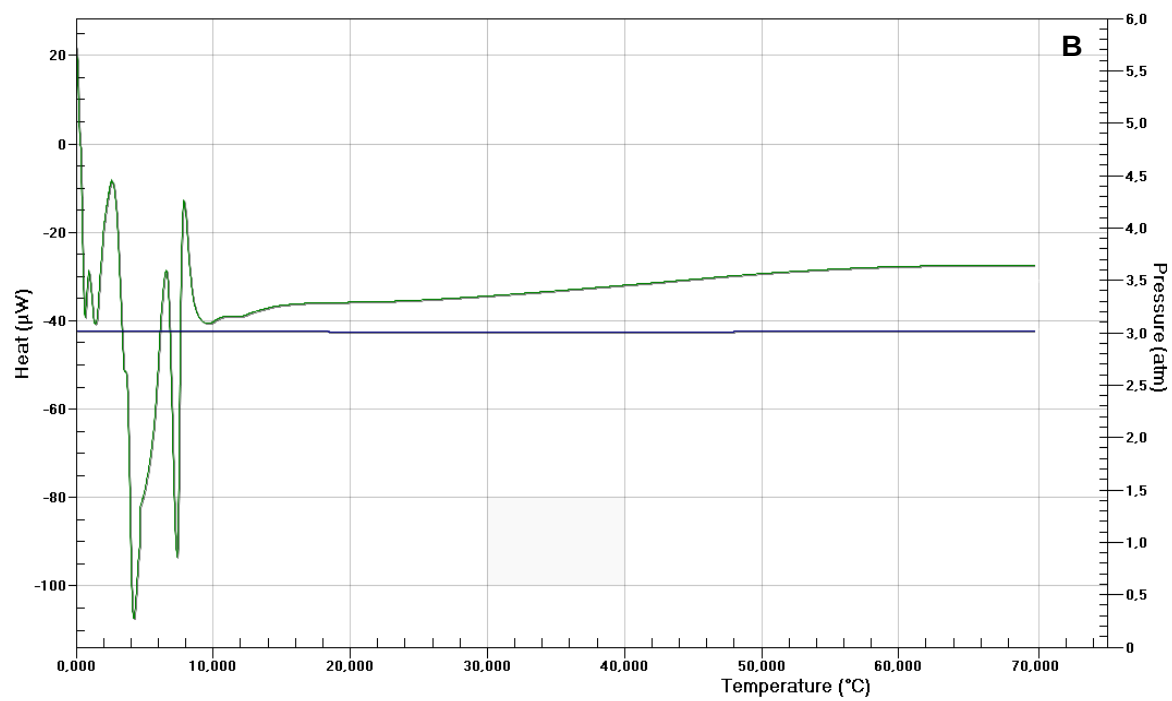
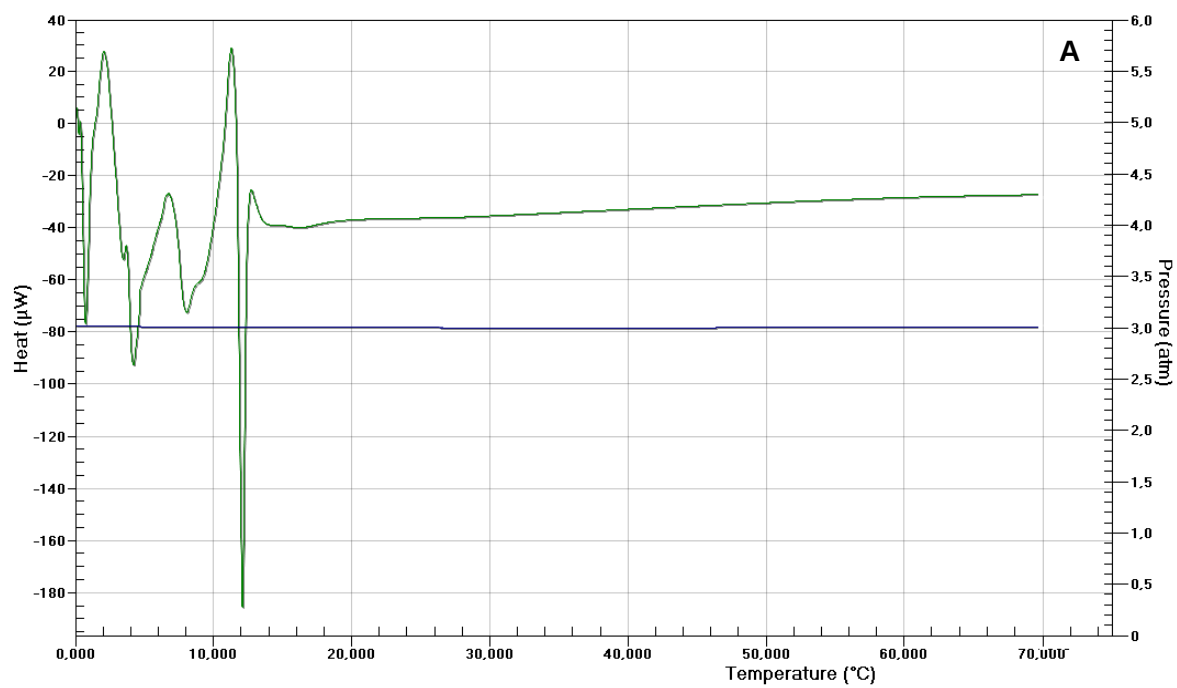
As alterações morfológicas observadas em meios ácidos geram um indicativo de como os lipossomas podem agir nos biofilmes orais, onde o pH do meio reduzido pela atividade microbiana irá provocar a desintegração estrutural dos lipossomas, favorecendo a liberação do peptídeo pelos sistemas e permitindo que o mesmo consiga ultrapassar as barreiras geradas nos biofilmes.

4.5.5 Estudos calorimétricos com as formulações lipossomais

As análises das formulações por calorimetria diferencial de varredura foram realizadas para verificar a presença de possíveis alterações físico-químicas existentes entre os constituintes presentes nos sistemas lipossomais. Os perfis apresentados na Figura 24 não demonstram a transição de fase, mas puderam informar se houve diferenciação nas conformações dos lipossomas vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5.

As variações de fases observadas nos sistemas lipossomas foram observadas próximo a 10°C, valores correspondentes à variação de água. No entanto, cada sistema apresentou calorimetria distintas.

Em lipossomas contendo somente o polímero PEG 2000 e fosfolípido, a formulação apresentou características fluidas até 10°C com capacidade de liberar energia, enquanto o mesmo sistema associado ao peptídeo apresenta característica endotérmicas correspondente a uma estrutura mais rígida.



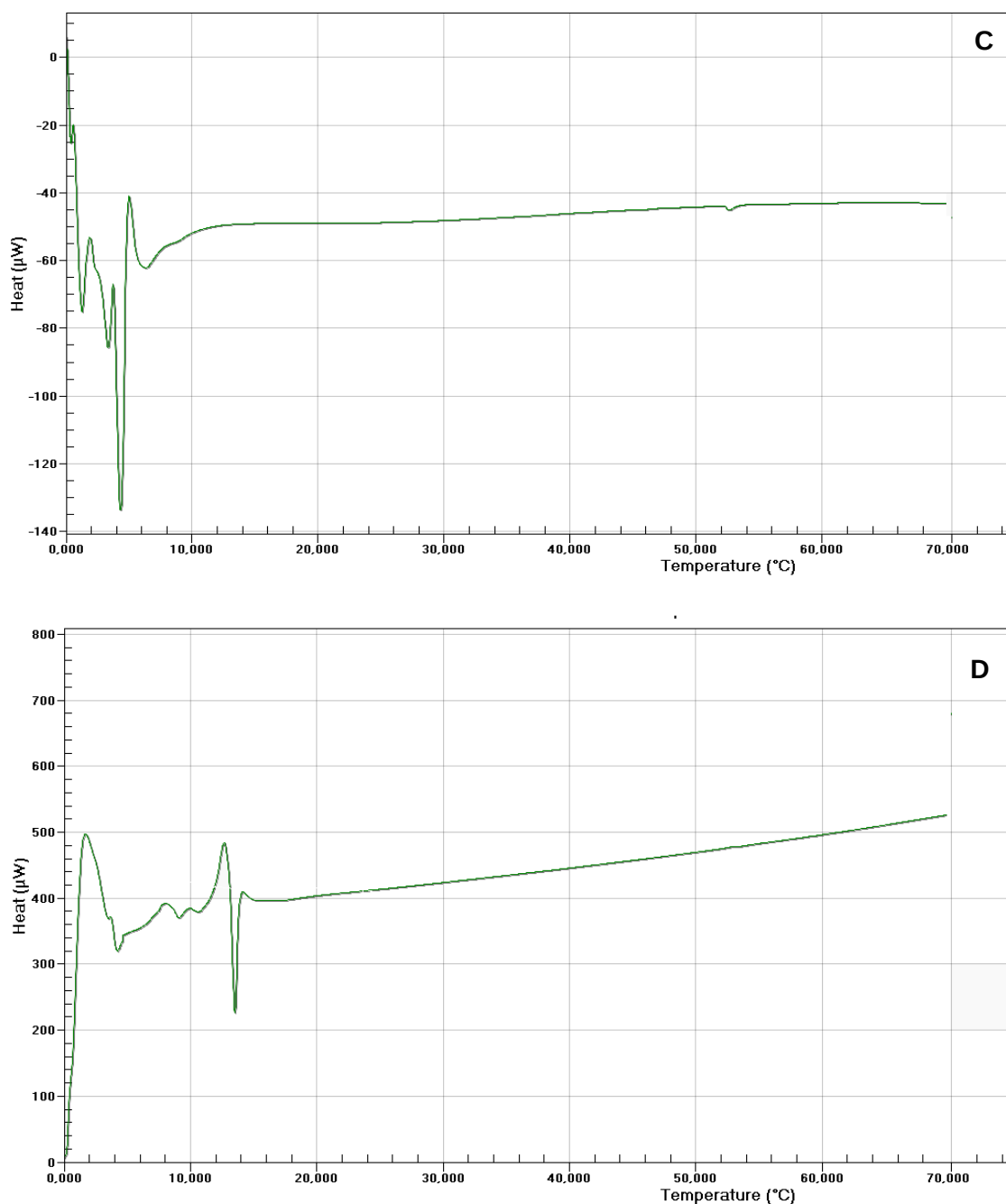


Figura 25. Análise de calorimetria diferencial de varredura dos lipossomas PP e PPC vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5. (A). Corresponde ao lipossoma PP vazio; (B). Lipossoma PP associado ao peptídeo 0Whst-5; (C). Corresponde ao lipossoma PPC vazio e (D). Lipossoma PPC associado ao peptídeo 0Whst-5.

Fonte: Própria autora, 2020.

Tais observações são devido às possíveis interações lamelares do lipossoma com o peptídeo, o que impede a capacidade de fluidez. Para os sistemas contendo colesterol (PPC) também foi possível observar alterações significativas entre o sistema vazio e associado ao peptídeo 0Whst-5, isso porque na formulação associada ao peptídeo, em temperatura acima de 80°C

apresentou aumento na capacidade de fusão, o que indica agregação dos constituintes, os quais, novamente pode ser gerado pela interação lamelar do peptídeo.

Estes resultados também são um forte indicativo de que é possível que o peptídeo esteja localizado entre as lamelas lipossomais, as quais sofrem uma diferença comportamental nos estudos calorimétricos aqui apresentados. Neste caso, a possibilidade de o peptídeo encontrar-se interiorizado nos lipossomas, começa a se tornar remota, já que se este fato estivesse ocorrendo, não seriam observadas diferenças significativas nas características de fluidez das lamelas.

4.5.6 Estudos de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular é utilizada para a caracterização de sistemas quirais, baseado em fenômeno óptico de absorção da luz circular polarizada (LCP), através do dicroísmo circular pode ser observado diversas regiões do espectro eletromagnético. Por isso, o dicroísmo pode ser utilizado para várias abordagens experimentais, como análise da orientação dos peptídeos inseridos em modelos de membrana celular (HALES, 2011; WALLACE; JANES, 2009). As orientações assumidas por peptídeos e proteínas podem interferir na atividade e interações aos alvos moleculares. Especificamente para o peptídeo histatina-5, a presença de quatro histidinas nas posições 15, 18, 19 e 2, as três lisinas em 11,13 e 17, bem como as duas argininas em 12 e 22, são críticas para a atividade antifúngica independente da estrutura secundária formada (RAJ *et al.*, 1990). Histatina-5 em tampão tende a apresentar uma estrutura secundária aleatória (RAJ *et al.*, 1990). Na análise de dicroísmo circular realizada com o peptídeo 0Whst-5 foi possível observar este peptídeo em tampão Tris-HCl pH 7,4 também possui uma estrutura aleatória, como pode ser observado na Figura 25.

A associação do peptídeo 0Whst-5 a lipossomas PEGuilados contendo fosfolípido, PEG2000 e colesterol (PPC) não permitiu o desenvolvimento de uma estrutura secundária que exercesse rigidez sobre o peptídeo. No entanto,

a formulação contendo apenas fosfolípido e PEG200 (PP), permitiu que a estrutura aleatória de 0Whst-5 fosse mantida, porém com intensidade diminuída.

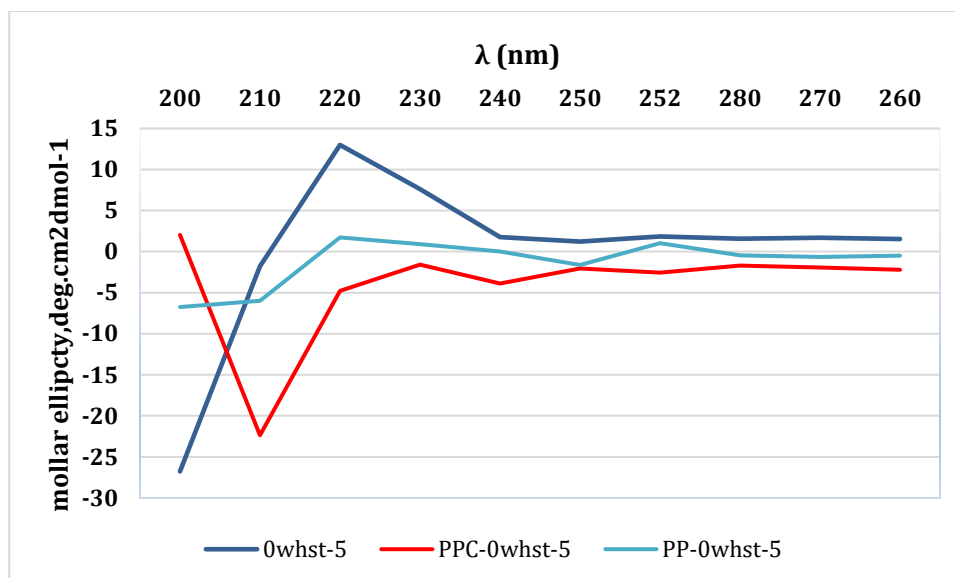


Figura 25. Análise do dicroísmo circular do peptídeo 0Whst-5 livre e associado aos lipossomas PEGuilados PP e PPC.

Fonte: Própria autora, 2021.

Estes resultados novamente são um indício de que nos sistemas lipossomais produzidos com o peptídeo 0Whst-5, o mesmo deve provavelmente estar localizado entre as lamelas lipossomais, já que não se observa diferenças significativas da estrutura do mesmo, quando interagindo com os lipossomas. Se o peptídeo estivesse na parte interna dos lipossomas, provavelmente seu sinal de dicroísmo iria sofrer alteração bastante considerável.

4.6 Estudos de atividade antifúngica dos sistemas lipossomais

4.6.1 Curva de crescimento e morte celular de *Candida albicans*

A análise de crescimento da cepa de *C. albicans* ATCC 101231 em quando em contato com lipossomas vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5, foi realizada por meio do crescimento em solução empregando a mesma

concentração de 0Whst-5 obtida na determinação da CIM₉₀. Nas curvas de crescimento verificou-se que houve mudança no crescimento em relação ao controle positivo (Figura 26). Foi possível observar que na fase Lag, determinada pelo período de possível adesão às superfícies do microrganismo, não houve crescimento devido ao processo de adaptação do microrganismo. Nas fases subsequentes de crescimento notou-se que houve alteração significativa no crescimento da cepa ATCC 10231 em contato com a formulação PPC vazia nos períodos de 24 horas e 48 horas, enquanto a formulação associada ao peptídeo não apresentou alteração significativa nesses dois períodos, apresentando crescimento semelhante ao controle positivo. As formulações PP vazia e PP-0Whst-5 apresentaram inibição no crescimento com crescimento semelhante. No período de 24 horas a formulação PP apresentou inibição de 35,15% enquanto PP-0Whst-5 12,99%. No período de 48 horas a formulação PP passa a apresentar inibição de 21,57% enquanto PP-0Whst-5 passou a inibir o fungo em 19,32% em relação ao controle positivo.

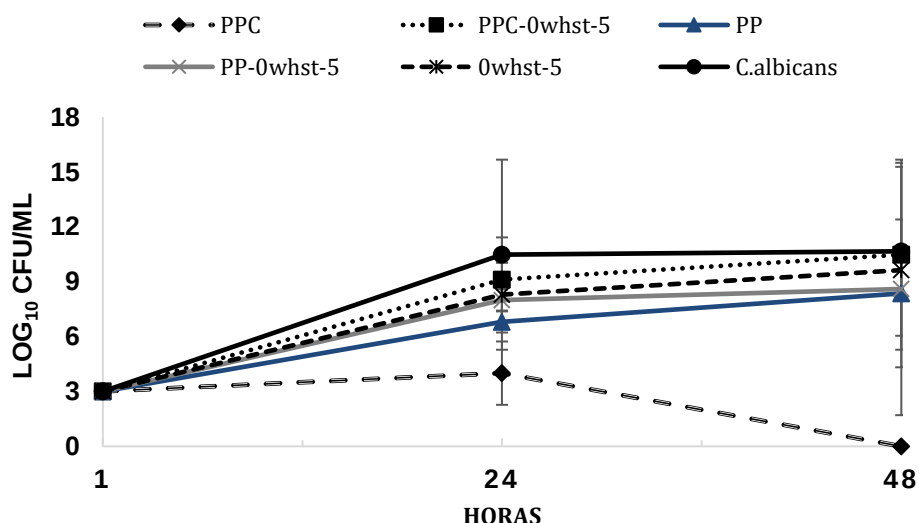


Figura 27. Ensaios de Time-Kill dos lipossomas PEGuilados vazios e associados ao peptídeo 0Whst-5 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Notas: A inibição de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 em contato com sistemas lipossomais e peptídeo 0Whst-5 foi apresentada por linhas para diferentes períodos de crescimento, com adição de desvios padrão representados no gráfico. O ensaio *Time-kill* mostra diferença significativa com nível de significância $p=0,33 > p 0,05$ devido à morte celular causada pelo PPC vazio, assim como o desvio padrão observado após 48 horas em contato com os sistemas lipossomais.

Fonte: Própria autora, 2021.

O peptídeo 0Whst-5 em 24 horas gerou inibição de 20,72% enquanto em 48 horas a inibição diminuiu para 9,9%, resultado semelhante ao encontrado na concentração inibitória mínima. A associação do peptídeo à formulação de PP PEGuilado trouxe uma inibição no crescimento do microrganismo superior ao peptídeo livre, sendo indicativo da capacidade antimicrobiana das formulações. O sistema PP associado ao peptídeo exerceu maior inibição que a formulação vazia em 48 horas, indicando que houve um aumento na circulação do peptídeo sendo capaz de alterar o crescimento do microrganismo.

4.6.2 Análise da capacidade antifúngica do sistema selecionado visando a inibição do biofilme por *Candida albicans*.

Devido à complexidade e diversidade dos biofilmes orais produzido por *Candida albicans* foi realizada a seleção do sistema PP (PEG2000 e POPG) para dar andamento nas próximas etapas do projeto. A escolha de tal formulação foi por ter apresentado maior porcentagem de associação do peptídeo 0Whst-5 em concentração molar de 100 mM, tamanho vesicular médio inferior a 200 nm, o que aumenta a permeabilidade ao biofilme e estabilidade em pH ácido, em comparação a formulação PPC. De fato, a análise de estabilidade ao longo do período, principalmente para os sistemas extrusionados ocorrem melhor para o sistema PPC, porém as análises de diferencial calorimétrico e dicroísmo circular demonstraram que o tipo de interação entre o lipossoma e o peptídeo preserva mais as características do peptídeo, o que pode permitir melhor atividade antifúngica do sistema. Sendo assim, optou-se por dar sequência nos estudos envolvendo biofilme de *C. albicans*, utilizando apenas o sistema PP-0Whst-5.

4.6.3 Ensaio de morte celular

O ensaio de morte celular foi realizado com o sistema PP-0Whst-5, o controle lipossômico contendo apenas tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, o peptídeo livre na concentração de 0,320 µg/mL e fluconazol na concentração de 256 µg/mL. O inóculo inicial da cepa ATCC 10231 foi aplicado a 1×10^7

UFC/mL. Após o período de adesão, o inóculo foi diluído e plaqueado, e o número de colônias por mL foi observado após um período de 48 horas. Para este teste, as soluções contendo a formulação com ou sem o peptídeo e a solução de fluconazol foram filtradas através de uma membrana de 0,22 µm, na tentativa de evitar contaminação. Os processos infecciosos gerados por *Candida albicans* são identificados a partir de uma concentração de 1×10^5 a 1×10^7 UFC/mL (FAKHIM *et al.*, 2018). Portanto, no teste de morte celular, foi simulada a ação das formulações contra o processo invasivo realizado por *Candida albicans* em uma concentração de 1×10^7 UFC/mL em adsorção aos sistemas lipossomais e peptídeo livre, como pode ser analisado na Figura 27.

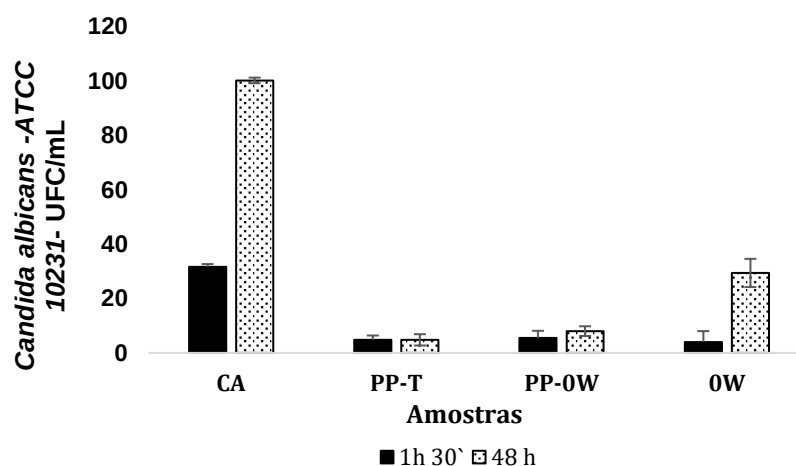


Figura 28. Ensaio de extermínio de *Candida albicans* (ATCC 10231) em lipossoma de adsorção PEGuilado vazio (PP-T), lipossoma associado a OWhst-5 (PP-OW) e peptídeo Owhst-5 livre (OW), nos tempos de 1 hora e 30 minutos e após 48 horas.

Fonte: Própria autora, 2021.

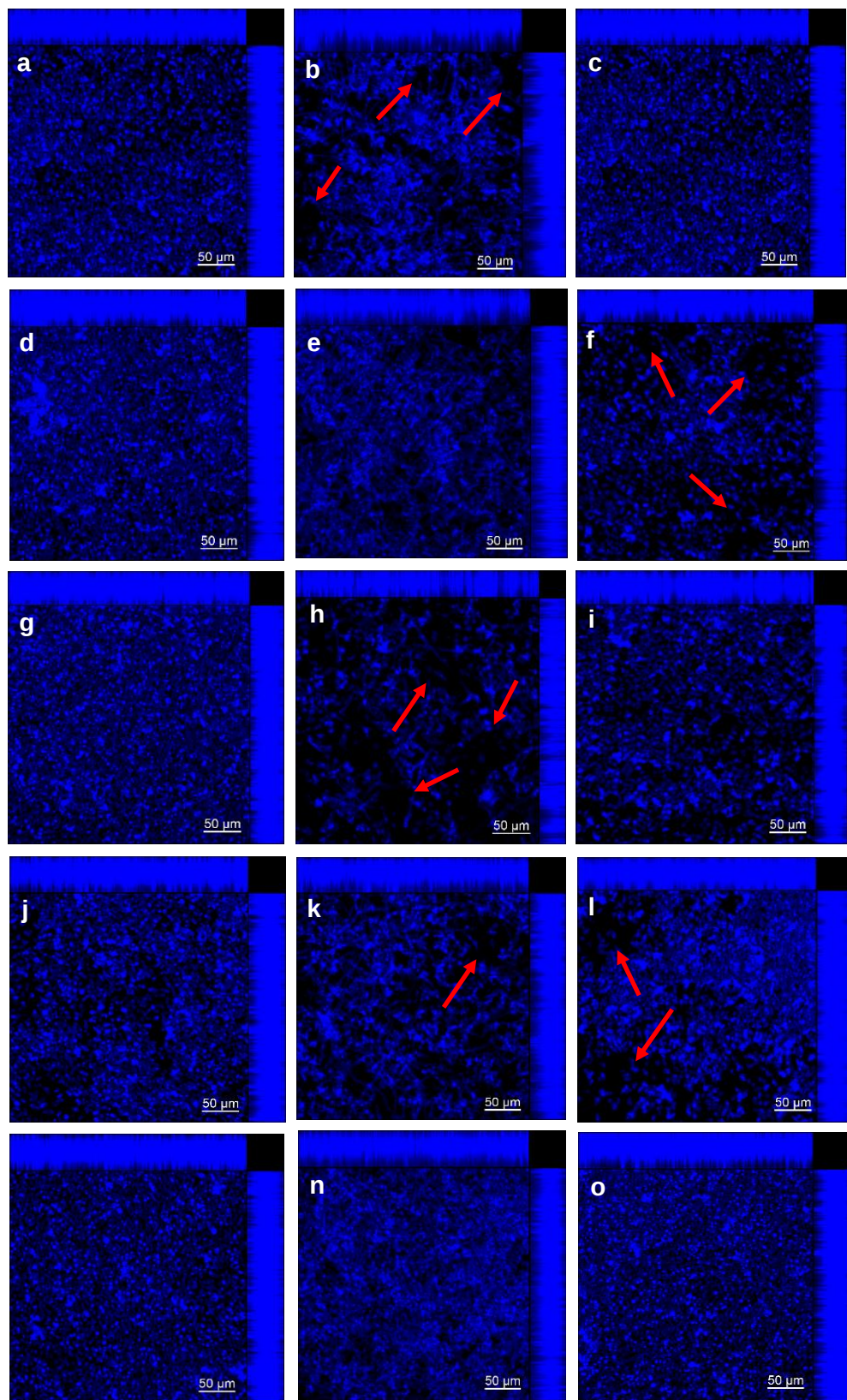
Para análise de ensaio de morte foi observado que os lipossomas PEGuilados geraram inibição no crescimento de *Candida albicans* de forma superior a ação do peptídeo OWhst-5 e controle, ausente de agentes antimicrobianos, após 48 horas. Isso porque, em sistema fechado os lipossomas podem alterar fatores de regulação celular, como a respiração celular, impedindo o crescimento celular. Para o peptídeo livre a ação antifúngica apresentou efeito após 48 horas em comparação ao controle. No entanto, a capacidade proteolítica de *Candida albicans* gerada por enzimas como a família das aspartato protease pode inibir ação do peptídeo através da

clivagem das ligações peptídicas. Enquanto, a ação do peptídeo ao lipossoma pode ser prolongada, devido à ação do polímero (PEG2000), o qual é capaz de inibir parcialmente a ação de enzimas. Basseti e colaboradores (2020) relatam que associação dos antimicrobianos podem ir além das melhorias farmacocinéticas, pois, os lipossomas podem agir sobre mecanismos de resistência como os biofilmes e agir como barreira contra a inativação das substâncias antimicrobianas.

4.6.4 Estudo de viabilidade celular por microscopia confocal

Através da microscopia confocal, foi possível observar a ação dos sistemas lipossomais em diferentes fases da formação do biofilme. Foram utilizados nesse estudo, a formulação PP sem o peptídeo, PP-0Whst-5 e fluconazol, principal antifúngico comercial indicado para o tratamento da candidíase. No período de 90 minutos, período necessário para adesão e dimorfismo celular de *Candida albicans*, não houve inibição significativa para nenhum dos agentes testados (Figura 28). No período de maturação do biofilme (24 horas), foi possível analisar que o lipossoma vazio e o fluconazol apresentaram inibição semelhante no crescimento de *C. albicans*, o que indicou interferência do sistema lipossomal no crescimento do fungo. No entanto, quando os sistemas são aplicados no início da adesão até o período final de maturação (48 horas), foi possível observar que PP-0Whst-5 e peptídeo livre geram alteração no crescimento de *C. albicans*, superior àquela observado com fluconazol.

A



1h 30`

48 horas

24 horas

Figura 29. Análises de viabilidade celular e formação de biofilme em adsorção aos sistemas lipossomais. As setas vermelhas indicam inibição no crescimento de *Candida albicans*. (A) Crescimento da cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 existente após adsorção ao sistema lipossomal, peptídeo livre e fluconazol com coloração de quitina por calcofluor-white: (a) Efeito do PP vazio em 90 minutos de adsorção; (b) PP vazio na adsorção após 48 horas; (c) Ação do PP vazio após 24 horas; (d) PP-0whst-5 em adsorção por 90 minutos; (e) Ação inibitória em 48 horas; (f) Atividade inibitória em 24 horas; (g) Atividade livre do peptídeo 0whst-5 em 90 minutos de contato; (h) 0whst-5 após 48 horas; (i) 0whst-5 na adsorção após 24 horas; (j) Ação do fluconazol em 90 minutos; (k) Atividade do fluconazol em 48 horas; (l) Atividade do fluconazol em 24 horas; (m) ATCC 10231 cultivado em meio RPMI-1640 tamponado com Hepes em 90 minutos; (n) ATCC 10231 cultivado em RPMI-1640 após 48 horas; (o) ATCC 10231 cultivado em 24 horas. (B) cepa ATCC 10231 cultivada em 48 horas
 Fonte: Própria autora, 2021.

4.6.5 Estudo de viabilidade celular por rezasurina

Para quantificar a ação dos agentes PP, PP-0Whst-5, 0Whst-5 livre e fluconazol nas diferentes fases de crescimento de *C. albicans*, foi utilizado o método colorimétrico de resazurina. A resazurina atua como um indicador de viabilidade celular e, na presença de células metabolicamente ativas, desenvolve uma coloração característica e quantificável. No período estabelecido para adesão (90 minutos), foi possível observar que os lipossomas vazios, assim como o peptídeo livre, interferem na atividade metabólica de *C. albicans*, possivelmente desempenhando uma atividade fungistática, na qual não há morte celular, mas pode gerar desregulação dos mecanismos relativos à respiração celular, sendo observado na Figura 29. A análise relativa da maturação no período de 24 horas, todos os componentes exibiram a mesma alteração na viabilidade celular em comparação ao controle de crescimento em RPMI-1640 tamponado com Hepes, pH 7,4. Na análise de adesão e maturação do biofilme no período de 48 horas, foi possível observar que o metabolismo do microrganismo permanece alterado para PP-0Whst-5 e com leve aumento da viabilidade celular para 0Whst-5 livre. Para PP vazio, a viabilidade celular foi mantida em 100% e para fluconazol na concentração de 256 µg/mL, foi próximo a 80%.

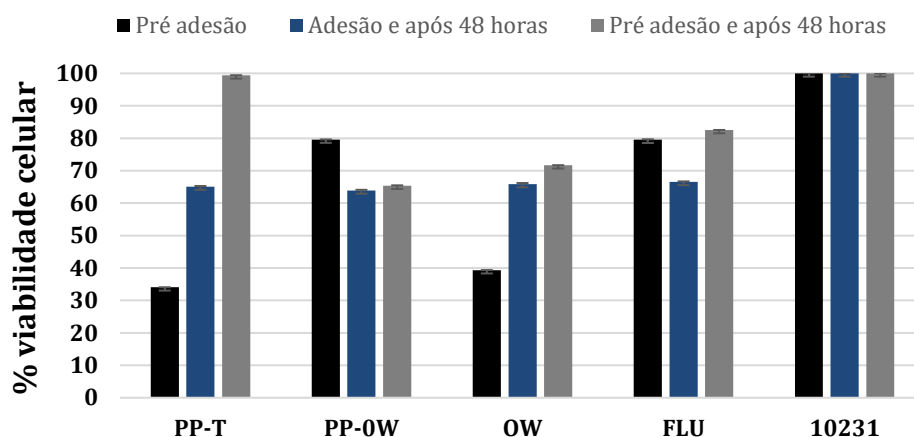


Figura 30: Porcentagem de células viáveis de *Candida albicans* após aplicação dos sistemas lipossomais, peptídeo livre e fluconazol em diferentes tempos de maturação do biofilme.
Fonte: Própria autora, 2021.

4.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A formação de biofilme de *C. albicans* submetida aos agentes PP vazio, PP-OWhst-5 e OWhst-5 livre, foi monitorada por microscopia eletrônica de varredura. As imagens observadas no MEV forneceram informações sobre as diferenças morfológicas celulares após adsorção aos sistemas, comparadas ao controle contendo apenas o meio de cultura RPMI-1640 tamponado com Hepes, pH 7,4, o qual formou um biofilme maduro constituído por uma densa rede de células sem a presença de hifas (Figura 30). Por outro lado, o crescimento de *C. albicans* em contato com PP-OWhst-5 apresentou alteração morfológica com presença de hifas e aglomerados celulares menores do que o observado no controle. A mesma alteração também foi obtida para PP, mas não foi possível notar a formação de hifas, já que todas as células permaneceram na forma de levedura e os aglomerados de células ocorreram de forma espaçada. Para o peptídeo livre houve aglomerações de células com a formação de pseudo-hifas. Apesar dos tratamentos de desidratação gerados pela técnica, não houve desintegração celular significativa.

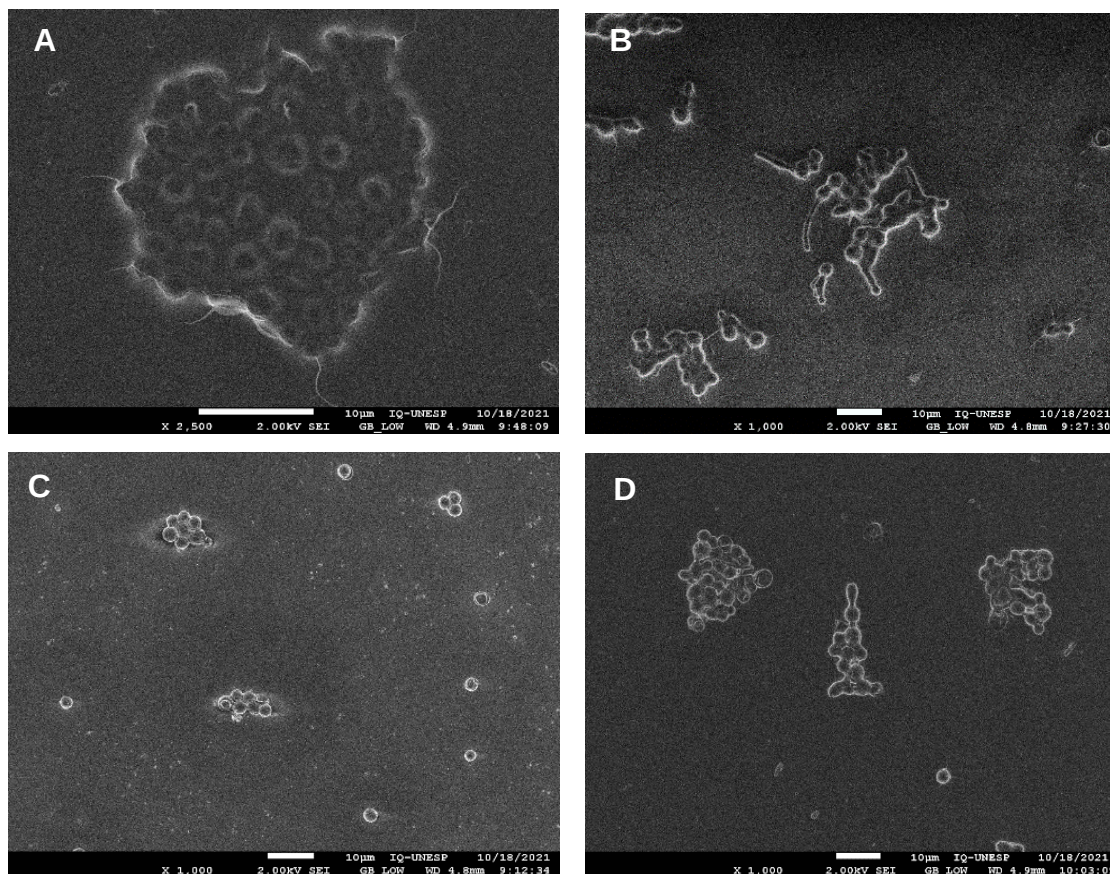


Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura de ATCC 10231 para aproximação de 10 µm após 48 horas de crescimento. (A) Cepa cultivada em meio de cultura RPMI-1640; (B) Crescimento do fungo na adsorção de PP-0whst-5; (C) Adsorção ao lipossoma PP vazio e (D) Adsorção ao peptídeo livre 0whst-5.

Fonte: Própria autora, 2021.

As análises por MEV demonstraram que os agentes PP-0Whst-5 e 0Whst-5 livre comparados ao controle de crescimento em meio de cultura, foram capazes de induzir a formação de clamidósporos e pseudohifas no microrganismo. A transição morfológica de levedura para pseudo-hifas e clamidósporos pode ocorrer em condições de baixa concentração de oxigênio, ausência de nutrientes, baixo pH e baixas temperaturas (CALDERONE; FONZI, 2001), que no caso dos agentes testados, representa que os mesmos provocaram um *stress* significativo em *C. albicans*.

4.6.7 Microscopia confocal e FITC

A técnica não invasiva de microscopia confocal permitiu a obtenção de imagens de biofilmes intactos, permitindo avaliar a morfologia das células dentro do biofilme. Em crescimento em RPMI-1640 tamponado com Hepes, pH 7,0, foi possível observar uma arquitetura típica de microcolônias com grande heterogeneidade espacial (Figura 31). A presença de isocianato de fluoresceína foi inerente à formação de biofilme. Em relação à ação do fluconazol na concentração de 256 µg/mL, foi possível observar que houve inibição parcial do biofilme com espaçamento entre as microcolônias geradas através de aglomerados celulares. Para o lipossoma PP e PP-0Whst-5, o microrganismo foi capaz de gerar uma alta liberação de polissacarídeos. No entanto, ao comparar o crescimento de *C. albicans* na presença de fluconazol, foi obtido uma transição morfológica com formação de hifas para PP-0Whst-5, outro fator observado nas análises de microscopia confocal envolvendo esses dois agentes. No entanto, nas imagens aqui apresentadas, é possível notar menor quantidade de células, quando há ação do peptídeo associada ao lipossoma (PP-0Whst-5).

As emissões de fluorescência emitidas por isocianato de fluoresceína e concavalina A conjugada a tetrametilrodamina relevaram a capacidade de associação dos sistemas lipossomais. Pois, o método aplicado gerou diluição de FITC para o controle em meio de cultivo e fluconazol, assim a imagem de Merged geradas pela associação dos dois fluoróforos apresentaram baixa intensidade para cor ver presente em isocianato de fluoresceína. No entanto, as emissões de isocianato de fluoresceína intensificaram quando foi realizada a formação dos lipossomas em tampão contendo o fluorófo, também sendo possível observar na Figura 31.

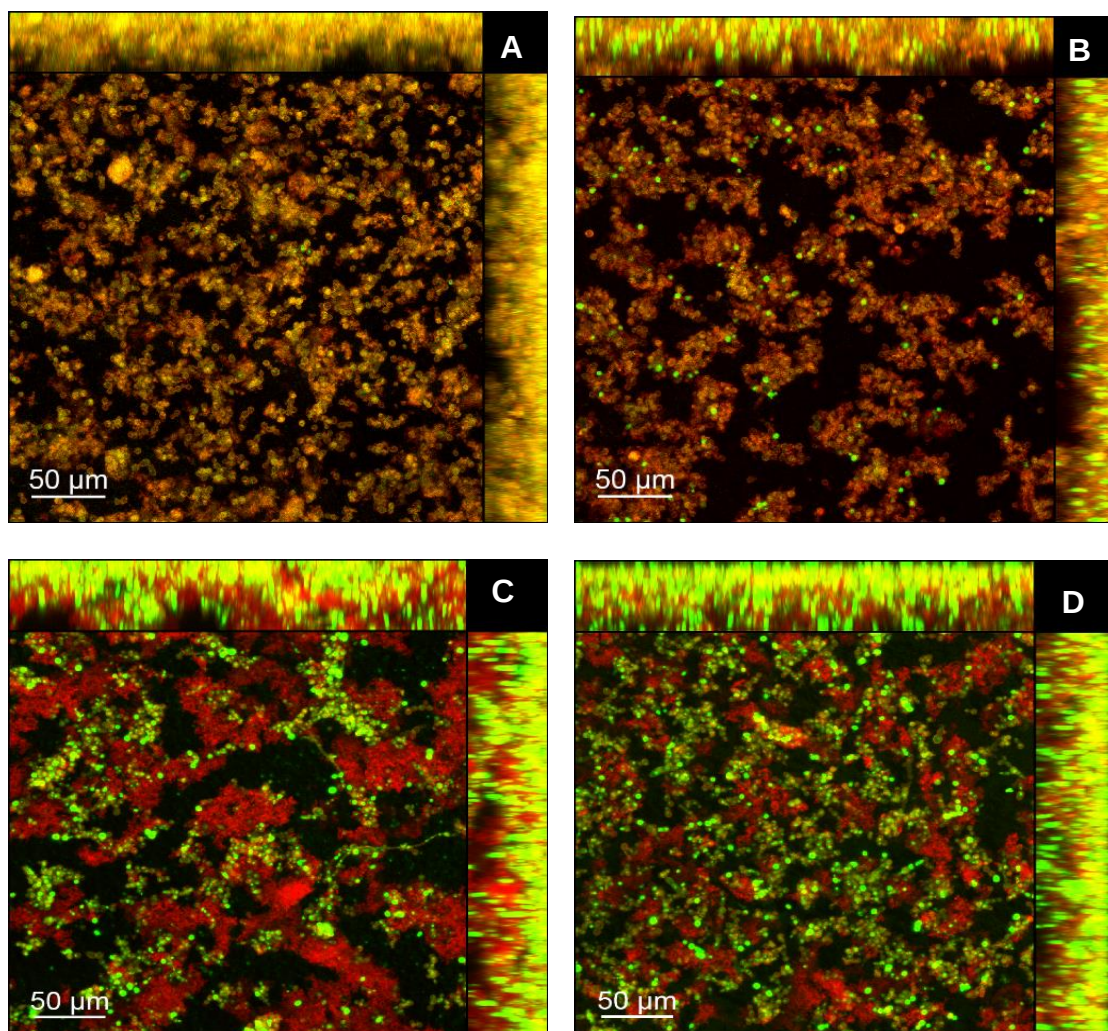


Figura 32. Formação de biofilme em adsorção ao lipossoma PEGuilado. (A) Crescimento em meio RPMI-1640 tamponado Hepes; (B) Atividade fluconazol 256 µg/mL; (C) PP-0whst-5 em adsorção a cepa ATCC 10231; (D) Lipossoma vazio em adsorção a cepa ATCC 10231, todas as análises realizadas após 48 horas.
Fonte: Própria autora, 2021.

Embora o mecanismo 0Whst-5 associado ao lipossoma ainda não tenha sido elucidado na literatura, o aumento de contato nas membranas células, liberação do peptídeo nos biofilmes, a desregulação da cadeia respiratória, a microaerofilia podem ser fatores que contribuem para a morte parcial das células virulentas de *C. albicans*.

Os resultados apresentados até aqui, evidenciam que o peptídeo 0Whst-5 associado ao lipossoma de formulação PP, representa um agente antifúngico promissor para o combate a *C. albicans*. Também foi possível relacionar tal efeito desse sistema com a forma que o peptídeo está associado ao lipossoma. Inicialmente, acreditava-se que o peptídeo pudesse estar

internalizado na estrutura do lipossoma. Porém, com os resultados obtidos neste estudo, foi possível propor a hipótese de o mesmo estar associado entre as lamelas lipossomais, mantendo sua estrutura relativamente preservada para exercer sua função. Nesse sentido, foi proposto um estudo por meio de fluorescência para tentar elucidar tal hipótese.

De forma geral, o atual estudo permitiu identificar ação antimicrobiano do derivado e hst-5 associado a lipossomas de segunda geração, os quais, apresentam PEG na constituição. A utilização deste polímero pode realizar melhorias como aumento da circulação dos compostos associados e para inibição da formação do biofilme de *Candida albicans* pode tornar uma estratégia aplicável devido ao tempo de maturação do biofilme. Assim como os mecanismos necessários para ação do derivado de hst-5, o qual, age de forma tempo-dependente e concentração-dependente, conforme salientado por Vylkova e colaradores 2007, Puri e Edgerton, 2014.

Portanto, para melhor compreensão da associação entre lipossomas e peptídeos antimicrobianos foram feitas as análises de calorimetria diferencial de varredura, dicroísmo circular e fluorescência, as quais, contribuíram para a hipótese da interação lamelar do peptídeo aos lipossomas. A aplicação de colesterol nas estruturas lipossomais foram capazes de gerar rigidez o suficiente para alterar a composição físico-químicas dos lipossomas e gerar melhor estabilidade. Para a formulação PP, ausente de colesterol, as análises físico-química apresentaram resultados inferiores ao PPC, porém apresentam estabilidade próxima a 40 dias.

As atividades antimicrobianas de curva de crescimento e curva de morte (*time kill*) mostraram que o lipossoma vazio PPC apresentou atividade superior aos demais sistemas. Na literatura os lipossomas PEGuilados não apresentam atividades antimicrobianas, porém nos ensaios de Klepser e colaboradores (1998) foi relatado que para as análises de *time kill* de *Candida albicans*, os inóculos iniciais devem ser superiores a 10000 células por mililitro. Isto porque, inóculos iniciais de 100 a 1000 células por mililitro podem apresentar morte celulares que não estão presentes nas infecções em humanos. Tais estudos corroboram para inibição de PPC observada para cepa ATCC 10231.

No entanto, a existência de inóculos iniciais acima a 1000 células por mililitro induziria a agregação celular e consequentemente a formação do biofilme, o que geraria dados distintos ao encontrados na concentração inibitória mínima (CIM). Devido à associação do peptídeo aos lipossomas PEGuilados, as concentrações de 0whst-5 não podem ser alteradas. Assim, para análise inicial da ação dos lipossomas associados ao peptídeo 0whst-5 foram aplicados os parâmetros estabelecidos em CIM90 com a utilização do padrão *CLSI* (2008) com baixa concentração inicial de *Candida albicans*.

Com dados observados na curva de crescimento foi possível obter que PP e PP-0Whst-5 apresentaram atividade semelhantes a exercida pelo peptídeo livre, dessa forma foi prosseguido para os ensaios com alta concentração de unidade formadora de colônia por *Candida albicans*, mimetizando a quantidade de unidades formadora de colônia em infecções de mucosa. Através das análises da curva de morte foi possível observar que os lipossomas contribuem para atividade antifúngica e devido a presença de constituintes lipídicos nos lipossomas levantou-se a hipótese de que, em sistemas fechados os lipossomas possam induzir a microaerofilia.

As baixas concentrações de oxigênio resultam em estresse celular e consequente morte das células e mudanças morfológicas. O que foi confirmado com as imagens microscopia confocal com FITC e concavalina A conjugada a tetrametilrodaminae e microscopia eletrônica por varredura. No qual, foi observado a formação de clamidósporos e formação de hifas.

Viabilidade celular e análise confocal com calcofluor-white confirmam o potencial das estruturas após 48 horas de exposição, ainda, que a diferença entre o peptídeo e PP-0whst-5 na viabilidade celular tenham diferenças menores do que o observado nas unidades formadoras no ensaio de morte. A análise do metabolismo celular demonstrada pela resazurina juntamente com as inibições parciais observadas pela confocal também indicaram que os sistemas propostos neste trabalho podem alterar as células presentes no biofilme (UPPULURI *et al.*, 2018).

Embora os principais mecanismos descritos para a histatina-5 e seu derivado 0whst-5 sejam a desregulação da cadeia respiratória e a formação de espécies reativas de oxigênio, uma pequena porção (10%) do peptídeo pode

interagir com a membrana de *Candida albicans* e causar lise, assim o aumento de contato a membrana do fungo pode aumentar a capacidade de lise por hst-5 (MOCHON; LIU, 2008; JANG *et al.*, 2010). Portanto, associação do peptídeo 0Whst-5 aos lipossomas PEGuilados, pode melhorar a capacidade antimicrobiano do peptídeo, por diferentes mecanismos como microarofilia, lise celular e toxicidade gerado por espécies reativas de oxigênio, sendo capaz de inviabilizar parcialmente a dispersão de células com capacidade de virulência.

5 Conclusões

Neste estudo foi possível concluir que a associação de peptídeos catiônicos, especificamente, o derivado 0Whst-5 em lipossomas PEGuilados pode exercer melhor atividade inibitória em *Candida albicans*, do que o peptídeo livre. Ainda, foi possível analisar que o sistema PP gerou na cepa ATCC 10231 de *C. albicans*, a qual é resistente ao fluconazol, modificações estruturais que indicaram estresse ao fungo, sendo possível observar nas análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal as alterações estruturais e morte parcial do fungo, que pode estar relacionada com atividades regulatórias da respiração celular. Também foi observado que os sistemas lipossomais sem associação ao peptídeo, são capazes de interferir no crescimento do microrganismo em concentrações de unidade formadora de colônia inferiores a 10000 células da levedura. Devido à complexidade do biofilme de *Candida albicans* em cavidade bucal a existência de sistemas antifúngicos, como o encontrado em PP-0Whst-5, pode implicar no futuro, o desenvolvimento de novos meios terapêuticos para tratamento de candidíase, gerados por cepas sensíveis ou que apresentem mecanismos de resistência como a formação de biofilme.

6 Referências

ADLER-MOORE, J., PROFFITT, R.T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, issue 1, pages 21-30, 2002.

AHMED, K, S., HUSSEIN, S, A., LIPENG, Q., JINGHUA, C. Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recente innovation in clinical applications. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, Issue 7, 2019.

ALLEN, T.P., CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**, 65, 36-4, 2013.
HARRIS, J. M. CHESS, R, B. Effect os pegylation on pharmaceutical. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 2, 2003.

ALONSO-MONGE, R; NAVARRO-GARCÍA, F; ROMÁN, E. et al. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 351-361, 2003.

ALSTON, Roy W. et al. Peptide sequence and conformation strongly influence tryptophan fluorescence. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2280-2287, 2008.

AMANN, V; KISSMANN, A.K; KRAMER, M. et al. ncreased Activities against Biofilms of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* of Optimized Pom-1 Derivatives. **Pharmaceutics**, 14, 318, 2022.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial ntimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v.399, p.629–55, 2022.

ARWEILER, N.B; NETUSCHIL, L. The Oral Microbiota. Microbiota of the Human Body, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 902, 2016.

ARYA, N.R; RAFIQ, N.B. Candidiasis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls**, janeiro, 2022.

BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.

BAKER, J.L; BOR, B; AGNELLO, M; SHI, W; HE, X. Ecology of the oral microbiome: beyond bactéria. **Trends Microbiol**, v.25, f. 5, p. 362-374, 2017.

BAMFORD, C.V; D´MELLO, A; NOBBS, A.H. et al. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3696-3704, 2009.

BARVEDO, L., SGARBI, D., B.G. Candidíase.DST. **J bras Doenças Sex Transm**, 22(1): 22-38, 2010.

BELSTROM, D. The salivary microbiota in health and disease. **Journal of Oral Microbiology**, v.12, f.1, e.1723975, 2020.

BRANDELLI, Adriano. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 731-741, 2012.

CALDERONE, R.A; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CARITA, A; ELOY, J; CHORILLI, M. et al. Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. **Curr Med Chem**, v.25, f. 5, p.606-635, 2018.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.

CHEVALIER, M; RANQUE, S; PRÊNCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: A review. **Medical Mycology**, v. 56, n. 6, 2018.

CLAYTON, A.H; WILLIAM, H.S. Site-specific tryptophan fluorescence spectroscopy as a probe of membrane peptide structure and dynamics. **Eur Biophys J**, 31, 9-13, 2002.

CIOCIOLA, Tecla et al. Dissecting the structure-function relationship of a fungicidal peptide derived from the constant region of human immunoglobulins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2435-2442, 2016.

DALLE, F; JOUAULT, T; TRINEL, P. et al. β -1, 2-and α -1, 2-Linked Oligomannosides Mediate Adherence of *Candida albicans* Blastospores to Human Enterocytes In Vitro. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 7061-7068, 2003.

DANGI, Y. S; SINO, M.L; NAMDEO, K.P. Oral candidiasis: a review. **Int J Pharm Pharm Sci**, v.2, p.36-41, 2010.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DAWES, C.; WONG, D. T. W. Role of saliva and salivary diagnostics in the advancement of oral health. **Journal of dental research**, v. 98, n. 2, p. 133-141, 2019.

DEN, H, Alice L. et al. Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. **Biochemical Journal**, v. 379, n. 3, p. 665-672, 2004.

D'ENFERT, C; KAUNE, A.K; ALABAN, L.R. et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa060, 2021.

DI VIRGILIO, F; CHIOZZI, P; FERRARI, D. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 200

DOMINGUEZ E.G., ZARNOWSKI R., CHOY H.L., et al. Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in *Candida auris* drug resistance. **MSphere**, v.4, p.00680-18, 2019

EFTINK, Maurice R. Intrinsic fluorescence of proteins. In: **Topics in fluorescence spectroscopy**. Springer, Boston, MA, p. 1-15, 2002.

ELERAKY, N.E; ALLAM, A; HASSAN, S.B; OMAR, M.M. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. **Pharmaceutics**, v. 12, f. 142, 2020.

ENE, L. V; BENNETT, R. J. Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 12, p. 1909-1913, 2009.

EPSTEIN, J.B; GORSKY, M; CALDWELL, J. Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 93, n. 6, p. 671-675, 2002.

FAKHIM, Hamed et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 377-382, 2018.

FARAH, C.S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidosis. **Clinics in dermatology**, v. 18, n. 5, p. 553-562, 2000.

FARAH, C. S; LYNCH, N; MCCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian dental journal**, v. 55, p. 48-54, 2010.

FINKEL, J. S; MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

FRANK, J; DOWD, D.D.S. Saliva and dental caries. **Dental Clinics of North America**, v.43, issue 4, pages 579-597, 1999.

GARCIA-CUESTA, C; SARRION-PÉREZ, M; BAGÁN, J.V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J clin exp dent**, v.6(5), e576–e582, 2014.

GARCIA-RUBIO, R; OLIVEIRA, H.C; RIVEIRA, J. et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020.

GAUR, N.K.; KLOTZ, S.A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infection and immunity**, v. 65, n. 12, p. 5289-5294, 1997.

GENDREAU, L; LOEWY, Z. G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. **Journal of Prosthodontics: Implant, Esthetic and Reconstructive Dentistry**, v. 20, n. 4, p. 251-260, 2011.

GHAZALI, S; SHAIKH, R; AHAMMAD, Z. COVID-19 and antimicrobial resistance. A cross-study. **Science of the total environment**, v. 807, 2, 2022.

GIL-BONA, A; AMADOR-GARCÍA, A; GIL, C. et al. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. **Journal of proteomics**, v. 180, p. 70-79, 2018.

GÓMEZ-HENS, Agustina; FERNÁNDEZ-ROMERO, Juan Manuel. The role of liposomes in analytical processes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 9-19, 2005.

GONSALVES, W.C; CHI, A.C; NEVILLE, B.W. Common oral lesions: Part I. **Superficial mucosal lesions Am Fam Physician**, v.75, p. 501-507, 2007.

GOW, N. A. R; BROWN, A. J. P; ODDS. et al. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 4, p. 366-371, 2002.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology Infections**, v.20, f. 6, 2014.

GUPTA, S; DE MEL, J.U; SCHNEIDER, G.J. Dynamics of liposomes in the fluid phase. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.42, p.121-136,2019.

HAFEZ, Ismail M.; ANSELL, Steven; CULLIS, Pieter R. Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. **Biophysical journal**, v. 79, n. 3, p. 1438-1446, 2000.

HAJISHENGALLIS, E; PARSAEI, Y; KLEIN, M.I. et al. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. **Molecular oral microbiology**, v. 32, n. 1, p. 24-34, 2017.

HELLSTEIN, J.W; MAREK, C. L. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. **Head and neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2019.

HELMERHORST, E.J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14637-14642, 2001.

HELMERHORST, E. J., ALAGL, A. S., SIQUEIRA, W. L. et al. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Arch. Oral Biol**, v. 51, p. 1061-1070, 2006.

HERBRECHT R., LETSCHER-BRU V, BOWDEN R.A, et al. Treatment of 21 cases of invasive mucormycosis with amphotericin B colloidal dispersion. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**,v. 20(7), p. 460–466, 2020.

HENRIKSEN, Ingrid; SMISTAD, Gro; KARLSEN, Jan. Interactions between liposomes and chitosan. **International journal of pharmaceutics**, v. 101, n. 3, p. 227-236, 1994.

HENRINQUES, M., WILLIAMS, D. Pathogenesis and Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*.**MDPI Pathogens**, 9, 752, 2020.

HUMPHREY, SP.; WILLIAMSON, RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry** , v.85, p.162-9, 2001.

IBARAKI, Hisako et al. The effects of surface properties of liposomes on their activity against *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 biofilm. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101754, 2020.

ISLER, Elias et al. Trapeamento de LNAPL observado por meio da técnica de fluorescência induzida por laser (LIF). **Águas Subterrâneas**, v. 32, n. 3, p. 315-324, 2018.

JACOBSON, Myra K. et al. Cholesterol limits estrogen uptake by liposomes and erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1195, n. 1, p. 131-140, 1994.

JALAL, Mohammad et al. Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 4667, 2019.

JANG, Woong Sik et al. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 2, p. 354-370, 2010.

JENKINSON, Howard F.; LAMONT, Richard J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 12, p. 589-595, 2005.

KADOSH, D; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans*: adapting to succeed. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 483-485, 2013.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Bioch**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KAPTEYN, J. C. et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 3, p. 601-611, 2000.

KAVANAGH, K; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 285-289, 2004.

KHURSHID, Z; NASEE, Z; SHEIJH, S. et al. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 515-524, 2016.

KHURSHID, Z; NAJEEB, S; SYED, M.M. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2017.

KIKUCHI, Hiroshi; YAMAUCHI, Hitoshi; HIROTA, Sadao. A polyol dilution method for mass production of liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 4, n. 1, p. 71-91, 1994.

KOO, H; ANDES, D. R.; KRYSAN, D. J. *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 12, p. e1007342, 2018.

KONAREV, Petr V. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal of applied crystallography**, v. 36, n. 5, p. 1277-1282, 2003.

KOSHLUKOVA, S.E; ARAUJO, M.W.B; BAEV, D. et al. Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6848-6856, 2000.

LAI, Y; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009.

LAMKIN, Mark S.; OPPENHEIM, Frank G. Structural features of salivary function. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 3, p. 251-259, 1993.

LAMONT, R, J; KOO, H; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 16, f.12, p. 745-759, 2018.

LEI, Jun et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 3919, 2019.

LOMBARDI, A; OUANOUNOU, A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 5, p. 533-546, 2020.

LIU, Y; FILLER, S. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesion and invasin. **Eukaryotic cell**, v.10, 2, 2011.

LU, Y; SU, N.V; SOLIS, S.G. et al. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO₂, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 499-509, 2013.

LU, Y; SU, C; LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014.

LU, M; XUAN, S; WANG, Z. Oral microbiota: A new view of body health. **Food Science and Human Wellness**, v.8, f.1, p. 8-15, março 2019.

MADNI A., SARFRAZ M., REHMAN M., et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. **J Pharm Pharm Sci**;17(3):401–426, 2014.

MAH, T.F.C; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v.4, n.2, p.119–128, 2013.

METWALLI, K. H, KHAN, S.A; KRO, B.P. et al. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003616, 2013.

MERTINS, O. Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana. [s.l.] **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**, 2004.

MILLSOP, J.W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487-494, 2016.

MOCHON, A. Brian; LIU, Haoping. The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000190, 2008.

MOFFA, E.D; MUSSI, M.C; XIAO, Y. et al. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 885, 2015.

MONGE, R. Alonso et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 905-912, 2006.

MORALES, D.K.; HOGAN, D.A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000886, 2010.

MUKHERJEE, P.K; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist Updates**, v. 7, 4–5, p. 301-309, 2004.

NAKHAEI, Pooria et al. Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

NETEA, M.G; BROWN, G; KULLBERG, J. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67-78, 2008.

NETT, J; LINCOLN, L; MARCHILLO, K; MASSEY, R. et al. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 2, 2007.

NOBILE, C.J; NETT, J.E; ANDES, D.R et al. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 10, p. 1604-1610, 2006.

NOBILE, C.J; Johnson, A.D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annu. Rev. Microbiol** , v. 69, p. 71-92, 2015.

NORRIS, H.L.; KUMAR, R; EDGERTON, M. A novel role for histatin 5 in combination with zinc to promote commensalism in *C. albicans* Survivor Cells. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1609, 2021.

O'DONNELL, L.E; MILLHOUSE, E; SHERRY, L. et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 7, 2015.

O'HARA, A. M; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO Rep**, v.7, f. 7, p. 688-693, 2006.

O'NEIL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**, 2016.

ORSI, C.F. et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 69, p. 20-27, 2014.

O'TOOLE, G.A ; KAPLAN, H.B; KOLTER, R. Biofilm formation as microbials development. **Annu Rev Microbiol** , 54, 49–79, 2000.

PALIWAL, Shivani Rai; PALIWAL, Rishi; VYAS, Suresh P. A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery. **Drug delivery**, v. 22, n. 3, p. 231-242, 2015.

PIROFSKI, L.A; CASADEVALL, A. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. **BMC Biology**, v.10.f.6, 2012.

POLKE, M; HUBE, B; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235, 2015.

PURI, S; EDGERTON, M. How Does It Kill? : Understanding the Candidacidal Mechanism of Salivary histatin 5. **Eukaryotic Cell**, v., 13, n 8, p. 958 –964, 2014.

PUY, C.L. The rôle of saliva in maintaining bucal health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral*, **Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.11, n.5, p. 449-55, 2006.

RAJ, P.A.; EDGERTON, M; LEVINE, M. J. Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 7, p. 3898-3905, 1990.

RAJILIC-STOJANOVIC, M; FIGUEIREDO, C; SMET, A; HANSEN, R. et al. Systematic review: gastric microbiota in health and disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v.00, p. 1-21, 2020.

RAMAGE, G; VANDEWALLE, K; WICKES, B.L. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 18, n. 4, p. 163-170, 2001.

RAMAGE, Gordon et al. Candida biofilms: an update. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

ROBSON, S.C; SÉVIGNY, J; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

RODRIGUEZ, O. Produção de Lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo. [s.l.] **Universidade Estadual de Campinas**, 2003.

SCULLY, C.B.E. Drug effects on salivary glands: dry mouth. **Oral diseases**, v. 9, n. 4, p. 165-176, 2003.

SHARMA, P; CHAUDHARY, M; KHANNA, G. et al. Envisaging Antifungal Potential of Histatin 5: A Physiological Salivary Peptide. **J Fungi (Basel)**, v. 7(12), f. 1070, dezembro, 2021.

SHIRTLIFF, M.E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

SITU, H; BALASUBRAMANIAN, S.V; BOBEK, L. A. Role of α -helical conformation of histatin-5 in candidacidal activity examined by proline variants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1475, n. 3, p. 377-382, 2000.

SMISTAD, Gro; JACOBSEN, Jette; SANDE, Sverre A. Multivariate toxicity screening of liposomal formulations on a human buccal cell line. **International journal of pharmaceuticals**, v. 330, n. 1-2, p. 14-22, 2007.

STAIB, P; MORSCHHÄUSER, J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 1-12, 2007.

SOPYAN, L., SUNAN, I., GOZALIL, D. A Review: A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach. **Sys Rev Pharm**; v. 11(6), p. 555-562, 2020.

SOUZA, J. G. Silva; BERTOLINI, M; THOMPSON, A. et al. Role of glucosyltransferase R in biofilm interactions between *Streptococcus oralis* and *Candida albicans*. **The ISME journal**, v. 14, n. 5, p. 1207-1222, 2020.

SUDBERY, P; GOW, N; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.

SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.

TALAPKO, J; JUZBASI, M; MATIJEVI, T, PUSTIJANAC, E. et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **J. Fungi**, v.7, 79, 2021.

TORRES, P. et al. Histatins, wound healing, and cell migration. **Oral diseases**, v. 24, n. 7, p. 1150-1160, 2018.

TURNBAUGH, P.J; LEY, R.E; HAMADY, M. et al. The human microbiome, Project, **Nature**, v. 449, p. 804–810.

UPPULURI, Priya et al. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells. **MBio**, v. 9, n. 4, p. e01338-18, 2018.

VICENTE, Eduardo Festozo et al. Biophysical Studies of TOAC Analogs of the Ctx (Ile21)-Ha Antimicrobial Peptide Using Liposomes. **Brazilian Journal of Physics**, v. 52, n. 3, p. 1-11, 2022.

VILA, T; SULTAN, A.S; MONTELONGO-JAUREGUI. et al. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. **Biomolecules**, v. 8, 18, 2018.

VYLKOVA, Slavena et al. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1876-1888, 2007

WANG, Guangshun. Human antimicrobial peptides and proteins. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 5, p. 545-594, 2014.

WANG, B; YAO, M; LV, L; XING, Z. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v.3, f.1, p. 71-82, 2017.

WANG, Y. Liposome as a delivery system for the treatment of biofilm-mediated infections. **Journal of applied microbiology**, v. 131, f. 6, p. 2626-2639, 2021.

WALLACE, Bonnie Ann; JANES, Robert William (Ed.). **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. IOS press, 2009.

WILLIAMS, D.W; LEWIS, M. A. O. Oral Microbiology: Isolation and identification of candida from the oral cavity. **Oral diseases**, v. 6, n. 1, p. 3-11, 2000.

WILLEMS, H. M; KOS, K; JABRA-RIZK, M.A. et al. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. **Pathogens and Disease**, v.74, n.5, 2016.

WILLIAMS, D.W; JORDAN, R.P.C; WEI, X.Q. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, 22434, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. **WHO, Geneva, Switzerland**, 2021.

YADAV, S.C; KUMARI, A; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 173-187, 2011.

YAMMINE, Anthony; GAO, Jinlong; KWAN, Ann H. Tryptophan fluorescence quenching assays for measuring protein-ligand binding affinities: principles and a practical guide. **Bio-protocol**, v. 9, n. 11, p. e3253-e3253, 2019.

XU T, LEVITZ, S.M, DIAMOND, R.D, OPPENHEIM, F.G. Anticandidal activity of major human salivary histatins. **Infect. Immun.**v.59, p. 2549–2554, 1991.

ZAMBOM, C.R; FONSECA, F.H.; GARRIDO, S.S. Bio- and Nanotechnology as the Key for Clinical Application of Salivary Peptide Histatin: A Necessary Advance. **Microorganisms**, v.8, f.1024, 2020.

ZARNOWSKI, R; WESTLER, W.M; LACMBOUH, G.A. et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, 2014.

ZOLIN, G.V.S et al. Histatin 5 metallopeptides and their potential against *Candida albicans* pathogenicity and drug resistance. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1209, 2021.

.