

CAROLINA REIS ZAMBOM

Desenvolvimento e caracterização de lipossomas com diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico OWHistatina-5.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Co-orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Z24d	<p>Zambom, Carolina Reis</p> <p>Desenvolvimento e caracterização de lipossomas com diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico 0WHistatina-5 / Carolina Reis Zambom. – Araraquara : [s.n.], 2018 92 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Saulo Santesso Garrido Coorientador: Marlus Chorilli</p> <p>1. <i>Candida albicans</i>. 2. Candidíase bucal. 3. Saliva. 4. Lipossomas. 5. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. I. Título.</p>
------	---

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

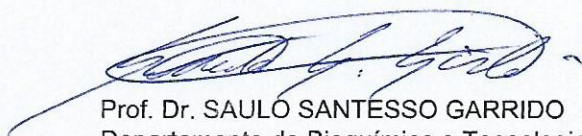
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento e caracterização de lipossomas com diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico OWHistatina-5"

AUTORA: CAROLINA REIS ZAMBOM

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

COORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

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



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE
Departamento Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã

Araraquara, 02 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Carolina Reis Zambom

Nome em citações bibliográficas: ZAMBOM, C.R.; Carolina Reis Zambom.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

UNESP-Instituto de Química (IQ - UNESP)

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara -SP- Brasil - CEP:14800060

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2016

Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Co-orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização de lipossomas com diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico 0WHistatina-5

2010-2015

Graduação em Farmácia Bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

2013-2014

Bolsista de Iniciação Científica

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Projeto de Pesquisa: Estudos de permeação e liberação de peptídeos antimicrobianos estruturalmente derivados da toxina CcdB

2011-2012

Bolsista de Iniciação Científica

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Bolsista do: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)

Projeto de Pesquisa: Estudos de drug delivery systems aplicado a novos inibidores peptídicos estruturalmente derivados de proteínas bacterianas

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016 – 2016

Mesa Redonda - Zika Vírus.

Carga horária: 3h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

2016 – 2016

Palestra: Nanopartículas lipídicas e poliméricas como Sistemas Carreadores.

Carga horária: 2h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

2016 – 2016

Palestra: Técnicas de Oratória.

Carga horária: 3h.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2013 – 2013

Palestra: Nanotecnologia Farmacêutica.

Carga horária: 4h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2013 – 2013

Palestra: Enzimas Farmacêuticas e Sua Estabilização para Usos Biotecnológicos.

Carga horária: 3h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2013 – 2013

Palestra: Síntese de Peptídeos em Fase Sólida e Obtenção de Novos Fármacos.

Carga horária: 2h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2012 – 2012

Palestra: Medicina Ortomolecular - Quebrando Paradigmas.

Carga horária: 4h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2010 – 2010

Conscientização sobre a profissão Farmacêutica.

Carga horária: 30h.

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

2010 – 2010

Palestra: Nutrição Parenteral.

Carga horária: 6h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2010 - 2010

Palestra: O Farmacêutico nas Ciências Forenses.

Carga horária: 8h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2010 - 2010

Palestra: Psicofarmacologia e Doenças Neurodegenerativas.

Carga horária: 4h.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, FCFAR, Brasil.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2015-2015

Farmacêutica

Drogaria Pronto Farma – Marília/SP.

Carga Horária: 44h semanais.

2014-2015

Estagiária

Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico.

Indústria Medley Farmacêutica.

Carga Horária: 40h semanais.

2010-2014

Professora de Biologia

Curso Unificado do Campus Araraquara (CUCA)

Carga Horária: 10h semanais.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFIA

Artigos completos publicados em periódicos

GARRIDO, S. S. ; OLIVEIRA, I. C. ; **ZAMBOM, C. R.** ; VAZ, A.B.S ; MARCHETTO, R.; BARBOSA, L. C. B. . Avaliação quantitativa da susceptibilidade do crescimento de *Staphylococcus aureus* na presença de sistemas antimicrobianos de alta complexidade. Eclética Química, v. 40, p. 95-105, 2015.

Resumos publicados em anais de congressos

ZAMBOM, C. R.; SILVA, J.C.M.; VAZ, A.B.S.; SILVA, P. B; CHORILLI, M.; GARRIDO, S. S. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico Histatina-5. In: VI Congresso Farmacêutico da UNESP, 2016, Araraquara/SP. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v. 37.

SILVA, J.C.M.; VAZ, A.B.S.; **ZAMBOM, C. R.**; CRUZ, C.Z.P.; MONTI, R.; GARRIDO, S. S. Atividade antimicrobiana e antioxidante do peptídeo LeuB contra *Salmonella sorovar Typhimurium* e *Escherichia coli*. In: VI Congresso Farmacêutico da UNESP, 2016, Araraquara/SP. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v. 37.

VAZ, A.B.S.; SILVA, J.C.M.; **ZAMBOM, C. R.**; GARRIDO, S. S. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Peptídeo LeuAB-2: Um Promissor Conservante de Alimentos. In: VI Congresso Farmacêutica da UNESP, 2016, Araraquara/SP. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v. 37.

GARRIDO, S. S.; OLIVEIRA, I. C.; **ZAMBOM, C. R.** IN VITRO EFFICACY OF CCDB TOXIN PEPTIDE ANALOGUES MEDIATED BY DRUG DELIVERY SYSTEMS FORMULATION. In: Chemistry for Life Science-5th European Conference, 2013, Barcelona. Chemistry for Life Science, 2013.

OLIVEIRA, I. C.; **ZAMBOM, C. R.**; PORTO, P. M.; OLIVEIRA, A. G. F.; GARRIDO, S. S. New peptides structurally based on CcdB toxin with inhibition potential of bacterial topoisomerases. In: 5th Symposium on biological chemistry: Frontiers and new perspectives, 2013, Ilha Bela. Proceedings of 5th Symposium on biological chemistry: Frontiers and new perspectives, 2013. v. 1. p. 62-62.

Apresentações de Trabalhos

ZAMBOM, C. R.; SILVA, P. B.; CRUSCA, E.; MARCHETTO, R.; CHORILLI, M.; GARRIDO, S. S. Development of antifungal peptide histatin-5-loaded pegylated liposomes for treatment of oral candidiasis. 2017. (Apresentação de Trabalho).

ZAMBOM, C. R.; SILVA, J.C.M.; VAZ, A.B.S.; SILVA, P. B; CHORILLI, M.; GARRIDO, S. S. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico Histatina-5. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S.; SILVA, J.C.M.; VAZ, A.B.S. Studies of encapsulation and releasing for an antimicrobial peptide structurally derivatives toxin CcdB. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

OLIVEIRA, I.C.; **ZAMBOM, C. R.**; GARRIDO, S. S. Synthesis and studies of bioencapsulation systems associated with antimicrobial peptides based on natural toxin CcdB. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

GARRIDO, S.S.; **ZAMBOM, C. R.** Estudo de drug delivery systems aplicado a novos inibidores peptídicos estruturalmente derivados de toxinas bacterianas. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

46th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Águas de Lindóia – São Paulo – Brazil.

7th International Symposium of Graduate and Research. Studies of encapsulation and releasing for an antimicrobial peptide structurally derivatives toxin CcdB. 2016. (Simpósio).

1° Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química - UNESP. 2016.

VI Congresso Farmacêutico da UNESP. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico Histatina-5. 2016. (Congresso).

I International Symposium of Medical Chemistry and Regenerative Medicine. 2014. (Simpósio).

I Curso de Verão - Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia. 2013.

III Congresso Farmacêutico da UNESP - 60° Jornada Farmacêutica da UNESP. 2013. (Congresso).

III Symposium on Drug Discovery. Synthesis and studies of bioencapsulation systems associated with antimicrobial peptides based on natural toxin CcdB. 2013. (Simpósio).

XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Estudos de Drug Delivery Systems aplicados a novos inibidores peptídicos estruturalmente derivados de toxinas bacterianas. 2012. (Congresso).

II Congresso Farmacêutico da UNESP. Estudos de Drug delivery systems aplicado a novos inibidores peptídicos estruturalmente derivados de proteínas bacterianas. 2012. (Congresso).

*Ao amor incondicional,
que é a base de tudo,
sempre.*

Aos meus pais, Eliane e José Roberto.

Agradecimentos

A Deus. Responsável por guiar meus caminhos e vida. Responsável pela minha fé e perseverança. Por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Eliane e José Roberto. E meu irmão, *Betinho.* Pela força. Carinho. Apoio. Amor. Por acreditar em mim sempre. E por estar sempre comigo, presentes em todos os momentos.

Ao Bruno. Por ser a melhor companhia sempre. Por apoiar e incentivar todas as minhas decisões e escolhas. Pelos conselhos, sugestões e conversas em todas as horas. Pelo amor e dedicação em todos os momentos. E por fazer meus dias mais felizes.

Ao meu orientador, Prof. Saulo. Pelos já 5 anos de orientação e companhia. Por aconselhar, orientar e apontar sempre o caminho a se seguir e me incentivar a ir sempre em frente. Por participar de minha formação acadêmica e científica, mas principalmente, de minha formação pessoal.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marlus Chorilli, por conceder o uso de seu laboratório e estar sempre disposto a auxiliar no que foi preciso. Pelas conversas, conselhos e orientações e por toda a atenção dedicada.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, por sempre estar presente e disposto para responder a qualquer dúvida ou questionamento. Por permitir que muitos experimentos fossem realizados e por aconselhar quando preciso.

À Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka, pela participação no exame de qualificação. Por discutir os resultados de forma bastante construtiva, pelas observações e apontamentos que somente acrescentou muito a esse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Thaís Bauab, e a seus alunos, Bruna, Luciani e Anderson. Pela disponibilização do laboratório de pesquisa e pelo auxílio com os testes realizados.

Ao *Prof. Dr. Fernando Pavan* e ao *Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente* por aceitarem o convite e participarem da banca de defesa desta dissertação. Contribuindo para a continuidade desta pesquisa e para o desenvolvimento de novos testes, incentivando-me a seguir e continuar os estudos no doutorado.

À *Patrícia*, presente desde do início deste projeto. Que me mostrou os primeiros passos a serem seguidos e esteve sempre disposta a auxiliar, conversar e tirar dúvidas, para o que fosse preciso. Se tornando assim, uma grande amiga.

Ao *Crusca*, pela grande ajuda com todos os experimentos. Pelas discussões de resultados e dados, que contribuíram para que pudesse finalizar este trabalho.

Aos *colegas do grupo de pesquisa*, Aline, Jesseleine, Caio e Leonardo. Pelos momentos de descontração, risadas e festinhas. Por também estarem presentes e dispostos a ajudar no que foi preciso.

Às *alunas de iniciação científica*, Sara e Giovana. Pela amizade, parceria e companhia no dia-a-dia do laboratório.

A *todos os amigos da "salinha"*. Rodolfo, Milena, Beatriz, Bianca, Gregório, Camila e Thaís. Pela convivência, conversas e risadas. Por dividir comigo vários momentos, bons e ruins, nesses 2 anos de mestrado.

Aos *funcionários da Biblioteca do Instituto de Química*, pela ajuda com a formatação, padronização e referências desta dissertação.

À *pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara*, e todos os funcionários e funcionárias da sessão de pós-graduação, pelo trabalho constante, visando sempre a melhoria do programa e a todo o auxílio disponibilizado para que este trabalho fosse concluído.

À *CNPq*, pela bolsa concedida, por financiar este projeto.

*“Se ganhou, suspire.
Se perdeu, aprenda,
porque é hora de ser.
Não demore ou...
Vai perder sua aposta.
Agora é a hora.
Escolha bem suas cartas.
O seu jogo já vai começar.*

*O lance está no ar,
é só você gritar bem alto, alto.
Mas se prepare, prepare,
porque nada no mundo é de graça.
Você pode até ter medo, mas ande, caminhe,
só não pare, não pare.”*

(Cassino Boulevard/Rosa de Saron)

“[...] que é preciso encarar o que a vida traz com serenidade. Que é preciso olhar e ver. Que é preciso fechar os olhos e ir. Ir com o vento. Ir com fé. E eu tenho ido.

Tenho ido durante esses 5 anos em busca de qualquer coisa que chamam de destino, vida, futuro ou estrada. Tenho ido em frente, sempre. Buscando.

Esperando. Tentando. Querendo. Vivendo. E o vento aqui em cima, e a lua aqui ao lado me lembram que hoje é segunda-feira à noite e eu estou aqui a refletir.

E a pensar que tudo acaba, mesmo e sempre. Mas a maior beleza de um final é um começo. É o que se ganha, não o que se perde. E o resto, o que fica para trás, deixa a forma mais bonita e sincera de sentir saudades.”

RESUMO

Atualmente aproximadamente 75-88% das infecções fúngicas são causadas por espécies de *Candida*, que geram um custo de 1,7 bilhões de dólares para a saúde pública, somente nos EUA. *Candida albicans* é o principal microrganismo causador da candidíase bucal, uma infecção da mucosa oral do organismo humano. A patogenicidade dessa espécie está relacionada com a formação de biofilmes, que agem como um revestimento impermeável e protetor, e tornam o microrganismo resistente a medicamentos convencionais. Neste caso, os antifúngicos mais comumente utilizados, não apresentam ação eficaz. Por esse motivo, a busca por novas opções de tratamento e por novos medicamentos está em constante desenvolvimento, principalmente na área da biotecnologia. Um exemplo disso são os peptídeos antifúngicos da família das Histatinas, entre eles a Histatina-5. Trata-se de um peptídeo naturalmente encontrado na saliva humana, mas que sofre rápida degradação quando presente na cavidade bucal, que é seu local de ação. Diante disto, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de lipossomas de diferentes composições lipídicas, na intenção de proteger o peptídeo e melhorar sua ação, preservando seu potencial antifúngico. Para isso foi sintetizado o peptídeo 0WHistatina-5, um análogo do peptídeo Histatina-5, que contém o aminoácido triptofano em sua sequência. Foi utilizado o método de síntese em fase sólida, seguido de clivagem e purificação, com confirmação da massa molecular utilizando HPLC e ESI-MS. Os lipossomas foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico, em 3 composições lipídicas diferentes, denominadas de F1, F2 e F3. F1 possui somente DPPC e Chol em sua composição, F2 contém, além desses componentes, PEG e F3 contém DPPC, Chol e POPG. Os lipossomas foram submetidos a processo de extrusão e sonicação para padronização do tamanho das vesículas, e estudo da melhor técnica para sua produção. Os lipossomas foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico determinação da eficiência de encapsulação, cinética de liberação, estabilidade e avaliação da atividade antifúngica. O método de síntese do peptídeo 0WHistatina-5 foi adequado e o processo de purificação possibilitou a obtenção do peptídeo com alto grau de pureza. Os lipossomas obtidos por extrusão apresentaram tamanho médio na faixa de 100 nm, enquanto os lipossomas obtidos por sonicação apresentaram tamanho menor, na faixa de 90 nm. Os lipossomas contendo 0WHistatina-5, apresentaram aumento em seu tamanho médio, indicando que o peptídeo está contido no compartimento interno aquoso dos lipossomas. A eficiência de encapsulação foi maior para os lipossomas obtidos por sonicação, sendo de 34,5% para a formulação F1, que contém DPPC e Chol em sua composição. A composição lipídica dos lipossomas está relacionada com a sua eficiência de encapsulação, e a presença de colesterol dificultou a encapsulação do peptídeo. A estabilidade das formulações também está relacionada com sua composição, sendo a formulação F3, obtida por sonicação e com POPG em sua formulação, a que apresentou melhor estabilidade quando armazenada por 60 dias a temperatura de 4°C. As formulações desenvolvidas apresentaram capacidade de liberar o peptídeo pelo tempo total de 96 horas, com o primeiro pico de liberação após 5 horas, e novo aumento do conteúdo liberado após 30 horas. O ensaio antimicrobiano foi realizado utilizando *C. albicans* ATCC 10231, e demonstrou que no tempo de 4 horas a inibição para F1 foi de 66,5%. Assim, este trabalho demonstrou que a utilização de sistemas nanoestruturados é de grande importância para viabilizar a aplicação do peptídeo Histatina-5 em estudos terapêuticos, e em estudos *in vivo* no futuro.

Palavras-chave: *Candida albicans*, candidíase bucal, Histatina-5, lipossomas, peptídeo antifúngico.

ABSTRACT

Currently, approximately 75-88% of fungal infections are caused by *Candida* species, which generate a cost of \$ 1.7 billion for public health in the US. *Candida albicans* is the main microorganism that causes oral candidiasis, an infection of the oral mucosa of the human organism. The pathogenicity of this species is related to the formation of biofilms, which act as an impermeable and protective coating, and make the microorganism resistant to conventional drugs. In this case, the most commonly used antifungals, have no effective action. For this reason, the search for new treatment options and new drugs is in constant development, especially in the biotechnology area. The antifungal peptides of the Histatin family, including Histatin-5, are an example. The Histatin-5 is a peptide naturally found in human saliva, but it undergoes rapid degradation when present in the oral cavity, which is its place of action. For this reason, this work aimed at developing liposomes of different lipid compositions, in order to protect the peptide, improve its action, and preserve its antifungal potential. For this, the peptide OWHistatin-5, an analog of the peptide Histatin-5, was synthesized, which contains the amino acid tryptophan in its sequence. Therefore, the peptide was synthesized manually by the solid phase synthesis method, followed by cleavage and purification. The molecular weight was confirmed by using HPLC and ESI-MS. The liposomes were produced by the lipid film hydration method, with three different lipid compositions, named F1, F2 and F3. F1 has only DPPC and Chol in its composition, F2 contains, in addition to these components, PEG and F3 contains DPPC, Chol and POPG. The liposomes were submitted to extrusion and sonication processes, in order to standardize their vesicle size, and determine the best technique for their production. The dynamic light scattering technique was used to characterize the liposomes, which were tested for encapsulation efficiency, release kinetics, stability and evaluation of the antifungal activity. The synthesis method of the Histatin-5 was adequate and the purification process allowed to obtain the peptide in high purity. The liposomes obtained by extrusion presented average size in the range of 100 nm, while the liposomes obtained by sonication presented a smaller size, in the range of 90 nm. Liposomes loaded with Histatin-5 showed an increase in their mean size, which indicated that the peptide was contained in the intern aqueous compartment of the liposomes. The encapsulation efficiency was higher for the liposomes obtained by sonication. The F1 formulation presented an encapsulation efficiency of 34.5%, which contains DPPC and Chol in its composition. The lipid composition of the liposomes was related to their encapsulation efficiency, and the presence of cholesterol hindered the encapsulation of the peptide. The stability of the formulations was also related to their compositions. The F3 formulation obtained by sonication and containing POPG presented a higher stability when stored for 60 days at 4°C. The formulations showed the ability to release the peptide in the total period of 96 hours. The first release peak was observed after 5 hours, and a further increase of the released content was verified after 30 hours. The antimicrobial assay was performed using *C. albicans* ATCC 10231. It demonstrated that the inhibition for F1 was 66.5% after four hours of incubation, and it was maintained at 30% until the end of the experiment. Thus, this work conclusions showed that the use of nanostructured systems is of great importance to enable the application of Histatin-5 in therapeutic studies, and in vivo studies in the future.

Keywords: Antifungal peptide, buccal candidiasis, *Candida albicans*, Histatin-5, liposomes.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fatores de virulência em <i>C. albicans</i> induzidos pelo polimorfismo da espécie.	23
Figura 2 - Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5.....	26
Figura 3 - Mecanismo de ação da Histatina-5 em <i>C. albicans</i> . Histatina-5 permeia a membrana celular (A), é atraída para a mitocôndria (B), induz ao lançamento de ATP (C) e prejudica a respiração celular (E). Perda de ATP ativa um mecanismo de morte celular (D). geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (G), e detém a fase G1 do ciclo celular no núcleo (F).	26
Figura 4 - Esquema de um lipossoma, indicando o compartimento aquoso interno e a estrutura de um fosfolípídeo.	29
Figura 5 - Lipossomas; (A) lipossomas pequenos unilamelares (SUV) ou lipossomas grandes unilamelares (LUV); (B) lipossomas multilamelares (MLV).....	30
Figura 6 - Comportamento de fase das membranas lipídicas, indicando a transição de fase do estado "gel" para "cristal líquido".....	31
Figura 7 - Esquema da SPFS. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina. Já os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores de cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais (AA).....	36
Figura 8. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 bruto.....	46
Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro 0WHistatina-5.	46
Figura 10 - Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 após purificação. ..	47
Figura 11 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4, traçada em espectrofotômetro.	48
Figura 12 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4, traçada em espectrofluorímetro.	48
Figura 13 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em metanol, traçada em espectrofotômetro.	49
Figura 14 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em metanol, traçada em espectrofluorímetro.	49
Figura 15 - Faixa linear, em espectrofluorímetro, para as concentrações de 0WHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4.....	50
Figura 16 -Faixa linear, em espectrofluorímetro, para as concentrações de 0WHistatina-5 em metanol.....	51
Figura 17 - Efeito da quantidade de ciclos de extrusão nas diferentes composições de lipossomas.....	53

Figura 18 - Efeito do tempo de sonicação nas diferentes composições de lipossomas.....	53
Figura 19 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F1, obtidos por extrusão e sonicação.	56
Figura 20 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F2, obtidos por extrusão e sonicação.	57
Figura 21 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F3, obtidos por extrusão e sonicação.	58
Figura 22 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F1 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.....	62
Figura 23 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F2 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.....	63
Figura 24 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F3 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.....	64
Figura 25 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F1 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	69
Figura 26 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F1 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	70
Figura 27 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F2 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	72
Figura 28 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F2 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	73
Figura 29 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F3 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	75
Figura 30 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F3 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.....	76
Figura 31 - Perfil de liberação para 0WHistatina-5 in vitro.....	78
Figura 32 - Perfil de liberação in vitro para F1 encapsulada com 0WHistatina-5.....	78
Figura 33 - Perfil de liberação in vitro para F2 encapsulada com 0WHistatina-5.....	79
Figura 34 - Perfil de liberação in vitro para F3 encapsulada com 0WHistatina-5.....	79
Figura 35 - Crescimento de <i>C. albicans</i> submetidas a tratamento com F1, F1+0WHistatina-5 e 0WHistatina-5 livre.....	82
Figura 36 - Porcentagem de inibição de <i>C. albicans</i> ao longo do tempo, submetidas a tratamento com F1, F1+0WHistatina-5 e 0WHistatina-5 livre.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5 e do peptídeo análogo 0WHistatina-5 sintetizado.	34
Tabela 2 - Composição lipídica dos lipossomas utilizados.	38
Tabela 3 - Massas obtidas após processo de síntese, clivagem e purificação, juntamente com rendimento final da síntese.	45
Tabela 4 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F1 obtidos por extrusão e sonicação.	56
Tabela 5 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F2 obtidos por extrusão e sonicação.	57
Tabela 6 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F3 obtidos por extrusão e sonicação.	58
Tabela 7 - Valores utilizados para a realização do cálculo de eficiência de encapsulação (EE), de acordo com a equação 1, para lipossomas obtidos por extrusão.	66
Tabela 8 - Valores utilizados para a realização do cálculo de eficiência de encapsulação (EE), de acordo com a equação 1, para lipossomas obtidos por sonicação.	66
Tabela 9 - Potencial Zeta para formulação F1 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.	68
Tabela 10 - Potencial Zeta para formulação F2 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.	71
Tabela 11 - Potencial Zeta para formulação F3 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.	74

Lista de siglas e abreviações

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

ACN – Acetonitrila

ATP – Adenosina trifosfato

Ca – Cálcio

Chol - Colesterol

CIM – Concentração inibitória mínima

Cu – Cobre

DCM – Diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DIEA – N-Diisopropiletilamina

DLS – Dynamic Light Scattering

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina de soja

EDT – 1,2-Etanoditiol

EE – Eficiência de encapsulação

ERO's – Espécies reativas de oxigênio

ESI-MS – Electron Spray ionization-Mass spectrometry

Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonila

G1 – Fase da Interfase do ciclo celular, denominado de GAP1

H₂O - água

HBTU - Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilurônio

HCl – Ácido clorídrico

HOBt – N-Hidroxibenzotriazol

HPLC - High performance liquid chromatography

IPD – índice de polidispersividade

KDa – quilodalton

LUV – Large Unilamellar Vesicles

MLV – Multilamellar Large Vesicles

NaCl – Cloreto de sódio

PEG – Polietilenoglicol

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

SPFS – Síntese de peptídeos em fase sólida

SUV – Small Unilamellar Vesicles

TFA – Ácido Trifluoracético

TFE – Trifluoretanol

TIS – Triisopropilsilano

T_m – Temperatura de transição de fase

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

VHS-1 – Vírus do herpes simples

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Zn- Zinco

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Infecções Fúngicas e <i>Candida albicans</i>	22
1.2	Histatinas: peptídeos antimicrobianos	25
1.3	Lipossomas como nanocarreadores	28
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Síntese do peptídeo 0WHistatina-5	34
3.2	Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado	36
3.3	Curva analítica do peptídeo 0WHistatina-5	38
3.4	Composição e preparo dos lipossomas	38
3.4.1	Sonicação	39
3.4.2	Extrusão	39
3.5	Caracterização física dos lipossomas	39
3.6	Eficiência de encapsulação	40
3.6.1	Separação do peptídeo 0WHistatina-5 não encapsulado	40
3.6.2	Determinação da eficiência de encapsulação do peptídeo 0WHistatina-5 nos lipossomas	41
3.7	Estabilidade das formulações	41
3.8	Cinética de liberação	41
3.9	Avaliação da atividade antifúngica das formulações produzidas	42
3.9.1	Preparação da suspensão padronizada de microrganismo	42
3.9.2	Avaliação da inibição do crescimento microbiano	43
3.10	Análise estatística	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1	Síntese do peptídeo 0WHistatina-5	45
4.2	Curva analítica do peptídeo 0WHistatina-5	47
4.3	Monitoramento do preparo dos lipossomas	52
4.4	Caracterização física dos lipossomas	54
4.5	Eficiência de encapsulação	60
4.5.1	Separação do peptídeo 0WHistatina-5 não encapsulado	61
4.5.2	Cálculo da eficiência de encapsulação (EE)	65
4.6	Estabilidade das formulações	67
4.6	Cinética de liberação	78
4.7	Avaliação da atividade antifúngica da formulação F1	81
5	CONCLUSÕES	85
	PERSPECTIVAS	86
	Referências	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Fúngicas e *Candida albicans*

Nas últimas décadas ocorreu um aumento da mortalidade causada por infecções fúngicas, que passaram de casos isolados e raros ao maior problema de saúde mundial atual, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos. Isto ocorreu devido a intervenções médicas como quimioterapia para tratamento de câncer, imunossupressão para realização de transplantes e a grande prevalência de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Tal fato permitiu o aparecimento de infecções fúngicas prevalentes, dentre as quais os principais patógenos são *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016). Esses patógenos causam, juntos, a morte de mais de 1 milhão de pessoas anualmente, no mundo inteiro. Dentre essas, aproximadamente 75-88% das infecções fúngicas são causadas por espécies de *Candida*, que geram um custo de 1,7 bilhões de dólares para a saúde pública, somente nos EUA, além de influenciar o aumento de casos graves de infecções hospitalares (BERKOW; LOCKHART, 2017).

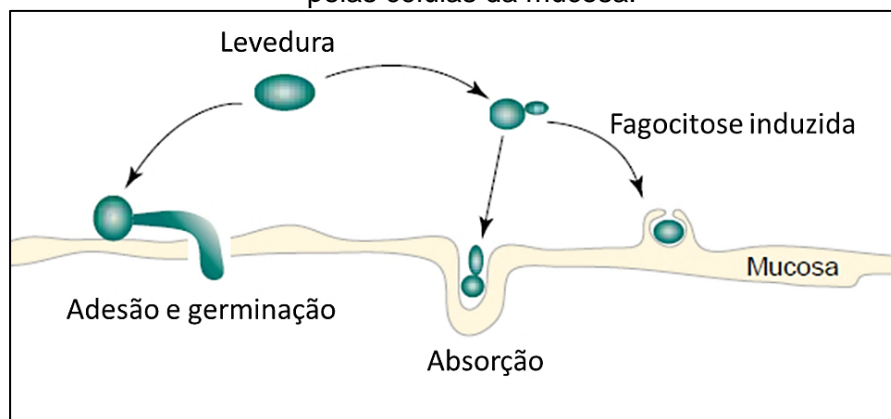
C. albicans existe como um microrganismo comensal da pele, boca e trato gastrointestinal. Sua propagação é controlada pela coexistência com a flora microbiana normal do organismo e também pelos processos de defesa do sistema imunológico. Porém, quando há supressão da resposta imune contra *C. albicans*, ocorre a colonização do tecido e a instalação da infecção, mais comumente manifestada como candidíase e candidíase orofaríngea. Esta infecção superficial pode se tornar invasiva, atingindo a corrente sanguínea e órgãos internos, causando mortalidade em 40% dos casos, mesmo que tratados (ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016).

A patogenicidade dessa espécie é atribuída à fatores de virulência, como a habilidade de se defender do sistema imunológico do hospedeiro, aderência, formação de biofilme em tecidos ou em dispositivos médicos, e produção de enzimas hidrolíticas

como proteases, fosfolipases e hemolisina, que causam danos ao tecido colonizado (SARDI et al., 2013). Por ser uma espécie polimórfica, *C. albicans* se alterna entre a forma de levedura e a forma de hifa. A forma de levedura está associada a doenças sistêmicas, enquanto as hifas são estruturas aptas a aderir e colonizar o tecido hospedeiro, promovendo a invasão (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Além de ser capaz de aderir a superfície da mucosa hospedeira e promover a germinação das hifas, *C. albicans* também possui capacidade de induzir sua fagocitose pelas células da mucosa a ser colonizada, facilitando assim a transição de fase e a colonização. Outra possibilidade relacionada com a colonização, é a absorção das células de *C. albicans* pela mucosa, fato que promove seu crescimento já no interior do tecido do hospedeiro. Todos esses eventos são promovidos com o auxílio de adesinas e enzimas, mas principalmente pela capacidade de transição de fase, de levedura para a forma filamentosa de hifa, como mostrado na Figura 1 (CALDERONE; FONZI, 2001).

Figura 1 - Fatores de virulência em *C. albicans* induzidos pelo polimorfismo da espécie. A levedura ao se aderir a mucosa hospedeira, consegue germinar e passar para forma filamentosa de hifa. A levedura é capaz de induzir sua fagocitose e promover sua absorção pelas células da mucosa.



Fonte: adaptado de CALDERONE E FONZI, 2001.

Fatores, como idade (recém-nascidos e idosos), trocas de epitélio, tabagismo, alterações hormonais e salivares, alterações de barreira de mucosa, alterações nutricionais, alterações imunológicas e, em especial, usuários de próteses dentárias, tornam esses indivíduos mais susceptíveis a infecções por *C. albicans* (RAMOS et al., 2015), favorecendo a ocorrência do polimorfismo e aumentando a capacidade invasiva deste microrganismo.

Nesse caso, as próteses dentárias tornam-se verdadeiros reservatórios de *C. albicans* quando não higienizadas de forma correta. Tornando-se mais susceptíveis à formação de biofilmes, uma vez que a natureza da superfície dessas próteses facilita a afinidade do microrganismo e auxilia sua aderência. Além disso favorece a reprodução do microrganismo e a transição de um estágio de vida para outro de maior virulência, a forma de hifas (LI et al., 2010).

Quando assume a forma de hifas, *C. albicans* forma biofilmes que agem como um revestimento impermeável e protetor, o que torna o microrganismo resistente também a ações de fagocitose do sistema imunológico do hospedeiro, aumentando o tempo de tratamento e muitas vezes inviabilizando a total eliminação dos microrganismos (MOFFA et al., 2015b).

Os biofilmes são caracterizados como uma estrutura microbiana comunitária capaz de aderir a superfícies lisas e revestir-se em uma matriz de material exopolissacarídico. A habilidade da *C. albicans* em formar biofilmes está diretamente relacionada à capacidade de causar infecções. A resistência aos antimicrobianos induzida por biofilmes está associada à limitada penetração de fármacos na matriz (SARDI et al., 2013). Neste contexto, os antifúngicos mais comumente utilizados, como polienos (nistatina e anfotericina B) ou azóis (itraconazol, miconazol, fluconazol) não apresentam ação eficaz, uma vez que células de biofilme já demonstraram resistência a tais compostos. Por outro lado, existe também fármacos de efeito sistêmico, como fluconazol e anfotericina B. Tais antifúngicos demonstram maior efetividade no tratamento de tais infecções, porém seus níveis de toxicidade são maiores e não devem ser utilizados em doses constantes ou rotineiras (CANNON et al., 2007; JOHNSON et al., 1995)

Por esse motivo, a busca por novas opções de tratamento e inclusive por novos fármacos estão em constante desenvolvimento principalmente na área da biotecnologia. Um exemplo disso são os peptídeos biologicamente ativos e encontrados naturalmente em organismos vivo como plantas, animais e microrganismos.

1.2 Histatinas: peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são importantes moléculas que participam das defesas naturais de plantas, animais e insetos. Sua ação envolve a prevenção de infecções por fungos, bactérias, vírus, protozoários e outros parasitas. Diversos peptídeos antimicrobianos compõem a resposta imune inata dos organismos vivos e estão presentes em todos os sistemas e tecidos humanos, protegendo-o continuamente contra os ataques dos mais variados microrganismos, exercendo potencial terapêutico como antibiótico (ZASLOFF, 2002).

Diferente dos antibióticos convencionais, é raro adquirir resistência contra estes peptídeos, uma vez que apresentam mais de um mecanismo de ação, que por muitas vezes atuam de forma conjunta para causar a morte do microrganismo. Por isso, muitas são as vantagens desses peptídeos, como o amplo espectro de ação, início praticamente imediato de ação após contato com o alvo, baixa dose administrada para sua ação e atividade biológica contra microrganismos que já possuem resistência a inúmeros medicamentos convencionais (SEO et al., 2012).

Os peptídeos antimicrobianos da família das Histatinas compõem o grupo de proteínas mais abundantes presentes na saliva humana e possuem características multifuncionais. Apresentam forte atividade antifúngica e antibacteriana contra muitas espécies presentes na microbiota oral e também são de grande importância para a manutenção de sua homeostase, auxiliando na cicatrização de feridas e na re-epitelização oral (BAEV et al., 2002; HELMERHORST et al., 2006). Receberam o nome de Histatinas por possuírem muitos resíduos do aminoácido histidina, conforme sequência de aminoácidos representada na Figura 2. Entre esses peptídeos está a Histatina-5, que possui ampla ação antifúngica contra fungos patogênicos, incluindo *C. albicans*. Este peptídeo possui de 3 a 4 KDa, sequência de 24 resíduos de aminoácidos e carga positiva em pH fisiológico. Assume, preferencialmente, estrutura de α -hélice em DMSO (dimetilsulfóxido) e em TFE (trifluoretanol)/água, e quando somente em água, assume estrutura desordenada. A estrutura em α -hélice é importante para a atividade antifúngica deste peptídeo, como já demonstrado em alguns estudos (HAN et al., 2016).

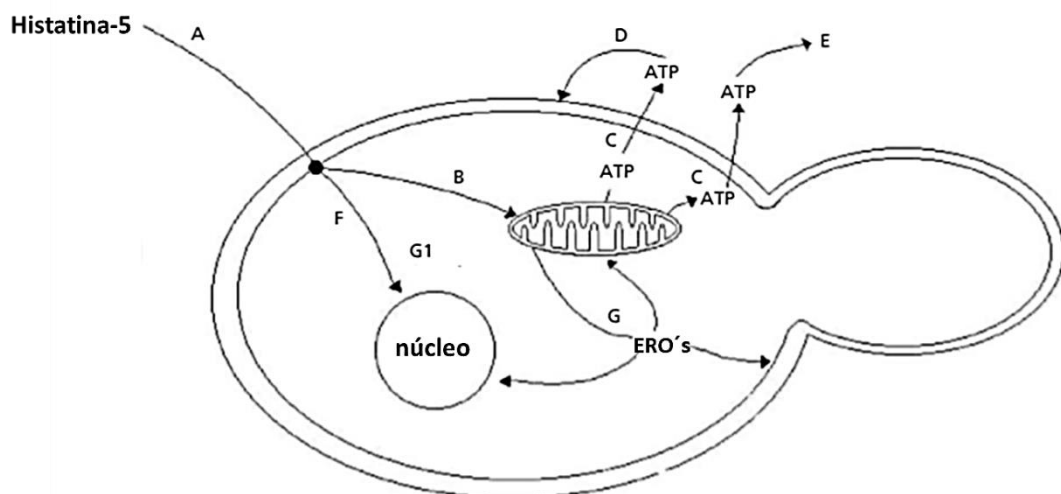
Figura 2 - Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5
$$^+NH_3\text{-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr-COO}^-$$
Histatina-5

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Estudos recentes demonstram que o peptídeo Histatina-5 é o mais potente antifúngico da família das Histatinas. Ele consegue inibir o crescimento de cepas de *C. albicans* em concentrações na faixa de 25 a 800 µg/mL (MOFFA et al., 2015b) apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 8-16 µg/mL para algumas espécies de *C. albicans* testadas (HAN et al., 2016).

O mecanismo de ação da Histatina-5 envolve o lançamento de ATP para o meio extracelular, por meio de sua interação com as mitocôndrias presentes na célula do microrganismo (BAEV et al., 2002; HELMERHORST et al., 1999). A falta de energia para a respiração celular por si só já causa a morte celular, mas alguns estudos mostraram que além de causar o efluxo de ATP a Histatina-5 também gera espécies reativas de oxigênio (ERO's) no interior da célula e interfere na fase G1 do ciclo celular como visto na Figura 3.

Figura 3 - Mecanismo de ação da Histatina-5 em *C. albicans*. Histatina-5 permeia a membrana celular (A), é atraída para a mitocôndria (B), induz ao lançamento de ATP (C) e prejudica a respiração celular (E). Perda de ATP ativa um mecanismo de morte celular (D). geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (G), e detém a fase G1 do ciclo celular no núcleo (F).



Fonte: adaptado de KAVANAGH; DOWD, 2004.

A Histatina-5 é capaz de quelar metais, micronutrientes importantes para a sobrevivência das células. Assim, produz um ambiente com condições nutricionais limitadas, o que interfere negativamente no desenvolvimento da *C. albicans*. Metais intracelulares também podem ser quelados, interferindo nas funções vitais da célula fúngica. A mitocôndria, por exemplo, é uma organela sensível às mudanças de disponibilidade de Fe, e desestabilizando a homeostase desse metal, ocorre a morte de células de *C. albicans*. Outra questão importante, é que o complexo Histatina-5:Ferro produz interações que servem como fonte para a geração de ERO's, as quais oxidam importantes proteínas mitocondriais, induzindo à morte celular (PURI; EDGERTON, 2014).

Além de sua ação antifúngica, Histatina-5 também favorece a formação de uma camada de proteção para os dentes, sendo um importante constituinte na mineralização dentária, pois é adsorvida juntamente com hidroxiapatita, estrutura formadora do esmalte dentário. Essa interação foi demonstrada por meio da adsorção de Histatina-5 em microplacas de poliestireno, mimetizando sua adsorção nos dentes, com seguida introdução de *C. albicans*, visando a formação de biofilmes. As placas adsorvidas com Histatina-5 demonstraram uma clara inibição da colonização fúngica, evidenciando o potencial protetor desse peptídeo (MOFFA et al., 2015a).

Entretanto, foi notada diferença entre a quantidade do peptídeo presente na secreção salivar coletada diretamente da glândula parótida e a encontrada na saliva já presente na cavidade oral. A secreção glandular possuía quantidades maiores de Histatina-5, que desaparecia rapidamente quando dissolvida no volume total da saliva na cavidade oral (MOFFA et al., 2015a). Há duas hipóteses que explicam este acontecimento, uma delas sugere que as proteínas salivares equilibram a secreção por meio de degradação proteolítica. Uma outra possibilidade é a ligação de Histatina-5 com sais e metais presentes na saliva, como Ca, Cu e Zn, que impedem a detecção deste peptídeo. Histatina-5 também pode se complexar com a enzima amilase salivar, o que gera a diminuição de sua ação antifúngica (PURI; EDGERTON, 2014). Também ocorrem interações entre as proteínas na própria saliva e a Histatina-5, que pode se complexar com a enzimas presentes na cavidade bucal. A enzima amilase salivar forma um complexo estável com este peptídeo, o que leva a uma diminuição de sua ação antifúngica. (MOFFA et al., 2015b).

No entanto, todos esses dados sugerem que o peptídeo Histatina-5 possui um potencial antifúngico promissor, contribuindo para a manutenção da homeostase da

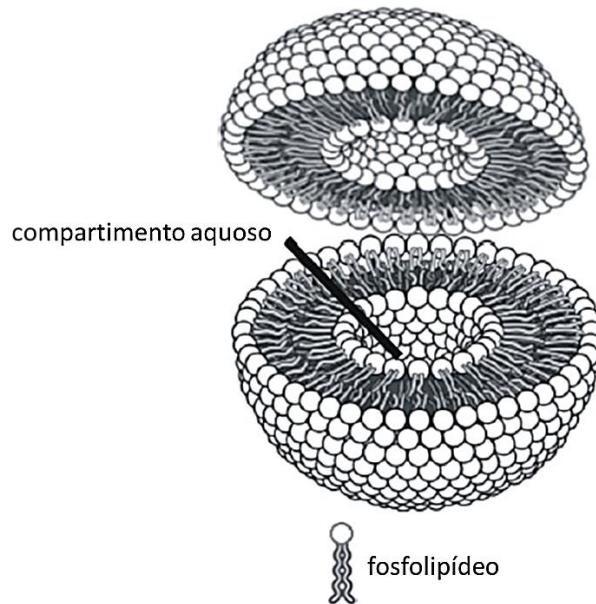
cavidade bucal (MOFFA et al., 2015b). Neste sentido, uma solução para a aplicação do peptídeo Histatina-5 no combate ao microrganismo *C. albicans*, é o desenvolvimento de nanocarreadores, como os lipossomas. A intenção é de proporcionar aumento da biodisponibilidade do peptídeo no local de ação, fazendo com que seu efeito fungicida seja preservado e intensificado por um período maior, otimizando assim o combate à *C. albicans*.

1.3 Lipossomas como nanocarreadores

Em meados da década de 60, ocorreram as primeiras tentativas de obtenção de um sistema capaz de transportar biomoléculas. Entretanto, essa tentativa fracassou, uma vez que o sistema era composto por nylon, material artificial que se acumula no organismo (CHANG, 1964). Em 1965, Bangham e colaboradores, desenvolveram as primeiras vesículas compostas por fosfolídeos, que foram nomeadas de lipossomas (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; SESSA; WEISSMANN, 1968). Mas foi somente em 1971 que Gregoriadis e colaboradores propuseram pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema carreador de fármacos (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1971).

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídeos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em bicamadas lipídicas concêntricas tipo “concha esférica”, como na Figura 4. Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente (CHORILLI et al., 2007).

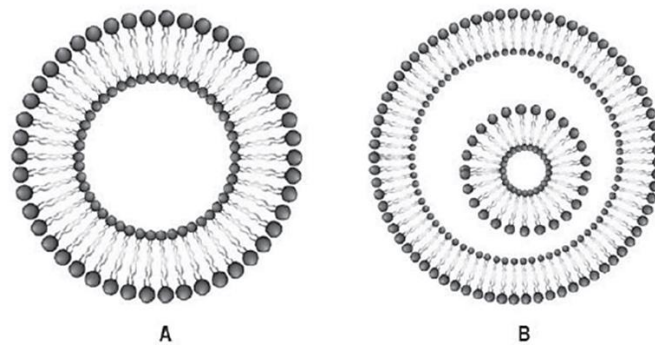
Figura 4 - Esquema de um lipossoma, indicando o compartimento aquoso interno e a estrutura de um fosfolípídeo.



Fonte: adaptado de BERBEL MANAIA et al, 2017.

Os lipossomas podem ser classificados em três principais grupos: a) lipossomas multilamelares (MLV), formados por várias bicamadas concêntricas, com diâmetro entre 400 a 3.500 nm, b) lipossomas pequenos unilamelares (SUV), constituídos por apenas uma bicamada como membrana com diâmetro variando de 20 a 50 nm e c) lipossomas grandes unilamelares (LUV), constituídos por apenas uma bicamada, apresentando diâmetro entre 200 a 1.000 nm, conforme desenho ilustrativo na Figura 5 (SANTOS; CASTANHO, 2002). São empregados na terapêutica há mais de 40 anos e apresentam muitas vantagens, entre elas a biocompatibilidade, pois contém os mesmos constituintes estruturais que as membranas biológicas, os fosfolípidos. O mais utilizado é a fosfatidilcolina, pois tende a formar uma bicamada estável em solução aquosa, mas utiliza-se também colesterol, lípidos catiônicos ou aniônicos e polímeros como o polietilenoglicol (PEG) (CHORILLI et al., 2006).

Figura 5 - Lipossomas; (A) lipossomas pequenos unilamelares (SUV) ou lipossomas grandes unilamelares (LUV); (B) lipossomas multilamelares (MLV).

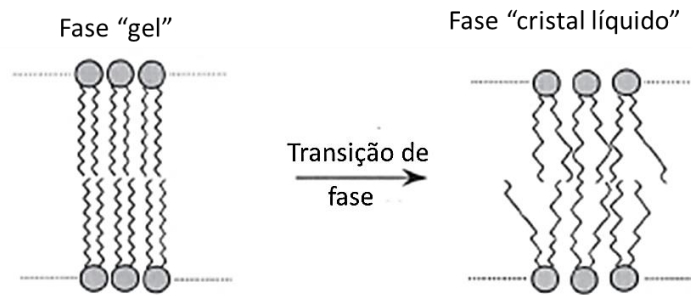


Fonte: adaptado de FERREIRA et al, 2005.

As bicamadas lipídicas, como os lipossomas, passam por um processo chamado transição de fase. Que se caracteriza pela mudança de estado físico da bicamada em uma determinada temperatura, conhecida como temperatura de transição de fase ou temperatura de fusão (T_m). Os lipídeos presentes na bicamada passam da fase gel para a fase líquido-cristalina quando a bicamada lipídica é aquecida na temperatura de transição de fase (NIEMELÄ et al., 2010).

Uma bicamada em fase gel, é mais rígida e menos fluída, enquanto uma bicamada em sua fase líquido-cristalina é mais fluída e menos rígida, conforme Figura 6. De forma geral, quando a temperatura ambiente está abaixo da T_m a bicamada encontra-se em sua fase gel e quando a temperatura ambiente é maior que T_m a bicamada está na fase líquido-cristalina. Por esse motivo, a composição lipídica dos lipossomas está relacionada com seu estado, se gel ou se líquido-cristalino, e a T_m das bicamadas depende de sua composição lipídica. Cada lipídeo possui sua própria T_m , por isso, os lipídeos utilizados na composição dos lipossomas podem influenciar suas características físico-químicas. A adição de colesterol à bicamada lipídica causa o desaparecimento da transição de fase, e a bicamada se torna mais rígida e com menor fluidez. Lipídeos como a fosfatidilcolina de soja (DPPC) possuem T_m de 41°C, se encontrados na temperatura ambiente de 25°C, a bicamada formada por esse lipídeo se encontra na fase gel (FRÉZARD et al., 2005).

Figura 6 - Comportamento de fase das membranas lipídicas, indicando a transição de fase do estado "gel" para "cristal líquido".



Fonte: adaptado de FRÉZARD et al., 2005.

Para a produção de lipossomas, a técnica de hidratação do filme lipídico é a mais utilizada. Esta técnica consiste em solubilizar os lipídeos em solvente orgânico, como clorofórmio ou metanol, e em seguida evaporar esse solvente formando um fino filme na parede do tubo utilizado. O filme lipídico preparado é posteriormente hidratado com água ou com solução tampão adequada. A molécula a ser encapsulada, pode ser incorporada na solução tampão, no caso de serem hidrofílicas, ou dissolvidos na mistura lipídica, se forem lipofílicas. Após agitação da mistura, obtém-se uma solução com população de vesículas heterogêneas, majoritariamente de MLV's (FERREIRA et al., 2005).

Para obtenção de vesículas homogêneas e do tipo LUV's ou SUV's podem-se empregar processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os mais utilizados são os processos mecânicos, como a sonicação e a extrusão. Na extrusão, a dispersão de MLV's passa sob pressão através de filtros de policarbonato, de diâmetro de poro bem definido. Após várias passagens consecutivas pelo filtro, obtêm-se os lipossomas LUV's. Já a sonicação consiste em submeter a dispersão de MLV's, a vibrações de alta energia, quebrando os MLV's e formando novamente os SUV'S ou LUV'S (FERREIRA et al., 2005).

A utilização dos lipossomas está relacionada também, com uma maior duração do efeito terapêutico do fármaco, que apresenta prolongada liberação no organismo, permitindo que doses maiores sejam administradas sem os riscos da toxicidade. Assim, há maior janela terapêutica e um menor número de administrações do fármaco ao longo do tratamento. Como demonstraram os estudos com o peptídeo LL-37 encapsulado em lipossomas que, após a encapsulação, apresentou bioatividade melhorada e redução de toxicidade, permitindo a ampliação a janela terapêutica para tratamento de VHS-1 (vírus

de herpes simples). Os estudos realizados indicam a formulação lipossomal contendo LL-37, como um sistema efetivo para carreamento e entrega do peptídeo no alvo de ação (RON-DOITCH et al., 2016).

Lipossomas são eficazes em promover proteção contra a degradação externa por enzimas ou por degradação proteolítica (VOLTAN et al., 2016). Por esse motivo, são utilizadas para encapsulação de peptídeos e proteínas. Estudos de lipossomas encapsuladas com o peptídeo grelina, utilizado para tratamento da caquexia, caracterizada como fraqueza extrema em pacientes acometidos por doenças crônicas, demonstrou que os lipossomas foram capazes de proteger o peptídeo do ataque das enzimas tripsina e carboxilesterase em 20% e 81% respectivamente (SALADE et al., 2017).

Desta forma, o uso de lipossomas para encapsular o peptídeo Histatina-5 é promissor, pois poderá proporcionar um aumento da disponibilidade do peptídeo no local de ação, fazendo com que seu efeito fungicida seja preservado e intensificado por um período maior, otimizando assim o combate à *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

O objetivo central desse projeto consiste no desenvolvimento de formulações de lipossomas, compostas por diferentes tipos de lipídeos, na intenção de observar a melhor formulação para encapsulação e futura aplicação do peptídeo antifúngico Histatina-5.

Assim, para alcançar esses objetivos, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 0WHistatina-5;
2. Avaliação da melhor metodologia de preparo dos lipossomas, por meio das técnicas de sonicação e extrusão;
3. Caracterização dos lipossomas por meio da determinação do tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersividade (IPD);
4. Determinação da eficiência de encapsulação do peptídeo 0WHistatina-5 em cada uma das formulações desenvolvidas;
5. Avaliação da estabilidade dos sistemas lipossomais produzidos, armazenados em temperaturas diferentes; 4°C e 37°C, pelo período de 60 dias.
6. Avaliação da cinética de liberação do peptídeo 0WHistatina-5 pelos sistemas lipossomais produzidos;
7. Realização de testes *in vitro* contra o fungo *C. albicans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese do peptídeo 0WHistatina-5

A principal ferramenta utilizada hoje para obtenção de peptídeos de até 60 resíduos de aminoácidos, é a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS). Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um L- α -aminoácido por vez, a partir do grupo carboxílico C-terminal que se encontra ligado covalentemente a uma resina, suporte polimérico insolúvel e inerte nas condições usadas. (MERRIFIELD, 1963).

Estes polímeros possuem alto grau de solvatação em solvente apolar dando acessibilidade dos sítios reativos aos reagentes que passam pelas partículas. Para que ocorra reação de condensação, como a ligação peptídica ou ligação amida de maneira orientada, é necessária uma proteção adequada dos outros grupos funcionais que não estão relacionadas com a ligação peptídica, portanto são utilizados protetores permanentes nestes grupos, pois devem permanecer até o final da síntese.

Já os grupamentos α -amínicos são protegidos temporariamente, removidos a cada passo de acoplamento. Para a síntese do peptídeo proposto neste projeto, 0WHistatina-5, cuja sequência de aminoácidos de encontram na Tabela 1, foi utilizado grupamento Fmoc (9- fluorenilmetiloxicarbonila) como protetor do grupo α -amino. Para proteção das cadeias laterais dos resíduos são utilizados grupos protetores como os grupos terc-butil (tBu), tritil e terc-butiloxicarbonil, entre outros. O Fmoc é base lábil, ou seja, a sua retirada do grupo amino e desproteção, é realizada em um meio básico com solução de 20% piperidina em N, N – Dimetilformamida (DMF).

Tabela 1 - Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5 e do peptídeo análogo 0WHistatina-5 sintetizado.

Nome	Sequência primária dos resíduos de aminoácidos
Histatina-5	D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y
0WHistatina-5	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

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

O peptídeo análogo 0WHistatina-5 foi sintetizado com a adição do aminoácido triptofano (W) em sua sequência, conforme pode ser visto na Tabela 1. A sequência original foi mantida e somente o aminoácido triptofano foi inserido na extremidade N-terminal. Por se tratar de um aminoácido fluorescente, com excitação no comprimento de onda de 280 nm e emissão de fluorescência no comprimento de onda de 360 nm, a sua adição ao peptídeo em questão permitiu seu monitoramento por técnica de fluorescência, com maior sensibilidade. A técnica de fluorescência foi utilizada em diversos experimentos deste projeto para que o peptídeo pudesse ser detectado, como será visto em tópicos posteriores.

A etapa de acoplamento, na síntese em fase sólida, é a base da formação da ligação peptídica sendo necessário a ativação dos grupos carboxila do aminoácido a ser inserido para que ele possa ser atacado pelo grupo amina do aminoácido ligado à resina. Para isso, foram utilizados agentes de acoplamento como o N, N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/NHidroxibenzotriazol (HOBt), ou o O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU)/N-Etildiisopropilamina (DIEA), juntamente com o resíduo de aminoácido a ser adicionado. Nesta reação foram utilizadas três vezes de excesso em relação ao amino grupo da resina, durante duas horas de agitação.

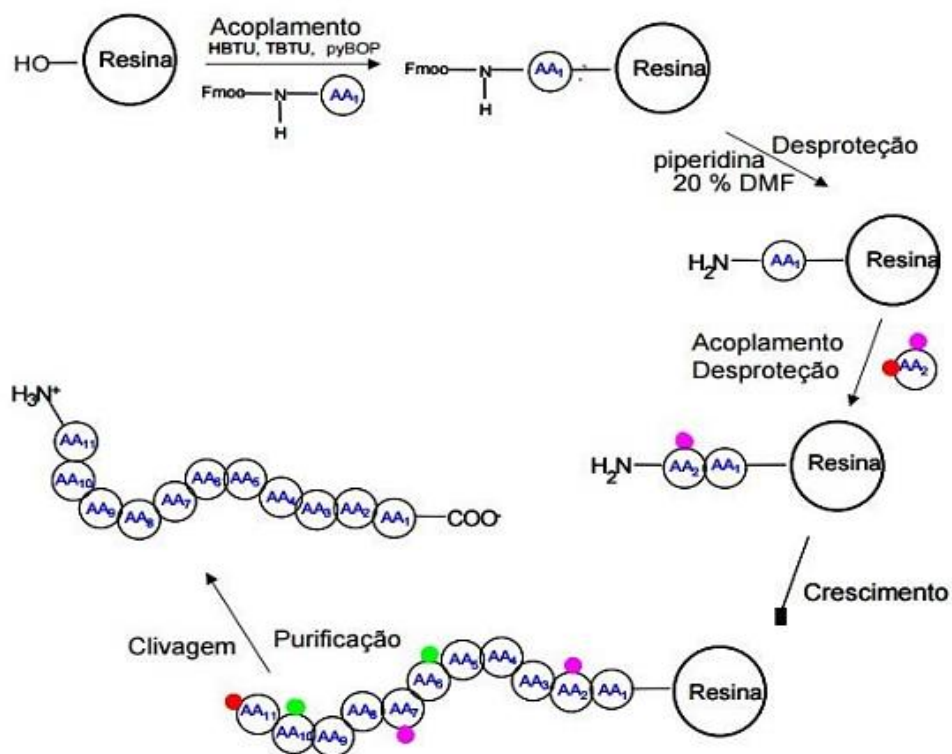
Entre cada passo foram realizadas lavagens com DMF e diclorometano (DCM) para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada passo do processo de síntese - acoplamento e desproteção - a resina foi submetida ao teste de ninidrina. A ninidrina, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, por sua vez, indica a eficácia dos passos de desproteção e acoplamento.

Ao final dos acoplamentos de todos os resíduos de aminoácidos, foi realizada a clivagem dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais. Para isso foi utilizada uma solução de clivagem composta por ácido trifluoracético (TFA) (94%), água deionizada (2,5%), 1,2-etanoditiol (EDT) (2,5%) e triisopropilsilano (TIS) (1%), por 3 horas em agitação branda a 25°C. Após esse período, os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e observado a formação de um precipitado branco. A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos tipo "falcon" de centrifuga de 15 mL, e foram submetidos a

centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm, esse procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Após as lavagens, o precipitado foi seco em sistema a vácuo por cerca de 4-6 horas. Em seguida o peptídeo foi extraído utilizando solução aquosa contendo 10% de ácido acético (v:v). Após esta etapa, a solução ácida obtida foi concentrada e liofilizada obtendo-se um pó branco, representando como peptídeo bruto. Na Figura 7 está esquematizado o processo de SPFS.

Figura 7 - Esquema da SPFS. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina. Já os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores de cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais (AA).



Fonte: GARRIDO, 2007.

3.2 Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado

Após o processo de síntese, o peptídeo foi submetido a processo de purificação, já que o processo de síntese pode gerar contaminantes. Sendo assim, utiliza-se técnicas cromatográficas a fim de obter peptídeos sintéticos com um grau de pureza ideal para aplicações biotecnológicas.

Dentre as técnicas utilizadas para purificação, a cromatografia líquida de alta eficiência ou “highperformance liquid chromatography” (HPLC), foi a utilizada, com as seguintes condições cromatográficas:

Modo Semi-preparativo:

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . ACN
- Gradiente: 0,33% de solvente B por minuto em 90 minutos.
- Fluxo: 5 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Modo Analítico:

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . ACN
- Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos.
- Fluxo: 0,6 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Após o procedimento de purificação do peptídeo, a caracterização foi feita por meio de espectrometria de massas.

As análises foram realizadas em modo de “eletrospray” positivo por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, Bruker®, e também por HPLC acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS), permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente.

Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada um dos peptídeos de acordo com seus resíduos de aminoácidos.

3.3 Curva analítica do peptídeo 0WHistatina-5

Para traçar a curva analítica do peptídeo 0WHistatina-5 foi utilizada solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4 e também metanol, porque nos estudos posteriores, este solvente será utilizado para a ruptura dos lipossomas e quantificação do peptídeo contido no interior das vesículas.

Partiu-se, então, de uma solução concentrada de 0WHistatina-5, que foi diluída para 27, 13,5, 6,75, 3,37 e 1,69 μ M. Em seguida, uma amostra de cada solução foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm, e também em espectrofluorímetro, com excitação em 280 nm, varredura de 300 nm a 500 nm e máximo de emissão de fluorescência em 360 nm. Este procedimento foi repetido para o preparo da curva analítica em metanol.

3.4 Composição e preparo dos lipossomas

Foram produzidas três formulações distintas de lipossomas compostas por dipalmitoilfosfatidilcolina de soja (DPPC); colesterol (Chol); polietilenoglicol (PEG) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (POPG), de acordo com as quantidades relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição lipídica dos lipossomas utilizados.

Formulação	DPPC (mg)	Chol (mg)	PEG (mg)	POPG (mg)
F1	40	2	-	-
F2	40	2	1	-
F3	40	2	-	1

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

As misturas de lipídeos correspondentes a cada uma das formulações foram dissolvidas em clorofórmio e após, transferida para tubos de ensaio. Em seguida o solvente foi evaporado lentamente sob fluxo de nitrogênio, para a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 12 h.

A resuspensão do filme lipídico foi feita utilizando 1 mL de solução tampão Tris HCl 10 mM, pH 7 para a obtenção dos lipossomas vazios, já para obtenção dos lipossomas contendo o peptídeo 0WHistatina-5 encapsulado, foi utilizada 1 mL de solução tampão padronizada com 80 μ M do peptídeo.

Para conseguir o desprendimento total do lipídeo das paredes do tubo, foram feitas agitações mecânicas em agitador tipo Vortex, obtendo desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV's) que foram submetidos a duas técnicas distintas para sua homogeneização e padronização de tamanho:

3.4.1 Sonicação

Foi utilizado sonicador de haste de titânio Q700 da QSonica®, com ciclos de sonicação com duração total de 4 minutos. O tubo contendo a amostra permaneceu em banho de gelo para evitar o aquecimento excessivo. Em seguida, a mostra foi centrifugada a 13000 rpm, 25°C, durante 15 minutos para sedimentar as partículas de titânio liberadas durante o processo de sonicação.

3.4.2 Extrusão

Foi utilizado extrusor Avanti Polar Lipids®, equipado com membrana de policarbonato Nuclepore®, GE Healthcare Life Science, com poros de 100 nm de diâmetro. O equipamento foi aquecido até aproximadamente 60°C e foram realizados de 25-30 ciclos de extrusão, até obtenção dos lipossomas com tamanho homogêneo.

3.5 Caracterização física dos lipossomas

Após a preparação dos lipossomas por meio da técnica de sonicação e de extrusão, a caracterização física das vesículas foi realizada por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering), o qual determinou o tamanho médio das vesículas, potencial zeta e índice de polidispersividade (IPD). Tais parâmetros estão relacionados com as características físico-químicas dos lipossomas produzidos.

Esta técnica fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, calculado pela equação de Einsten-Stokes. A técnica consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz.

Esta é captada em sinal que é enviado ao correlator, no qual é feito o processamento dos dados, fornecendo os valores de diâmetro médio e índice de polidispersividade (BERBEL MANAIA et al., 2017).

Foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano NS; Malvern Instruments UK, com fonte de laser He-Ne 4,0 mW, 633 nm, do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP. O potencial zeta, que indica a carga de superfície dos lipossomas, também foi analisado pelo mesmo equipamento.

As amostras de lipossomas foram diluídas em 1:10 antes das análises em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4.

3.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do peptídeo 0WHistatina-5 nos lipossomas formulados está relacionada com a quantidade de peptídeo que é interiorizada nos lipossomas, por esse motivo são necessárias duas etapas para sua quantificação, sendo elas:

3.6.1 Separação do peptídeo 0WHistatina-5 não encapsulado

Após o processo de incorporação do peptídeo nos lipossomas pelas técnicas de sonicação e extrusão, a separação do peptídeo não encapsulado foi efetuada através da cromatografia de exclusão (ou gel filtração).

Utilizou-se resina Sephadex G-50 já hidratada, inserida em coluna de vidro de 20 cm de comprimento, com auxílio de solução tampão Tris HCl, 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 para favorecer o empacotamento, mantendo-se fluxo constante de 1,5 mL.min⁻¹. Desse modo, 1 mL da solução de lipossomas foram aplicados na coluna e eluídos com solução tampão Tris HCl, 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Foram coletadas 25 frações de 1 mL cada, e analisadas em espectrofluorímetro com excitação em 280 nm e emissão de máximo de fluorescência em 360 nm, para monitoramento do peptídeo não encapsulado. Para monitoramento dos lipossomas, as frações foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm, que indica a turbidez das amostras que continham lipossomas.

3.6.2 *Determinação da eficiência de encapsulação do peptídeo OWHistatina-5 nos lipossomas*

As frações contendo lipossomas foram reunidas, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 72 horas. Em seguida, foi adicionado 3 mL de metanol às amostras, com intenção de romper os lipossomas e liberar seu conteúdo interno. Uma alíquota dessa solução foi diluída em metanol e lida em espectrofluorímetro para quantificação do peptídeo encapsulado. Uma vez determinada a concentração do peptídeo encapsulado, a eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação 1, na qual o total encapsulado se refere a quantia de peptídeo no lipossoma após ruptura com metanol e o total adicionado se refere a quantia de peptídeo adicionado no início do processo de encapsulação.

$$EE (\%) = \frac{\text{Total Encapsulado}}{\text{Total Adicionado}} \times 100 \quad (1)$$

3.7 Estabilidade das formulações

Para realizar o estudo da estabilidade das formulações produzidas, F1, F2 e F3 foram armazenadas em refrigerador em temperatura de 2-8°C e também em estufa a 37°C, durante todo o período de análise. Nos tempos de 24 horas, 5, 10, 15, 30, 45, e 60 dias foram analisados o tamanho médio, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta.

3.8 Cinética de liberação

O estudo da cinética de liberação do peptídeo encapsulado nos lipossomas foi realizado por meio da técnica de fluorescência, uma vez que, o aminoácido triptofano (W) inserido confere fluorescência à molécula. Desse modo, utilizou-se espectrofluorímetro Varian® modelo CaryEclipse, acoplado a um sistema de circulação constante da solução tampão Tris HCl, 10mM, pH 7,4 que permaneceu em contato com o sistema lipossomal a ser avaliado. Foi adicionado 1 mL da solução de lipossomas e do peptídeo OWHistatina-5 em uma membrana de diálise de acetato de

celulose (Sigma-Aldrich® cut-off 14,000 kDa), que permitiu somente a passagem do peptídeo OWHistatina-5, retendo os lipossomas.

Assim, o peptídeo que permeava o tubo de diálise e saía para a solução tampão circulante no sistema, foi monitorado por meio do software Kinetics Varian®CaryEclipse, com emissão máxima de fluorescência em 360 nm pelo tempo total de 96 horas. Um gráfico de máximo de fluorescência por tempo foi traçado, e em seguida, por meio da utilização da curva padrão, avaliado o total liberado pelo sistema com a elaboração de um gráfico de concentração máxima liberada por tempo.

3.9 Avaliação da atividade antifúngica das formulações produzidas

Os testes de inibição do crescimento microbiano foram realizados em parceria com o laboratório de Microbiologia da Prof^a. Dr^a. Taís Bauab, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. A cepa do microrganismo, o laboratório e todo material utilizado para o teste foi cedido pela professora. A intenção do teste é avaliar a resposta do peptídeo OWHistatina-5 sintetizado e dos sistemas lipossomais produzidos frente a levedura *C. albicans* (ATCC 10231), uma cepa comumente utilizada para se realizar a triagem de novos agentes antifúngicos.

3.9.1 Preparação da suspensão padronizada de microrganismo

Para o preparo das suspensões padronizadas de *C. albicans*, o microrganismo foi cultivado em ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi®) por 24 horas a 37°C. A seguir, uma alçada de *C. albicans* foi semeada em caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®), e incubado por 18 horas a 37°C.

Após o período de crescimento, uma estimativa do número de células em suspensão foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm referente a células de levedura, com densidade óptica entre 0,350-0,380, que indicam um número aproximado de 1×10^7 células/mL. Após a padronização, foi realizado os ensaios microbiológicos.

3.9.2 Avaliação da inibição do crescimento microbiano

O ensaio de inibição do crescimento microbiano visa quantificar a morte celular de *C. albicans* em condições desfavoráveis de crescimento em meio contendo, por exemplo, o peptídeo antifúngico 0WHistatina-5 livre e encapsulado nos lipossomas produzidos. Para isso, em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 100 µL da solução de lipossomas encapsulados com concentração de 80 µM do peptídeo 0WHistatina-5, juntamente com 100 µL da suspensão padronizada do microrganismo. Para o controle negativo de crescimento foi adicionado a suspensão padronizada do microrganismo juntamente com o agente antifúngico fluconazol, 64 µg/mL, e para o controle positivo de crescimento foi adicionado somente caldo Sabouraud Dextrose juntamente com a suspensão de microrganismo. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C pelos períodos 2, 4, 24, 48, 72 e 96 horas.

A cada período os tubos foram retirados da estufa e a viabilidade celular determinada utilizando 20 µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo). Após adição, os tubos foram novamente incubados a 37°C por 30 minutos, tempo necessário para redução do MTT. Este sal possui coloração amarela quando dissolvido em solução aquosa e sofre redução quando em contato com células vivas, produzindo cristais de coloração púrpura insolúvel no meio aquoso, que se depositam no fundo do recipiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos, e o sobrenadante retirado e descartado, restando no fundo dos tubos somente os cristais, que foram dissolvidos em 500 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A solução de 500 µL de DMSO foi transferida para tubos de ensaio e o volume final completado para 2000 µL. Após agitação dos tubos para solubilização, o conteúdo foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm, e a viabilidade celular das células de *C. albicans* calculada (GARRIDO et al, 2015).

3.10 Análise estatística

Os resultados dos testes de caracterização dos lipossomas apresentados no item 4.4 foram submetidos a Teste-f de hipótese e em seguida foi realizado Teste-t para comparação entre duas médias. Foram avaliadas as médias de tamanho médio obtidas para as três formulações quando não encapsuladas com 0WHistatina-5 e quando encapsuladas com 0WHistatina-5. As médias foram analisadas aos pares, e comparadas entre as duas técnicas de obtenção dos lipossomas, extrusão e sonicação. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% e o software utilizado foi o Excel 2016.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Síntese do peptídeo 0WHistatina-5

Para a síntese do peptídeo 0WHistatina-5 foi utilizada resina Wang, já acoplada com o primeiro aminoácido da sequência, tirosina (Y), seguindo da extremidade C-terminal para a N-terminal, como mostrado na Tabela 1. A escala inicial da síntese foi de 0,56 mmol, com massa de resina de 250 mg e grau de substituição de 0,76 mmol/g.

A síntese foi realizada manualmente seguindo a sequência normal de aminoácidos. O último aminoácido a ser acrescentado no peptídeo 0WHistatina-5 foi o aminoácido triptofano (W), com a intenção de conferir ao peptídeo emissão de fluorescência, a fim de ser detectado em estudos posteriores por meio de técnicas de espectroscopia UV-vis e de fluorescência.

Ao final da síntese a resina foi desprotegida com 20% piperidina/DMF, clivada e purificada. As massas aproximadas das peptidilresinas, assim como a massa aproximada obtida após clivagem e purificação podem ser encontradas na Tabela 3, junto com o rendimento final da síntese.

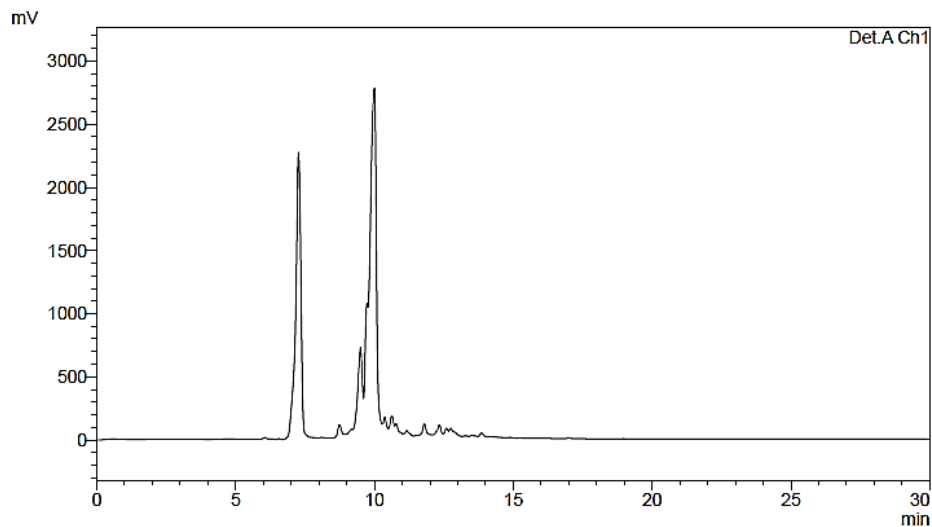
Tabela 3 - Massas obtidas após processo de síntese, clivagem e purificação, juntamente com rendimento final da síntese.

Peptídeos	Massa peptidilresina (g)	Massa após clivagem (mg)	Massa após purificação (mg)	Rendimento
0WHistatina-5	1,325	300	100	33,3%

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

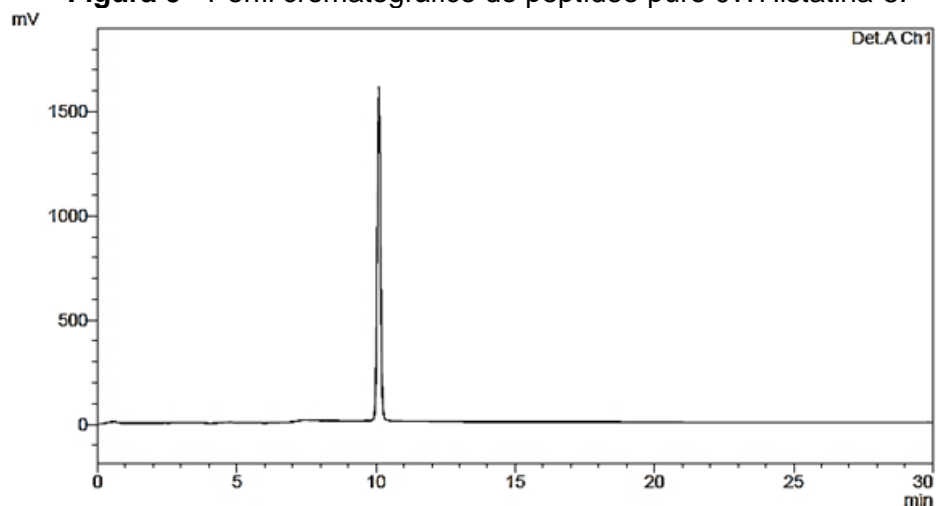
Após o processo de purificação dos peptídeos, através HPLC, nas condições descritas na seção 3.2 obteve-se um produto liofilizado com mais de 96% de grau de pureza. O cromatograma do peptídeo bruto e após purificação em coluna de Fase Reversa C-18, está apresentado, respectivamente, nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 bruto.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro 0WHistatina-5.

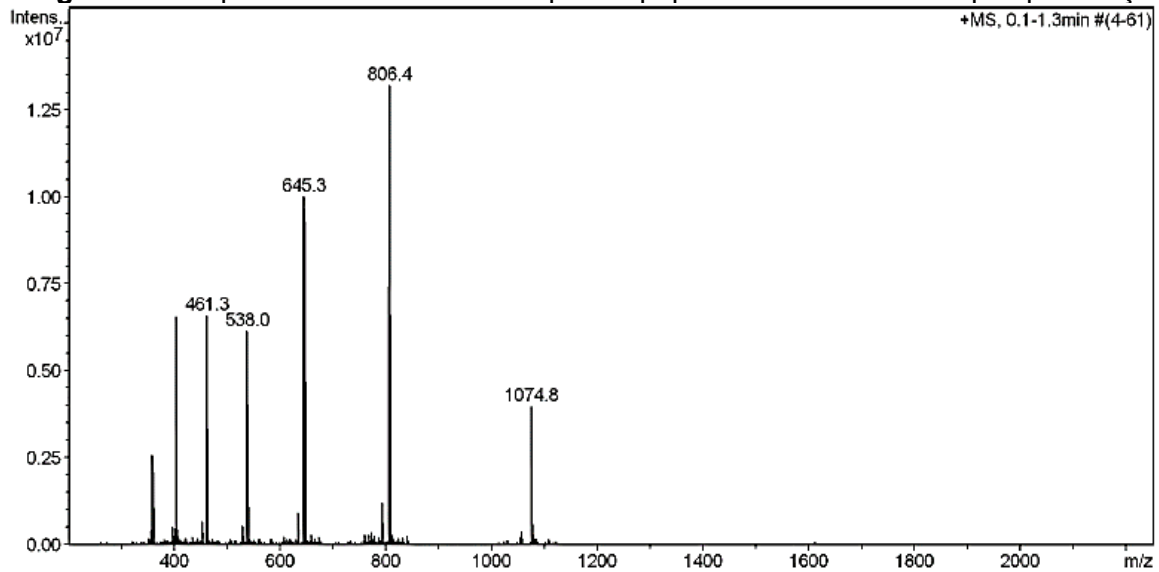


Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Com relação a caracterização do peptídeo, feita por espectrometria de massas, os resultados mostraram valores coerentes com o teórico esperado, conforme pode ser visto na Figura 10.

A massa molecular para o peptídeo 0WHistatina-5 é de 3225,5 g/mol, pode ser observado o pico de 1074,8 referente a $Z=+3$, assim como 806,4 ($Z=+4$), 645,3 ($Z=+5$), 538,0 ($Z=+6$) e 461,3 ($Z=+7$), todos relacionados com a massa teórica calculada para este peptídeo, confirmando sua obtenção.

Figura 10 - Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 após purificação.



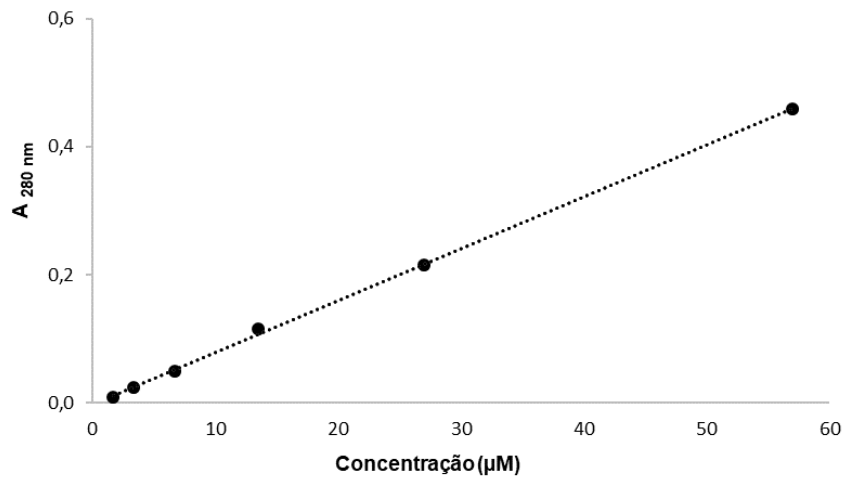
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

4.2 Curva analítica do peptídeo 0WHistatina-5

Para o desenvolvimento deste projeto, foi de grande importância a elaboração das curvas aqui apresentadas pois, por meio delas, foi possível calcular a concentração do peptídeo 0WHistatina-5 apenas conhecendo seu valor de absorvância ou máximo de fluorescência. Como a maioria dos métodos utilizados se baseiam em medidas espectrofotométricas ou espectrofluorimétricas, nas quais era somente conhecido esses valores, a curva padrão possibilitou o cálculo das concentrações por meio da equação da reta gerada.

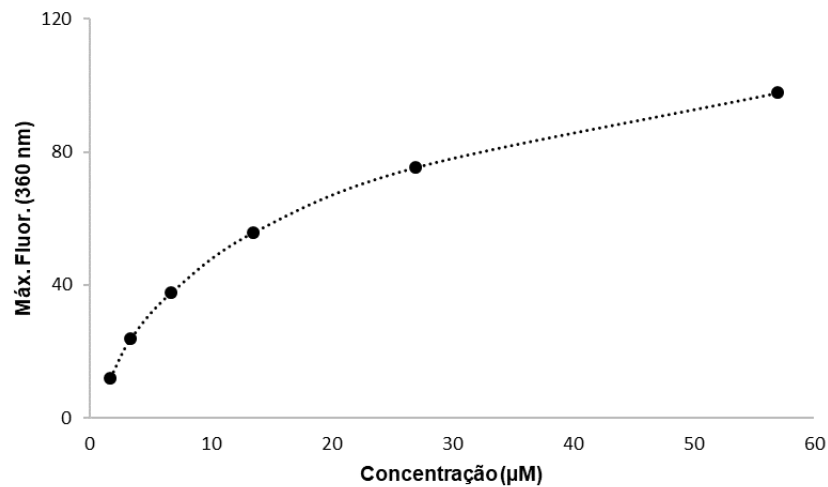
A equação da reta para a curva padrão do peptídeo em solução tampão Tris HCl, 10mM, pH 7,4, traçada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm, é igual a $y = 0,0081x - 0,0022$, com $R^2 = 0,9995$, como visto na Figura 11. Já na Figura 12, está demonstrada a curva padrão traçada em espectrofluorímetro em solução tampão Tris HCl, 10mM, pH 7,4, com excitação em 280 nm, e emissão máxima de fluorescência em 360 nm.

Figura 11 - Curva padrão para OWHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4, traçada em espectrofotômetro.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 12 - Curva padrão para OWHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4, traçada em espectrofluorímetro.

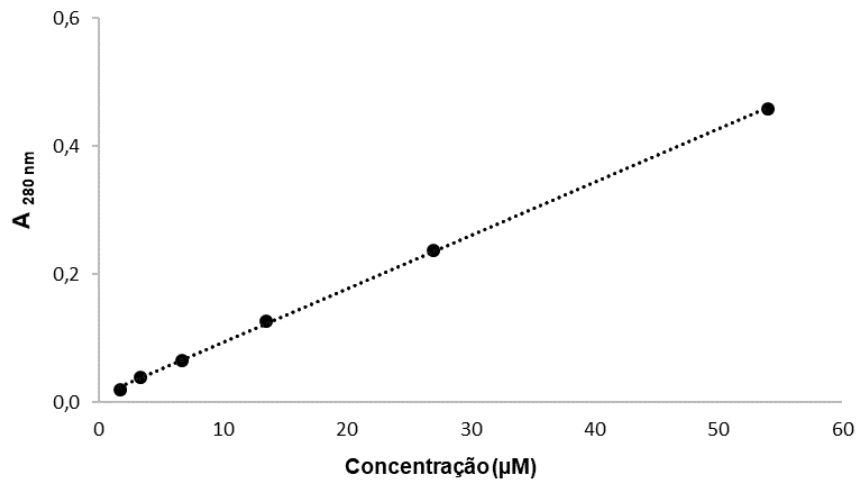


Fonte: elaborado pela autora, 2017.

A metodologia desenvolvida para a determinação da eficiência de encapsulação do peptídeo nos lipossomas requer, em uma de suas etapas, a ruptura das vesículas com o solvente orgânico metanol. Este solvente promove o rompimento da bicamada lipídica dos lipossomas, e o extravasamento do seu conteúdo interior. Neste caso, seria necessário a determinação da concentração do peptídeo dissolvido em metanol por meio de uma leitura de fluorescência.

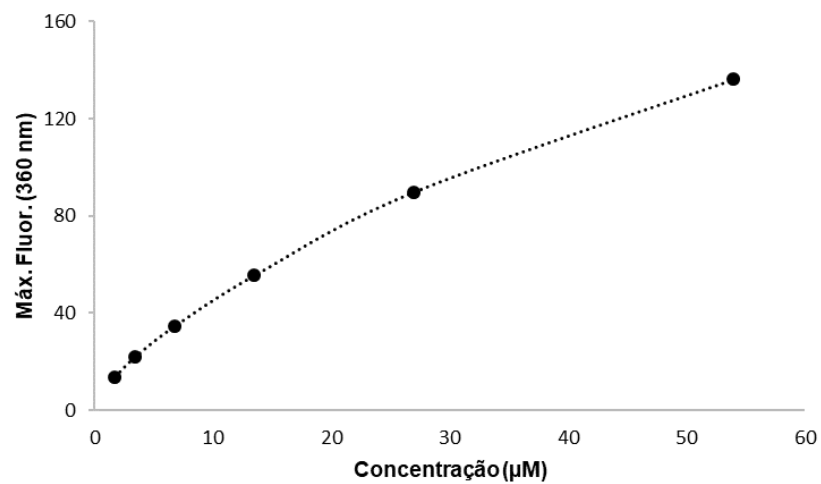
Para isso, também foi necessário a elaboração de uma curva padrão do peptídeo 0WHistatina-5 em metanol. Assim, a equação da reta que permitiu o cálculo da concentração do peptídeo quando dissolvido em metanol, traçada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm, de acordo com o observado na Figura 13, é igual a $y = 0,0084x + 0,0092$ com $R^2 = 0,9997$. A Figura 14 mostra a curva padrão traçada em espectrofluorímetro, com o peptídeo 0WHistatina-5 dissolvido em metanol, a excitação foi em 280 nm com emissão máxima de fluorescência em 360 nm.

Figura 13 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em metanol, traçada em espectrofotômetro.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 14 - Curva padrão para 0WHistatina-5 em metanol, traçada em espectrofluorímetro.



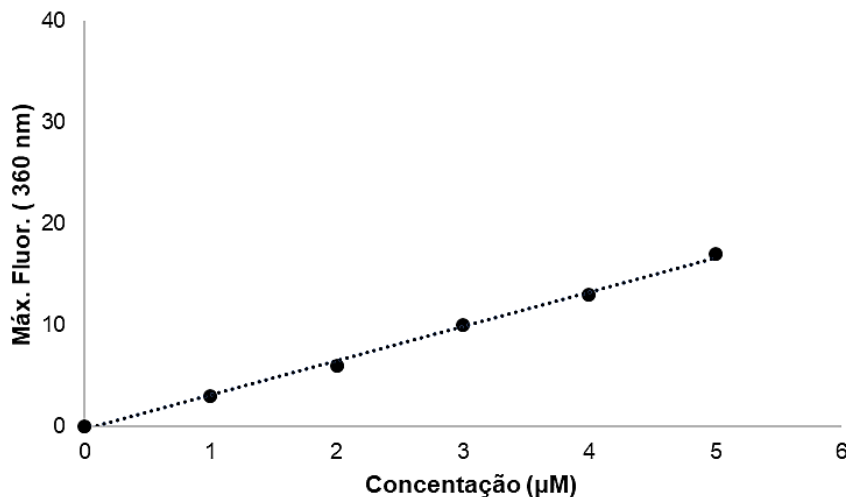
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Para as curvas obtidas em espectrofluorímetro, observa-se uma não linearidade dos pontos, isso porque a emissão de fluorescência está relacionada com a concentração da substância em questão, aumentando linearmente até certo ponto e após este ponto há ocorrência de um efeito denominado “quenching”. Neste efeito ocorre o apagamento do sinal de fluorescência quando a substância está em concentrações elevadas, isto pode ser observado nas duas curvas padrões, iniciando o efeito em concentrações superiores a 6,75 μM .

Assim, sabendo da existência do “quenching”, foi possível determinar a faixa de concentração do peptídeo OWHistatina-5 onde não era observado esse efeito. Então, uma nova curva padrão foi traçada, utilizando concentrações deste peptídeo pertencentes a este intervalo de linearidade. Desse modo, a curva padrão em espectrofluorímetro foi repetida com mais pontos em seu intervalo linear, como pode ser visto na Figura 15 e 16.

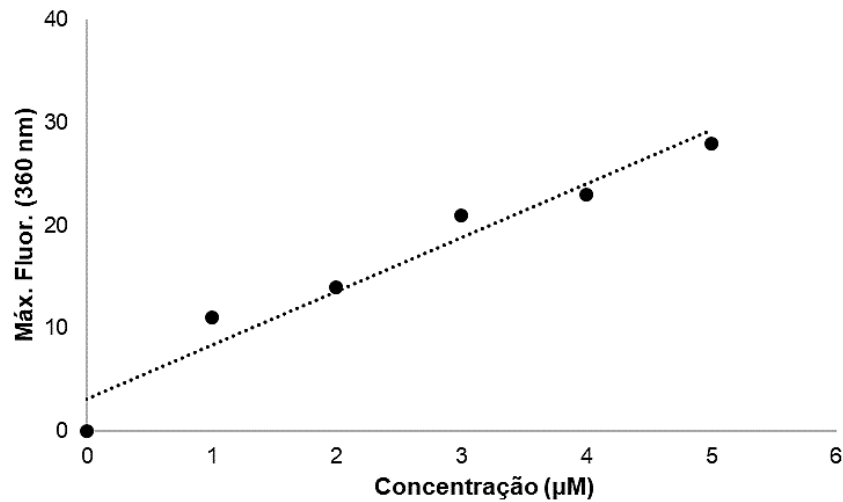
A equação da reta para a curva traçada em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4 foi igual a $y=3,4x-0,3333$ com $R^2=0,9974$ e para a curva traçada em metanol foi igual a $y=5,2286x+3,0952$ com $R^2=0,9514$.

Figura 15 - Faixa linear, em espectrofluorímetro, para as concentrações de OWHistatina-5 em solução tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 16 -Faixa linear, em espectrofluorímetro, para as concentrações de OWHistatina-5 em metanol.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

As concentrações de peptídeo utilizadas para os experimentos estiveram sempre dentro dessa faixa linear, referente a concentrações de 1,69 até 6,75 µM, ou seja, máximo de fluorescência, em 360 nm, entre 0,00 até 37,5 para que não ocorresse o efeito “quenching”.

A equação da reta, obtida para as curvas traçadas, está em sua forma reduzida, ou seja, na forma $y=ax+b$. Esta equação expressa uma função entre x e y , isto é, as duas variáveis possuem uma relação de dependência. Assim, o coeficiente angular (a) representa a inclinação da reta em relação ao eixo x e o coeficiente linear (b) representa o valor numérico por onde a reta passa no eixo y .

Sendo assim, ao se comparar a Figura 11 com a Figura 15, das duas curvas traçadas em solução tampão, percebe-se que o valor do coeficiente angular para a curva da Figura 11 é de 0,0081 enquanto o coeficiente angular para a curva da Figura 15 é de 3,4. Isto indica que, para valores menores de x tem-se maior variação de y para a curva da Figura 15. O que indica que a técnica de fluorescência é mais sensível do que a espectrofotometria, pois consegue detectar com mais precisão quantias menores de peptídeo na amostra.

O mesmo é observado para as Figuras 13 e 16, para as duas curvas traçadas em metanol. O coeficiente angular para a curva da Figura 13 é de 0,0084 enquanto que para a curva da Figura 16 é de 5,2286. Ou seja, em metanol também é observado o mesmo efeito que em solução tampão, sendo a técnica de espectrofluorimetria mais

sensível do que a espectrofotometria. Assim, devido a maior sensibilidade e precisão em pequenas concentrações, que a técnica de espectrofluorimetria foi a principal utilizada neste trabalho para a detecção do peptídeo 0WHistatina-5.

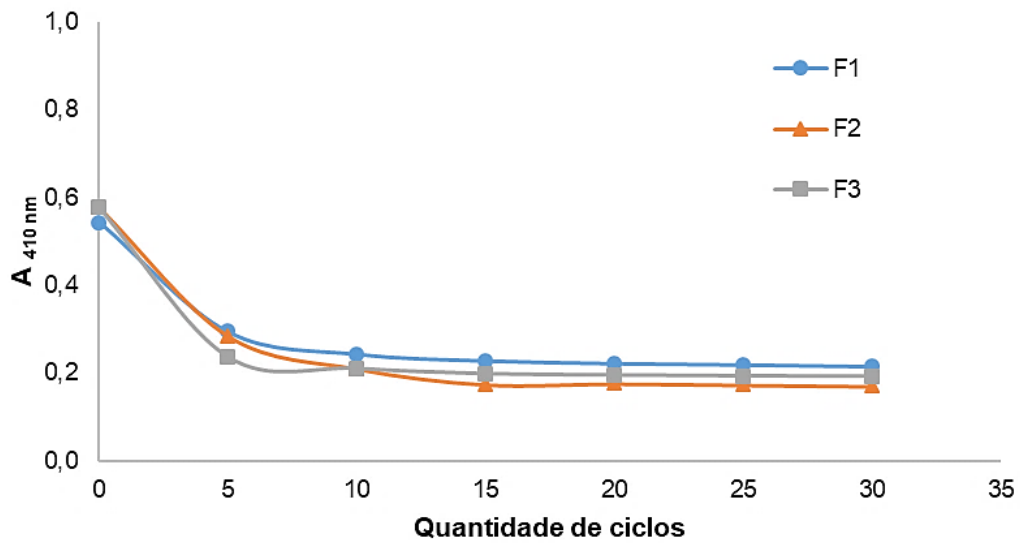
4.3 Monitoramento do preparo dos lipossomas

Após a hidratação do filme lipídico, obteve-se uma solução de vesículas multilamelares (MLV's). Estas vesículas são caracterizadas por possuírem tamanhos variados e mais de uma bicamada lipídica concêntrica, compondo uma solução heterogênea. Para a conversão dos MLV's em vesículas unilamelares grandes (LUV's), há a necessidade da utilização de algumas técnicas, como extrusão e sonicação. Por esse motivo, a quantidade de ciclos de extrusão e o tempo de sonicação ideais para a obtenção das vesículas foram monitorados. A leitura da turbidez em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm, permite observar a formação dos lipossomas à medida que o valor da absorbância diminui.

Assim, a cada 5 ciclos de extrusão uma leitura foi feita, até se observar a estabilidade dos valores de absorbância, como pode ser visto na Figura 17.

A formulação F1 composta por DPPC e Chol, apresentou a quantidade mínima de 15 ciclos de extrusão para que os lipossomas fossem formados. As formulações F2 e F3 também apresentaram esta mesma quantidade de ciclos. Assim, a adição de PEG na formulação F2 e de POPG em F3 não alteraram a quantidade de 15 ciclos observados como mínimo na formulação F1, que não possui nenhum desses componentes. Ao se adicionar PEG e POPG para a formulação desses lipossomas não se observa dificuldade em sua formação, pois necessitam da mesma quantidade mínima de ciclos que a formulação F1, que não contém esses componentes.

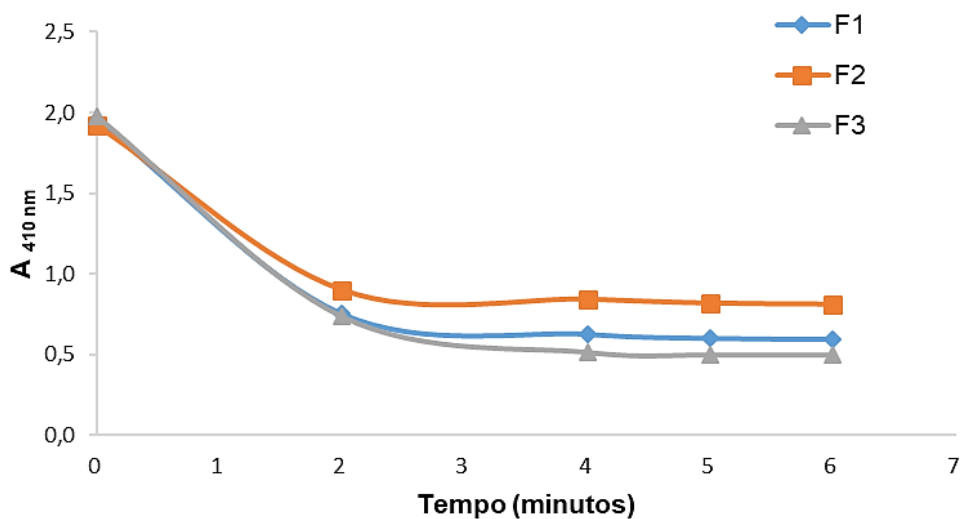
Figura 17 - Efeito da quantidade de ciclos de extrusão nas diferentes composições de lipossomas.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Para a técnica de sonicação, a monitoração foi feita após cada 2 minutos de sonicação como mostra a Figura 18, e a estabilização dos valores de absorvância foi alcançado no tempo de 4 minutos, para todas as formulações, igual observado para a técnica de extrusão. Da mesma forma que na técnica de extrusão, a adição de PEG e POPG nas formulações F2 e F3 não alteraram o tempo mínimo de 2 minutos de sonicação, observado para formulação F1 que não contém esses componentes.

Figura 18 - Efeito do tempo de sonicação nas diferentes composições de lipossomas.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Apesar de se estabilizarem no mesmo tempo de sonicação e na mesma quantidade de ciclos de extrusão, os valores de absorvância para os quais ocorreu estabilidade foram diferentes. Conforme a Figura 17, as leituras se estabilizaram em valores próximos de 0,2 enquanto que conforme Figura 18, as leituras se estabilizaram em valores que variam de 0,5 a 0,8. Este fato está relacionado com a diferença entre as técnicas utilizadas. Na técnica de extrusão, o tamanho dos lipossomas é facilmente controlado por membranas de policarbonato, com poros de tamanhos já conhecidos. Este fator faz com que a quantidade de lipossomas de mesmo tamanho seja maior e a solução final mais homogênea, por isso a estabilidade das absorvâncias são mais baixas e próximas do mesmo valor para as formulações F1, F2 e F3. Já na técnica de sonicação, é mais difícil controlar ou pré-definir o tamanho das vesículas, sendo necessário vários ajustes com relação a potência média do equipamento, amplitude e tempo de sonicação. Por esse motivo, mesmo as soluções finais de lipossomas estando homogêneas, existe uma pequena porção de vesículas em tamanhos diferentes da maioria ou ainda a presença de MLV's, o que explica os valores de absorvância maiores e diferentes entre as formulações.

Mesmo assim, o tempo mínimo de 4 minutos de sonicação e quantia de 15 ciclos de extrusão puderam ser utilizados para a obtenção de lipossomas para todas a formulações propostas, o que facilitou o processo de produção.

4.4 Caracterização física dos lipossomas

A caracterização físico-química de nanocarreadores, como os lipossomas, é essencial para se conhecer seu comportamento, o que garantirá a qualidade do sistema produzido além de conferir segurança para seu uso futuro em meio biológico. Para os lipossomas, a técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering – “DLS”) é a mais utilizada e determina o tamanho médio dos lipossomas, índice de polidispersividade (IPD), além do potencial zeta. A medida do tamanho médio dos lipossomas está relacionada com o movimento de suas flutuações brownianas. O equipamento concentra um feixe de luz laser na solução dos lipossomas, e um detector de fótons mede a intensidade do deslocamento da radiação incidente, dependendo do tempo das flutuações. A equação de Stokes-Einstein relaciona a escala de tempo das flutuações das vesículas com o diâmetro

hidrodinâmico equivalente da partícula, tornando possível o cálculo de seu tamanho médio (BERBEL MANAIA et al., 2017).

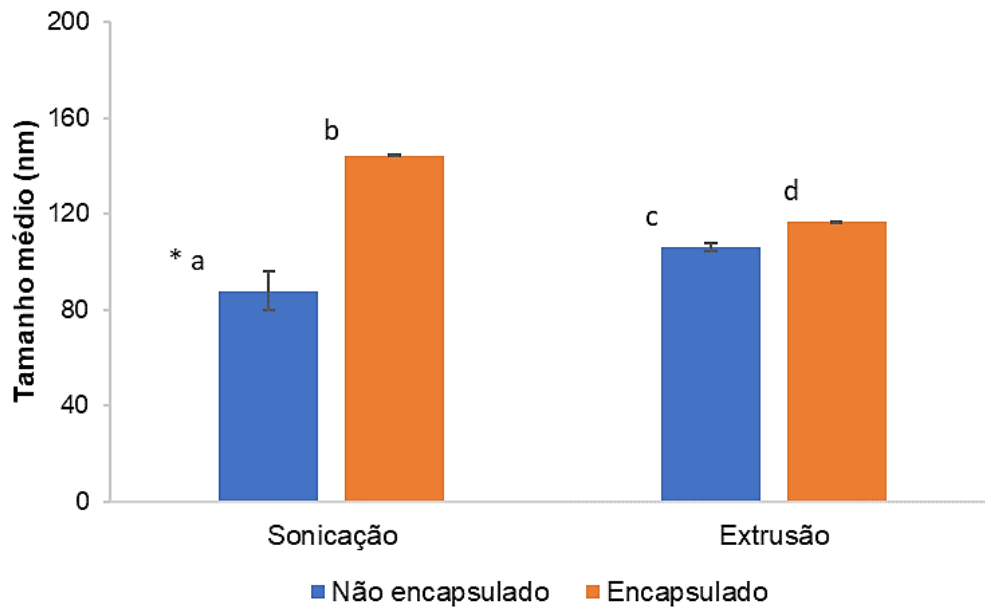
A medida do índice de polidispersividade (IPD) está relacionada com a medida de tamanho médio, e indica a homogeneidade da solução de lipossomas. Valores abaixo de 1 são requeridos para nanocarreadores e são aceitos valores na faixa de 0,01 até 0,7 quando para lipossomas. Quando menor o valor de IPD, mais homogênea é a solução de lipossomas analisadas (BARRETO, 2014). Já o potencial zeta, representa a diferença de potencial entre a superfície da vesícula e o potencial elétrico da solução, e pode ser usado para prever a estabilidade da solução dos lipossomas. Assim, para conhecer as características dos sistemas lipossomais produzidos, todas as formulações desenvolvidas foram analisadas em DLS, os resultados podem ser vistos nas Tabelas 4, 5 e 6 e Figuras 19, 20 e 21.

Tabela 4 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F1 obtidos por extrusão e sonicação.

	Lipossomas não encapsulados			Lipossomas encapsulados		
	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
Extrusão	106,2 ± 1,7	0,128	-49,9 ± 1,2	116,6 ± 0,31	0,081	-43,0 ± 0,5
Sonicação	88,1 ± 8,1	0,371	-51,4 ± 8,9	144,3 ± 0,35	0,255	-48,6 ± 0,2

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 19 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F1, obtidos por extrusão e sonicação.



*As médias diferem pelo Teste-T para variâncias não equivalentes. As amostras foram avaliadas sob o nível de significância de 5%.

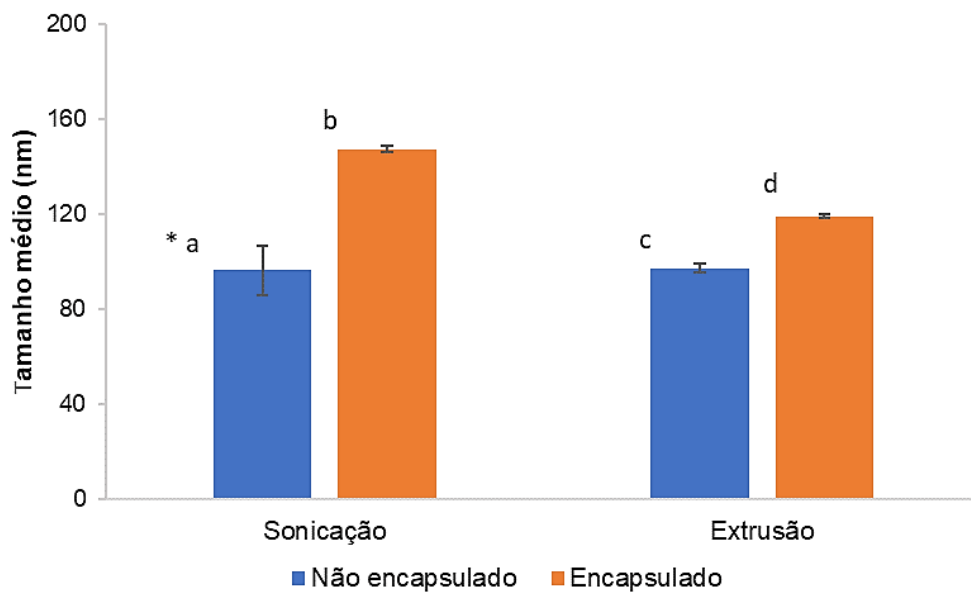
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 5 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F2 obtidos por extrusão e sonicação.

	Lipossomas não encapsulados			Lipossomas encapsulados		
	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
Extrusão	97,1 ± 1,8	0,099	-38,5 ± 2,3	119,2 ± 0,8	0,087	-42,2 ± 0,9
Sonicação	96,4 ± 10,4	0,382	-56,4 ± 2,3	147,5 ± 1,45	0,124	-51,5 ± 1,79

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 20 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F2, obtidos por extrusão e sonicação.



*As médias diferem pelo Teste-T para variâncias não equivalentes. As amostras foram avaliadas sob o nível de significância de 5%.

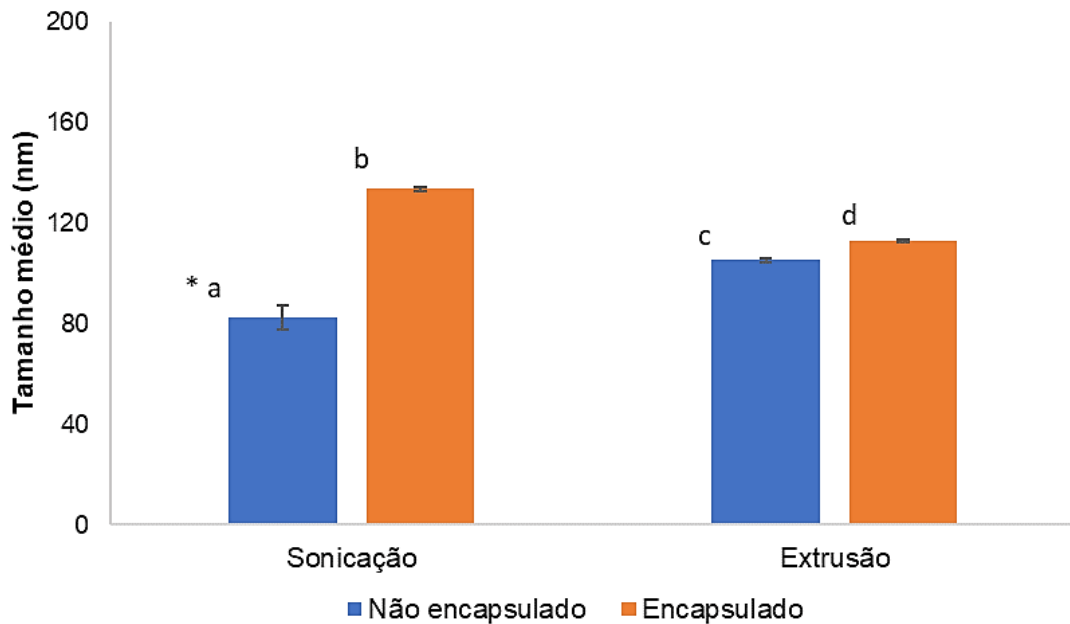
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 6 - Média e desvio padrão para os valores de tamanho médio, IPD e potencial zeta de F3 obtidos por extrusão e sonicação.

	Lipossomas não encapsulados			Lipossomas encapsulados		
	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
Extrusão	105,1 ± 0,8	0,113	-42,7 ± 1,9	112,6 ± 0,5	0,068	-47,4 ± 0,5
Sonicação	82,2 ± 4,8	0,287	-56,5 ± 3,7	133,6 ± 0,9	0,241	-52,3 ± 8,1

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 21 - Comparação do tamanho médio dos lipossomas F3, obtidos por extrusão e sonicação.



*As médias diferem pelo Teste-T para variâncias não equivalentes. As amostras foram avaliadas sob o nível de significância de 5%.

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Para a formulação F1, o tamanho médio dos lipossomas não encapsulados e sonicados foi de 88,1 nm, ou seja, menor do que para os lipossomas não encapsulados obtidos por extrusão, que apresentaram 106,2 nm. Isto também pode ser observado ao se comparar os tamanhos para os lipossomas não encapsulados, obtidos por extrusão e sonicação, das formulações F2 e F3, nas tabelas 5 e 6 respectivamente. Este fato está relacionado com a técnica de obtenção dos lipossomas. Por possuir poros de 100 nm de diâmetro, a membrana de policarbonato utilizada no equipamento extrusor proporcionou tamanho mais definido aos lipossomas, garantindo que, ao final do processo de extrusão, o tamanho médio final estivesse na faixa de 100 nm. Já na sonicação, não há uma maneira de se controlar ou prever o tamanho médio final dos lipossomas, que pode variar à medida que se altera amplitude, tempo de sonicação e potência do equipamento. Por utilizar de alta energia, a técnica de sonicação produz lipossomas de tamanhos menores, como visto nos resultados apresentados (NEW, 1990).

Houve aumento do tamanho médio dos lipossomas encapsulados, ao se comparar com os lipossomas não encapsulados. Este aumento é significativo, já que uma média difere da outra por meio do teste estatístico realizado. Isto ocorreu para todas as formulações produzidas, por extrusão e sonicação. Destaca-se o aumento em F2 de 97,2 nm quando submetida a extrusão sem o peptídeo 0WHistatina-5, e após a sua adição apresentou tamanho de 119,2 nm. Para a formulação F3 obtida por sonicação, o tamanho médio antes da adição do peptídeo era de 82,2 nm, passando a 133,6 nm quando incorporado 0WHistatina-5.

Os lipossomas obtidos por sonicação apresentaram maior aumento quando comparados com os lipossomas obtidos por extrusão. Para a técnica de extrusão o aumento foi na faixa de 20%, enquanto para a técnica de sonicação foi na faixa de 50%. O aumento de tamanho esperado, para peptídeos encapsulados em lipossomas, é de 30% a 90% e indica que o peptídeo 0WHistatina-5 está incorporado nos lipossomas, contido no compartimento aquoso interior por ser uma molécula hidrossolúvel (MOHAN; MCCLEMENTS; UDENIGWE, 2016; NII; ISHII, 2005).

O potencial zeta dos lipossomas produzidos é negativo, para todas as formulações preparadas. O valor de potencial zeta se tornou menos negativo para todas as formulações obtidas por sonicação após a incorporação do peptídeo. 0WHistatina-5 é um peptídeo de carga total bastante positiva que interfere na carga final dos lipossomas, tornando-os menos negativos. Para as formulações obtidas por

extrusão não se observa este efeito em F2 e F3. O lipídeo POPG utilizado na formulação F3 é aniônico, e confere maior quantidade de cargas negativas à bicamada externa do lipossoma que pode ser menos influenciado pela carga positiva da OWHistatina-5. O potencial zeta é um dado importante na caracterização dos lipossomas pois, como já dito anteriormente, pode ser utilizado para prever a estabilidade físico-química das vesículas. O valor padrão de potencial zeta utilizado para isto é de ± 30 mV, ou seja, valores maiores que +30 mV e menores que -30 mV estão relacionados com boa estabilidade dos sistemas produzidos (BERBEL MANAIA et al., 2017; EBRAHIMI et al., 2015; SATO et al., 2017). Como F1, F2 e F3, produzidos por extrusão e sonicação, possuem potencial zeta na faixa de -40 a -50 mV, são então, formulações estáveis tanto brancas quanto incorporadas com OWHistatina-5.

O valor de IPD determina a distribuição de tamanho dos lipossomas produzidos. Valores de IPD que variam de 0,05 a 0,08 indicam amostras monodispersas e com distribuição monomodal, indicando a presença de vesículas em uma só faixa de tamanho médio (BARRETO, 2014). Valores de IPD nesta faixa foram encontrados para todas as formulações obtidas por extrusão, contendo o peptídeo OWHistatina-5. Para F1 temos 0,081 e para F2 e F3 temos, respectivamente, 0,087 e 0,068. Assim, os lipossomas presentes nestas soluções apresentam, em sua totalidade, uma só faixa de vesículas, com tamanhos médios nos valores de 116,6 nm, 119,2 nm e 112,6 nm, respectivamente.

Valores intermediários de IPD, na faixa de 0,08 a 0,7 são considerados ideais e indicam homogeneidade da amostra analisada, porém, podem indicar a presença de vesículas em outras faixas de tamanho. Valores de IPD de 0,371, 0,382 e 0,287 foram encontrados para F1, F2 e F3, respectivamente, obtidos por sonicação sem o peptídeo OWHistatina-5. No entanto, quando submetidos a sonicação com o peptídeo, os valores de IPD caíram para 0,255, 0,124 e 0,241, respectivamente. A adição do peptídeo às formulações tornou-as mais homogêneas, mesmo efeito que também é visto para os lipossomas obtidos por extrusão, com IPD para F1 de 0,128 sem o peptídeo e de 0,081 com o peptídeo OWHistatina-5.

De forma geral, os parâmetros obtidos após caracterização dos lipossomas indicaram que as duas técnicas analisadas, extrusão e sonicação, produzem lipossomas de qualidade e aptas para a incorporação do peptídeo OWHistatina-5.

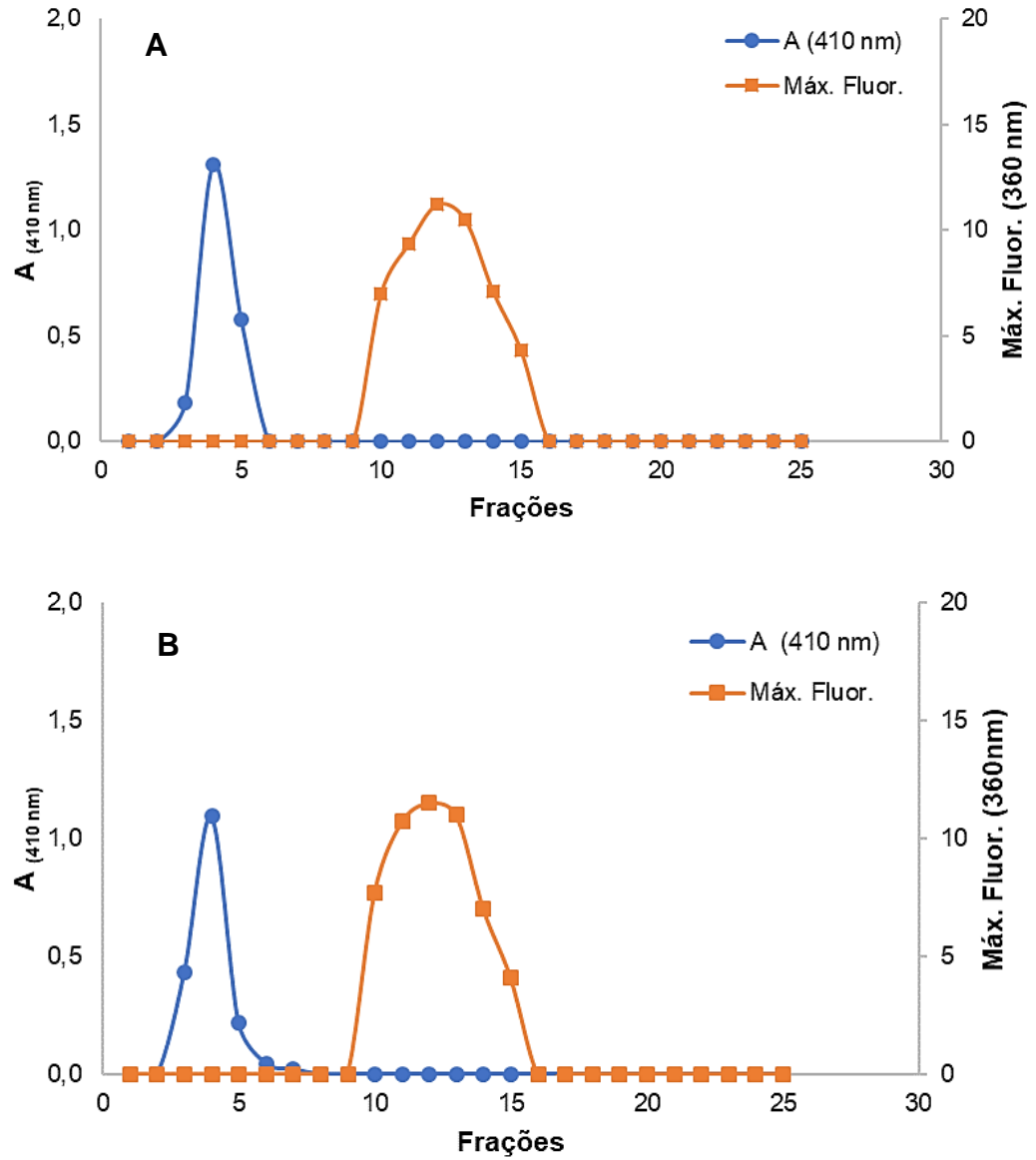
4.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação indica a quantidade do peptídeo 0WHistatina-5 que está incorporado aos lipossomas. Para que seja possível esta quantificação, é necessário um método que separe o peptídeo não encapsulado, dos lipossomas carregados com o peptídeo. Como já descrito na sessão 3.6, para promover esta separação foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão molecular em gel filtração, com uma resina Sephadex G-50 empacotada em coluna de vidro. A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a concentração final de peptídeo incorporado nos lipossomas, como será mostrado nas sessões 4.5.1 e 4.5.2.

4.5.1 Separação do peptídeo 0WHistatina-5 não encapsulado

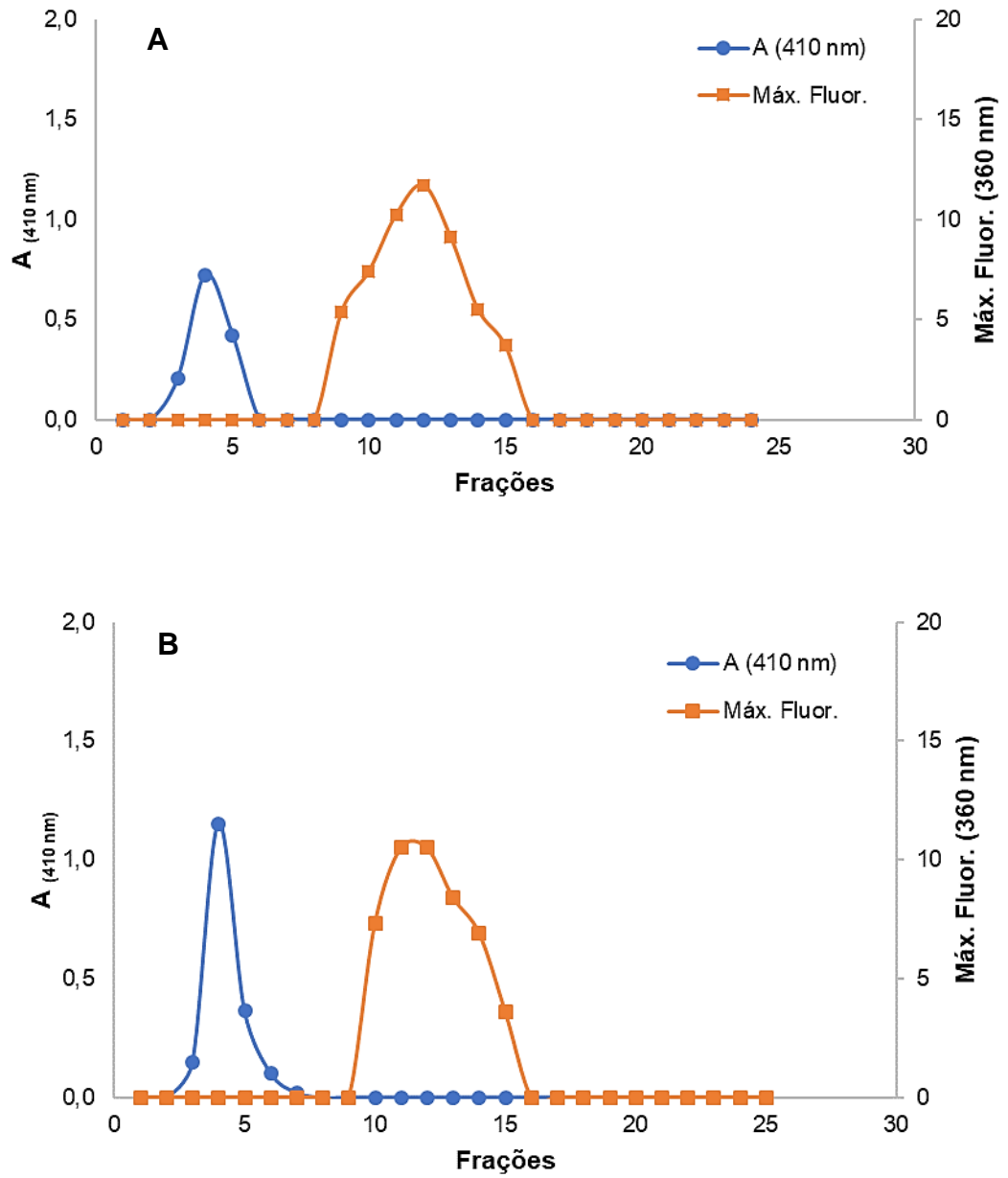
As Figuras 22 a 24 mostram o perfil de eluição dos lipossomas e peptídeo livre após passagem por coluna Sephadex G-50.

Figura 22 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F1 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.



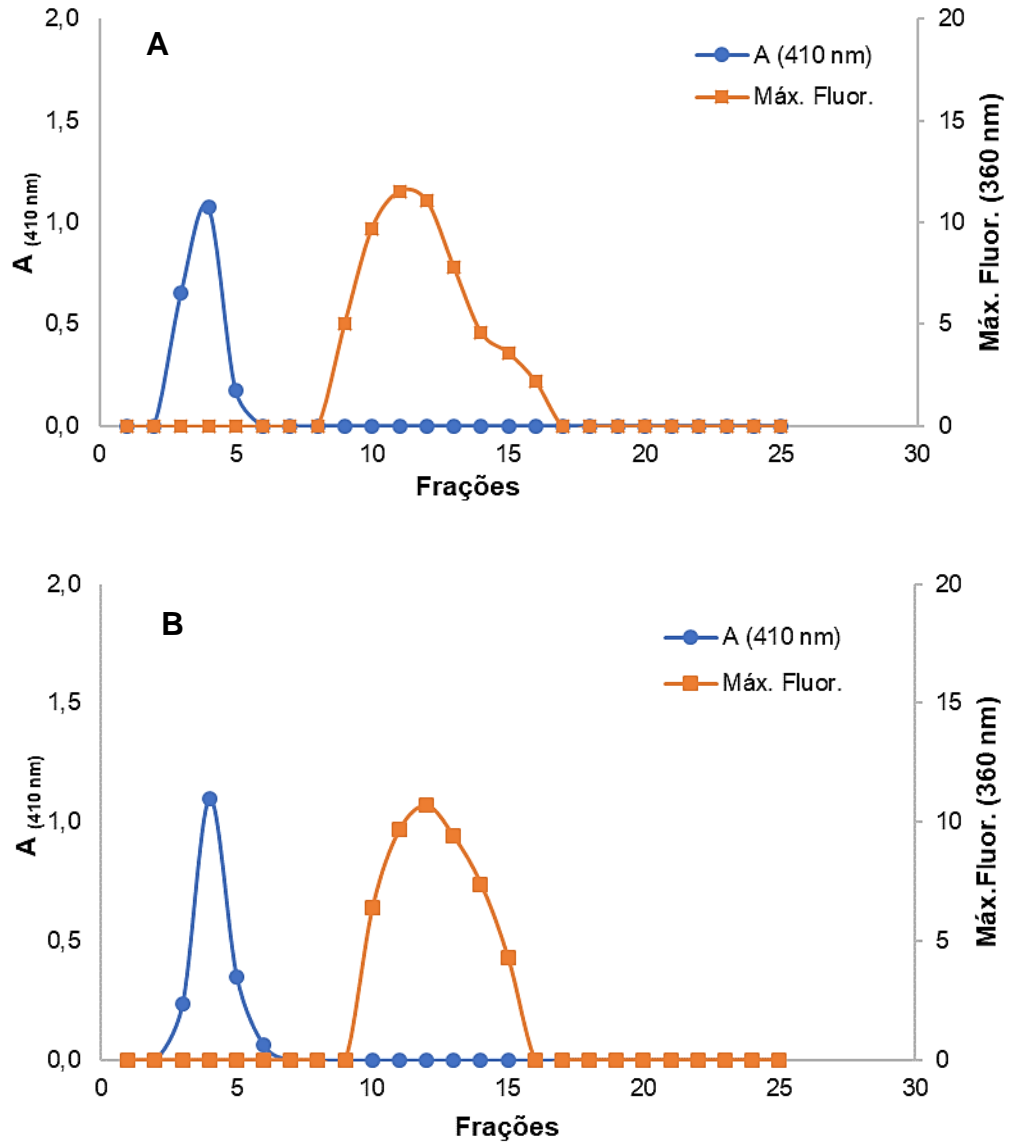
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 23 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F2 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 24 - Perfil de eluição utilizando coluna Sephadex G-50, para os lipossomas F3 obtidos por (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

De acordo com o observado nas figuras acima, as frações 3, 4 e 5 correspondem à saída dos lipossomas encapsulados com 0WHistatina-5. Neste caso não há diferença entre as técnicas de extrusão e sonicação, os lipossomas saem da coluna sempre no mesmo tempo. As frações de 9 a 15 correspondem à saída do peptídeo livre para os lipossomas obtidos por extrusão (Figuras A 22, 23 e 24). E as frações de 9 a 14, à saída do peptídeo livre para os lipossomas obtidos por sonicação (Figuras B 22, 23 e 24). Há, então, uma fração a mais contendo peptídeo livre para a técnica de extrusão, fator que está relacionado com o cálculo da eficiência de encapsulação apresentado nas Tabelas 7 e 8. Esta fração a mais está relacionada com a maior porcentagem de eficiência de encapsulação encontrada para os lipossomas obtidos por sonicação.

As diferentes técnicas de obtenção dos lipossomas, sonicação e extrusão, não interferiram no perfil de eluição, que se manteve o mesmo. Isto indica que a metodologia de cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-50 foi capaz de separar o peptídeo livre dos lipossomas encapsulados. As diferentes formulações produzidas também não interferiram no perfil de eluição dos lipossomas. A adição de PEG e POPG em F2 e F3 respectivamente, não influenciou no tempo de retenção dos lipossomas na coluna, sendo o mesmo para todas as formulações produzidas.

4.5.2 Cálculo da eficiência de encapsulação (EE)

As frações contendo lipossomas foram reunidas e liofilizadas, após, foram rompidas com 3 mL de metanol e lidas em espectrofluorímetro. No processo de monitoramento do peptídeo livre por espectrofluorímetro não houve nenhuma fração com máximo de fluorescência acima da faixa linear estabelecida (Figuras 15 e 16), ou seja, todas estão livres do efeito “quenching”. Para o cálculo da eficiência de encapsulação foi utilizada a equação 1, e as concentrações iniciais de 0WHistatina-5, adicionadas antes do processo de encapsulação, assim como os valores obtidos após liofilização e resuspensão em metanol das amostras, estão demonstradas nas Tabelas 7 e 8 abaixo. Após liofilização e resuspensão com metanol, a solução resultante foi diluída para que não houvesse efeito “quenching”. Dessa forma a diluição foi de 450 μ L de metanol para 50 μ L da amostra, assim para cálculo da

concentração final utilizou-se a equação da reta da curva padrão em metanol para a faixa linear (Figura 16) e considerou-se a diluição realizada.

Tabela 7 - Valores utilizados para a realização do cálculo de eficiência de encapsulação (EE), de acordo com a equação 1, para lipossomas obtidos por extrusão.

Extrusão				
Formulação	Concentração inicial (μM)	Máx. de fluorescência (amostra diluída)	Concentração final (μM)	EE (%)
F1	79,0	10,4	14,0	17,7
F2	80,7	7,1	7,66	9,5
F3	80,0	8,4	10,1	12,7

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 8 - Valores utilizados para a realização do cálculo de eficiência de encapsulação (EE), de acordo com a equação 1, para lipossomas obtidos por sonicação.

Sonicação				
Formulação	Concentração inicial 0WHistatina-5 (μM)	Máx. de fluorescência (amostra diluída)	Concentração final 0WHistatina-5 (μM)	EE (%)
F1	65,5	14,9	22,6	34,5
F2	62,8	7,1	7,7	12,2
F3	75,5	8,7	10,7	14,2

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

A eficiência de encapsulação para o peptídeo 0WHistatina-5 está abaixo de 50%. A adição de colesterol à todas as formulações preparadas, pode ter dificultado a encapsulação. Este componente impede a transição de fase das bicamadas lipídicas e as mantém sempre em um estado de fluidez intermediário, com tendência de ser mais rígida, o que dificulta a incorporação de moléculas (ROY et al., 2016).

No entanto, a EE foi maior para as formulações produzidas por sonicação, com o maior valor de 34,5% para F1. Esta formulação também apresentou a maior eficiência dentre as formulações obtidas por extrusão, com valor de 17,7%. Para F1, temos DPPC e colesterol na composição, DPPC possui T_m de 42°C, se considerarmos a temperatura ambiente como 25°C, esta bicamada se encontra em sua fase gel e rígida. Mesmo assim, é a formulação que incorporou a maior quantia do peptídeo para as duas técnicas utilizadas. A ausência de outros componentes favoreceu a

incorporação do peptídeo, enquanto que a presença de PEG em F2 e de POPG em F3, dificultou a incorporação de OWHistatina-5 nos lipossomas. A eficiência de encapsulação para F3 foi maior se comparada com F2, sendo de 12,7% para extrusão e 14,2% para sonicação. A presença de POPG nesta formulação favorece a presença da bicamada na fase líquido cristalina e mais fluida, pois este lipídeo possui T_m de -2°C , favorecendo a incorporação do peptídeo. A menor EE foi para F2, que possui PEG em sua composição, por não ser um lipídeo este componente não apresenta T_m , mas não favoreceu a incorporação do peptídeo nos lipossomas. Porém, a presença deste componente aumenta a estabilidade físico-química dos lipossomas, como será visto nos resultados seguintes, e prolonga sua presença no organismo humano, por diminuir a captação das vesículas pelas células do sistema imunológico (RONDOITCH et al., 2016).

O resultado obtido para eficiência de encapsulação juntamente com o obtido para o tamanho médio dos lipossomas encapsulados com OWHistatina-5, sugere que o peptídeo está contido no compartimento interno aquoso do lipossoma (NII; ISHII, 2005). Isto porque se trata de uma molécula hidrossolúvel, com tendência para estar internalizado no lipossoma, provocando aumento do tamanho médio quando encapsulada e com baixa EE por apresentar dificuldade de vencer a bicamada lipídica apolar para se alocar no interior do lipossoma.

4.6 Estabilidade das formulações

As formulações produzidas foram armazenadas a temperatura de 4°C e 37°C . A temperatura de 4°C representa a condição usual de armazenamento de fármacos e outros compostos, antes do uso. Já a temperatura de 37°C representa a temperatura do ambiente fisiológico, como o corpo humano, mimetizando as condições do local no qual as formulações produzidas serão veiculadas. As Tabelas 9 a 11 e as Figuras de 25 a 31 abaixo indicam esses resultados.

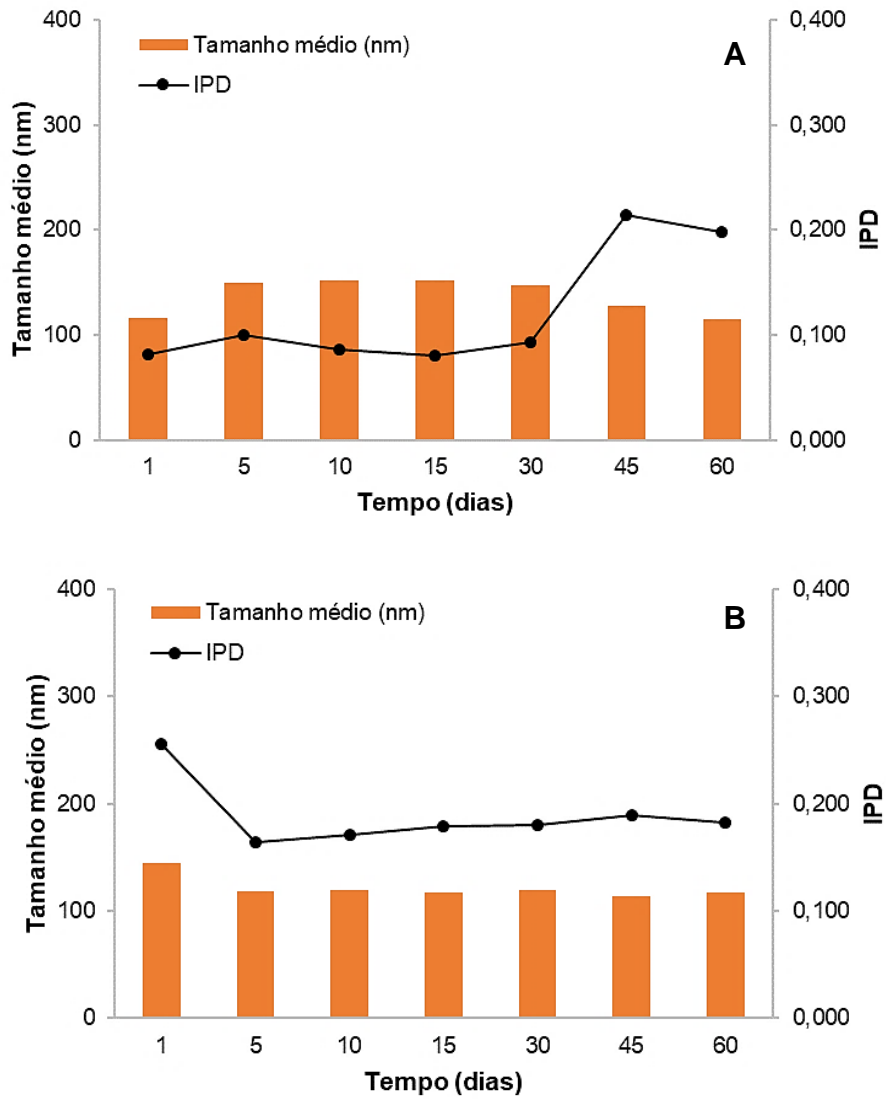
Tabela 9 - Potencial Zeta para formulação F1 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.

Potencial Zeta (mV)				
Tempo (dias)	Extrusão		Sonicação	
	4°C	37°C	4°C	37°C
1	-43,0±0,50	-48,6±0,20	-43,0±0,50	-48,6±0,20
5	-22,8±0,36	-30,8±1,31	-29,7±0,67	-29,5±0,23
10	-23,3±0,15	-31,8±0,85	-31,4±1,53	-30,2±0,38
15	-24,2±0,15	-33,1±0,91	-30,9±1,26	-29,9±0,90
30	-24,2±0,32	-33,2±0,30	-32,7±0,57	-27,9±0,70
45	-30,5±0,50	-28,5±0,86	-29,9±0,40	-21,7±0,25
60	-26,9±1,47	-27,1±0,70	-24,2±0,75	-24,9±0,12

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

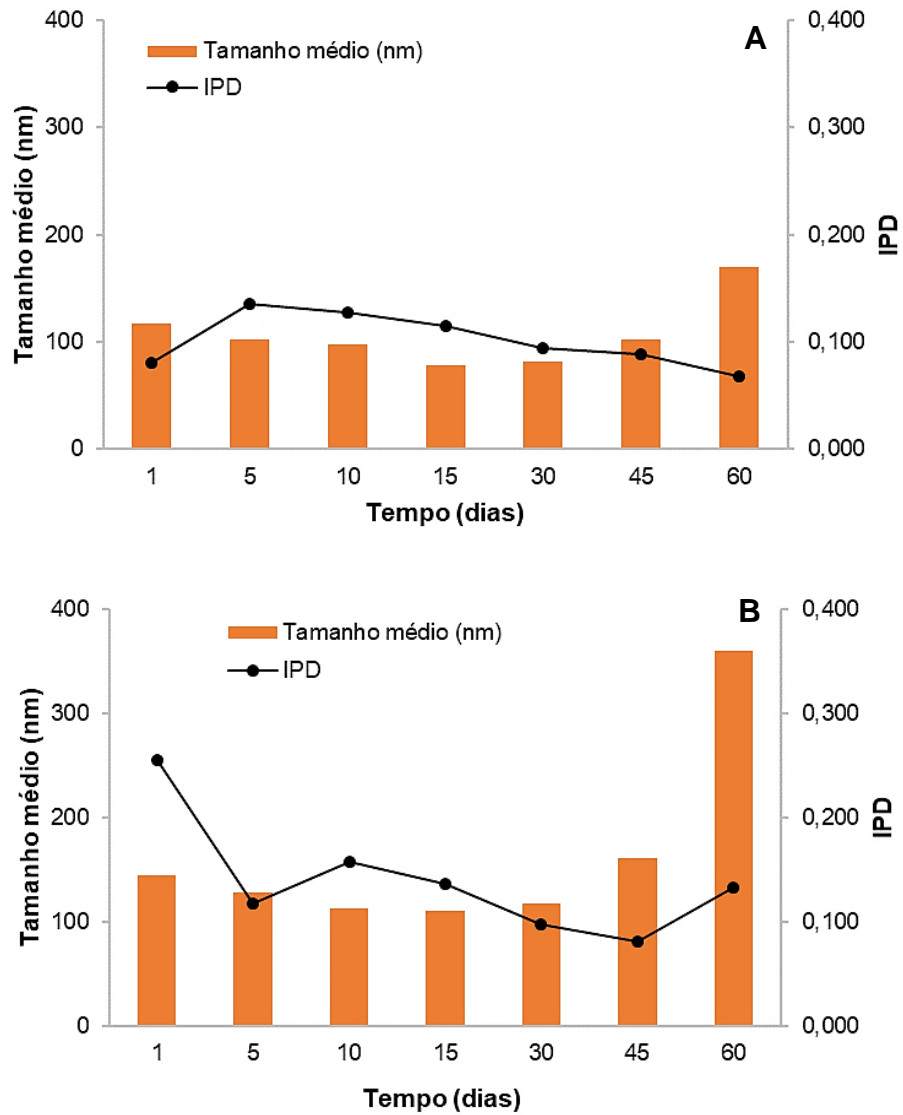
Os valores de potencial zeta para a formulação F1, mostram a perda de estabilidade com o aumento do tempo de armazenamento, para as duas temperaturas avaliadas. Isto porque valores de potencial zeta entre -30 mV e +30 mV são indicativos de instabilidade físico-química, e após 5 dias de armazenamento a 4°C, o valor inicial de -43,0 mV, para a técnica de extrusão, passou para -22,8 mV, e -29,7 mV para a técnica de sonicação. A 37°C também pode ser observado este efeito, que favorece a agregação, coagulação e floculação dos lipossomas (SATO et al., 2017).

Figura 25 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F1 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 26 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F1 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

De acordo com a Figura 25 B, houve pequenas alterações nos parâmetros de tamanho médio e IPD para a formulação F1, obtida por sonicação, armazenada a 4°C. Por esse motivo, a formulação F1, produzida por sonicação, apresentou melhor estabilidade do que a mesma formulação obtida por extrusão, que se manteve estável durante os 60 dias de experimento a 4°C. O armazenamento a 37°C foi mais prejudicial a F1, proporcionou muitas variações de tamanho médio e IPD ao longo do tempo, de acordo com o observado por (ÇELIK; SAĞIROĞLU; ÖZDEMİR, 2017).

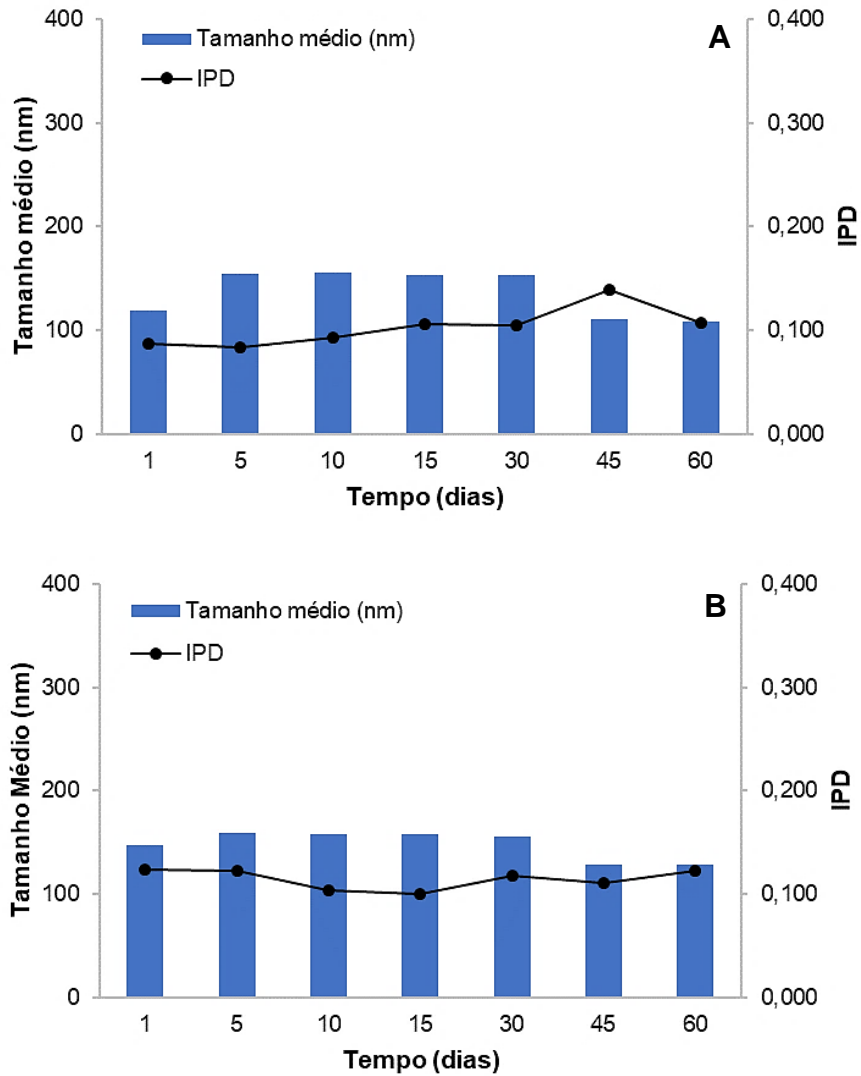
Os valores de potencial zeta, para F2, estão listados na Tabela 10. Assim como para F1, em F2 também há variação do potencial zeta logo após 5 dias de armazenamento nas duas temperaturas e para as duas técnicas de obtenção dos lipossomas, indicando há aumento da instabilidade dos lipossomas e agregação longo do tempo de armazenamento. Mesmo sendo indicativo de estabilidade físico química, o potencial zeta ele não deve ser analisado de forma isolada. Por esse motivo, os valores de tamanho médio e IPD para F2 estão nas Figuras 27 e 28.

Tabela 10 - Potencial Zeta para formulação F2 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.

Potencial Zeta (mV)				
Tempo (dias)	Extrusão		Sonicção	
	4°C	37°C	4°C	37°C
1	-42,2±0,90	-51,5±1,79	-42,2±0,90	-51,5±1,79
5	-22,8±0,61	-25,1±0,64	-25,8±3,91	-32,6±0,75
10	-23,2±0,06	-27,4±0,65	-25,6±0,38	-32,2±0,56
15	-24,3±0,50	-26,3±0,51	-25,8±0,91	-32,3±0,55
30	-25,6±0,47	-26,2±0,46	-27,6±1,73	-30,0±0,50
45	-24,7±0,47	-26,4±0,46	-28,8±0,40	-26,1±0,36
60	-34,5±2,65	-26,9±0,53	-23,8±0,98	-27,7±1,20

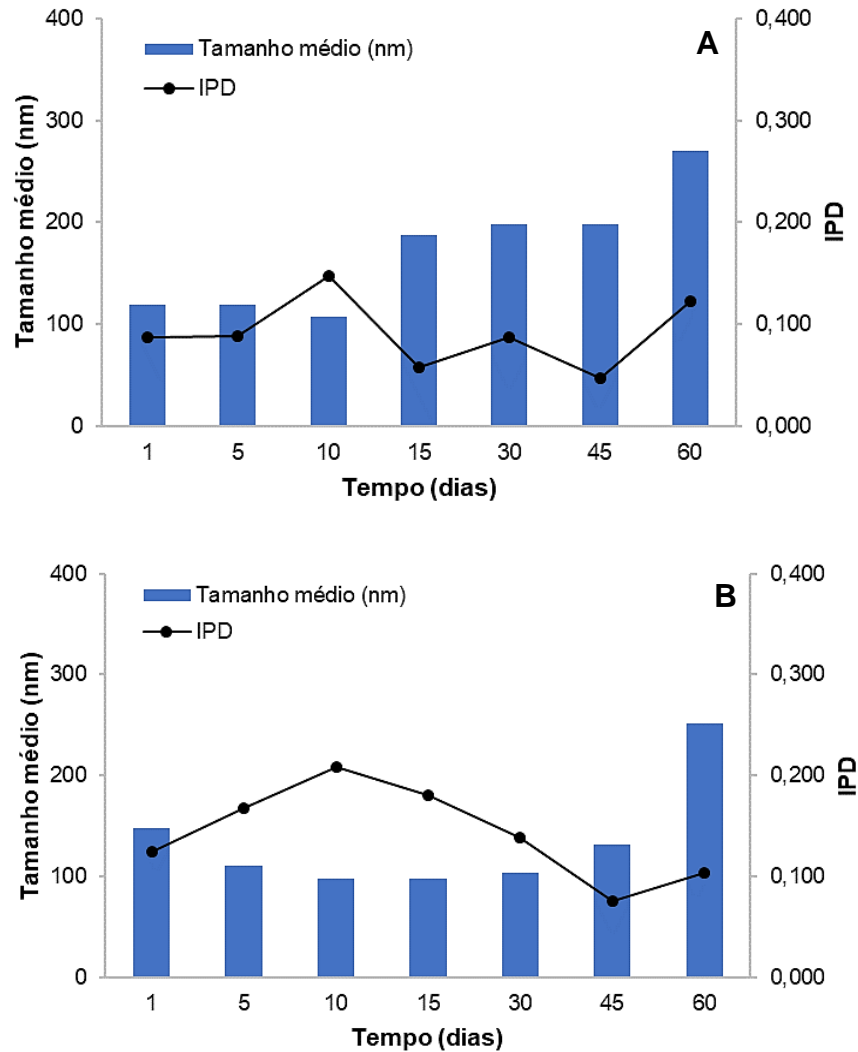
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 27 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F2 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 28 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F2 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

A temperatura de 4°C favorece o armazenamento dos lipossomas, para sonicação e extrusão. Observa-se que até 30 dias os valores de tamanho médio e IPD não apresentaram grandes variações, e após 45 dias nota-se pequena variação de tamanho médio, de aproximadamente 160 nm para 130 nm para sonicação e de 160 nm para 110 nm para extrusão, com aumento do IPD. Já a temperatura de 37°C, causa maiores variações nos parâmetros, há diminuição do tamanho médio logo após os primeiros 15 dias, seguido de grande aumento do tamanho médio, sendo de 250 nm para sonicação e 270,5 nm para extrusão. Há também muitas variações no IPD. Juntos, esses parâmetros indicam que a temperatura de 37°C não conserva os

lipossomas, que passam a se agregar devido ao grande aumento de ambos os parâmetros analisados.

F1 e F2 apresentaram melhores parâmetros e melhor estabilidade ao serem armazenadas a 4°C, e ao serem obtidas por sonicação. No entanto, F2 possui PEG em sua composição, que segundo alguns estudos favorece a manutenção da estabilidade das vesículas, assim como visto na Figura 26 B (RAI, et al, 2017). Mesmo não favorecendo a eficiência de encapsulação, como discutido na sessão 4.5.2, este componente auxilia na manutenção da estabilidade da formulação, que se mantém íntegra por mais tempo, quando armazenada quando a 4°C.

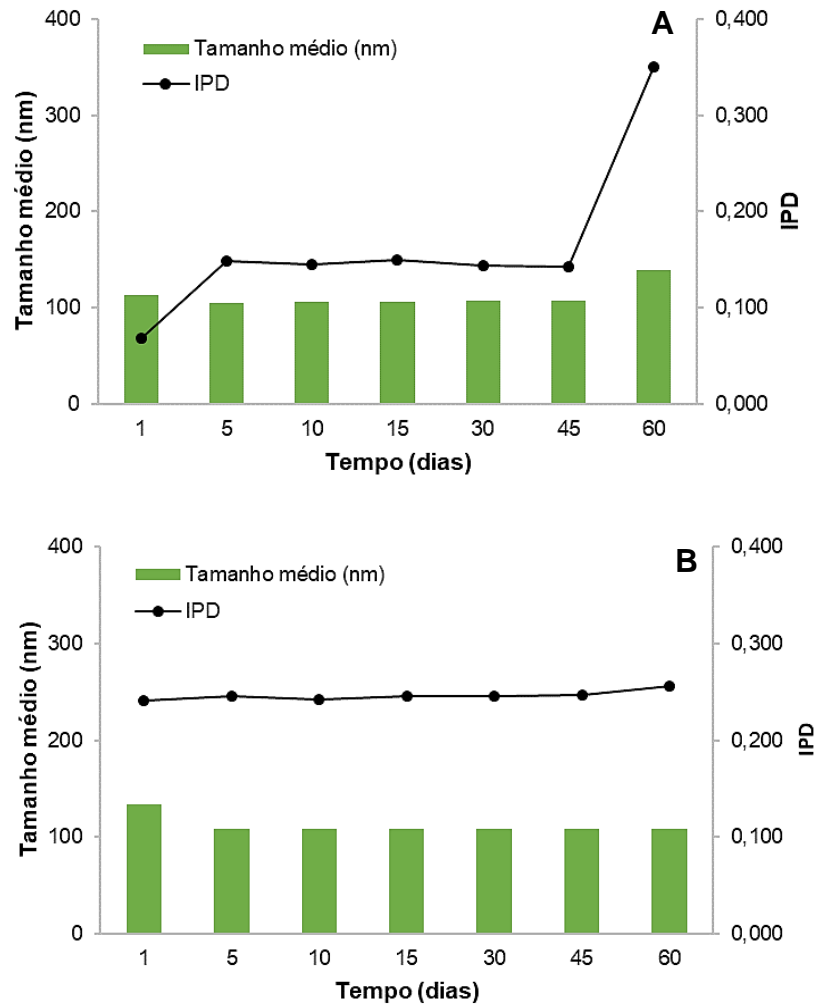
Os valores de potencial zeta para F3 estão na Tabela 11. Diferente do que foi observado até aqui, mesmo havendo pequenas variações nas medidas, a maioria se mantém acima de -30 mV. Portanto, F3 demonstra melhor estabilidade físico-química, com menor possibilidade de agregação dos lipossomas ao longo do tempo.

Tabela 11 - Potencial Zeta para formulação F3 armazenados a 4°C e 37°C por 60 dias.

Potencial Zeta (mV)				
	Extrusão		Sonicação	
Tempo (dias)	4°C	37°C	4°C	37°C
1	-47,4±0,50	-52,3±8,10	-47,4±0,50	-52,3±8,10
5	--33,0±0,80	-32,4±0,47	-42,6±1,08	-44,2±0,21
10	-33,5±0,80	-31,8±1,40	-44,8±1,17	-41,0±0,61
15	-33,2±1,29	-33,4±1,05	-45,2±1,05	-37,9±2,01
30	-33,0±1,56	-33,6±1,44	-47,3±0,35	-32,4±1,50
45	-32,0±1,05	-28,1±1,00	-47,7±0,81	-37,0±0,46
60	-48,8±1,48	-29,6±1,32	-44,3±1,13	-27,4±0,86

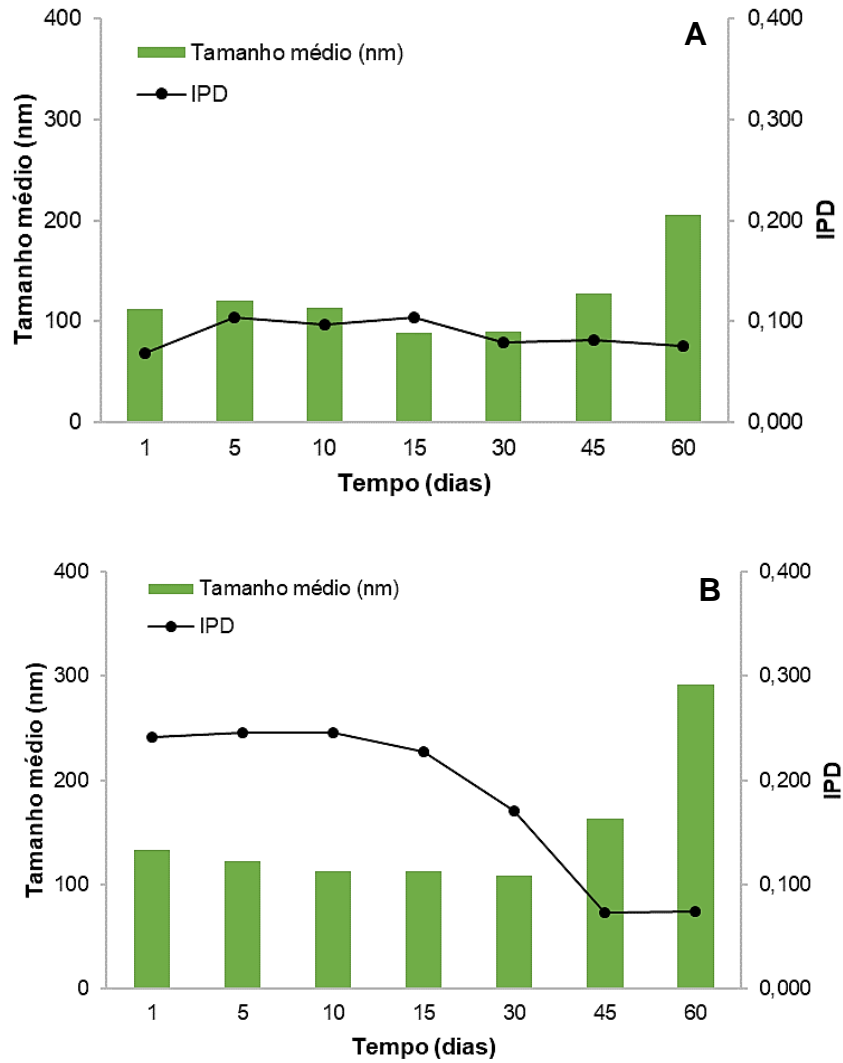
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 29 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F3 armazenada à 4°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 30 - Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (IPD) para F3 armazenada à 37°C, em (A) extrusão e (B) sonicação.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Para o armazenamento a 4°C, técnica de sonicação, Figura 29 B, observa-se a manutenção do tamanho médio na faixa de 110 nm por 60 dias. O valor de IPD também não se altera, indicando boa homogeneidade da formulação durante todo o período de armazenamento. F3 obtida por sonicação, é a formulação mais estável se comparada com F1 e F3, no mesmo grupo. No armazenamento a 37°C, Figura 30 há o mesmo efeito visto em F1 e F2, diminuição do tamanho médio até 15 dias com posterior aumento. Há perda da estabilidade e agregação ao final do tempo de 60 dias. Já para a Figura 29 B a diminuição é mais lenta, acontecendo até 30 dias, também seguido de aumento. O IPD sofre quebra ao longo dos 60 dias, isto indica que apesar do tamanho médio estar variando, a homogeneidade da solução aumenta. Com 292 nm, o IPD é de 0,070, ou seja, o tamanho aumentou e difere bastante do inicial, mas a solução de lipossomas está monodispersa, sugerindo fusão dos lipossomas presente na solução.

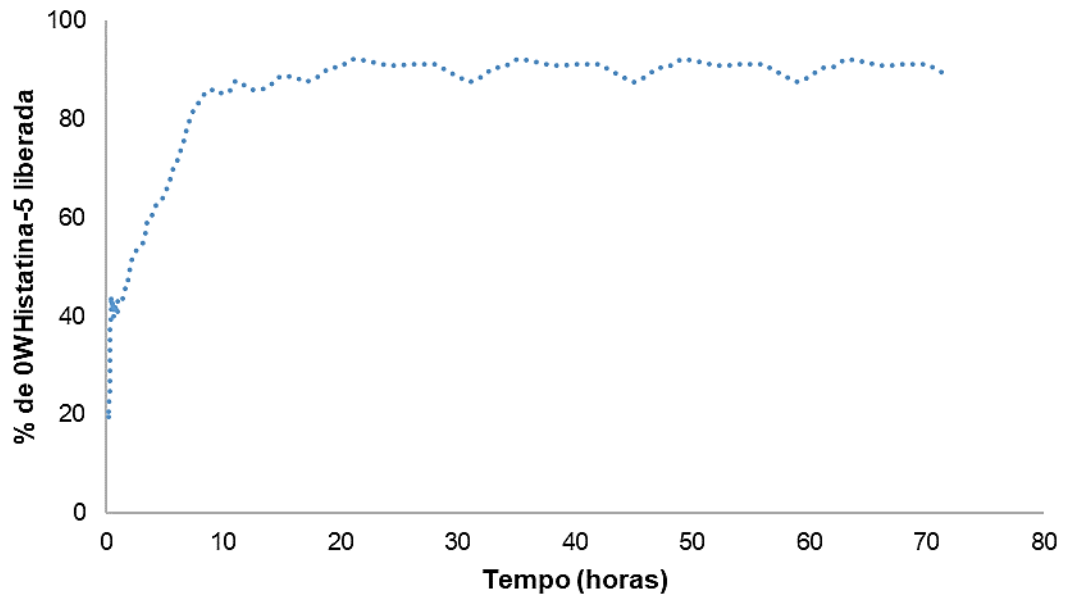
De modo geral, a melhor temperatura para armazenamento é a de 4°C, para todas as formulações produzidas. A técnica de preparação com melhor estabilidade é a de sonicação. A composição lipídica dos lipossomas está relacionada com uma melhor ou pior estabilidade, pois a melhor estabilidade foi para F3, que possui POPG em sua composição. Este componente permite uma melhor fluidez à bicamada lipídica, que pode gerar melhor adaptação ao longo do período de estocagem. Também confere maior quantidade de cargas negativas a bicamada, o que dificulta a agregação dos lipossomas. F2, que contém PEG na composição, também apresentou melhor estabilidade que F1, que possui somente DPPC e colesterol. Assim, mesmo a adição de compostos interferindo na capacidade de encapsulação dos lipossomas, estes melhoram a estabilidade das formulações, permitindo seu armazenamento para posterior uso.

Os lipossomas obtidos pela técnica de sonicação apresentaram melhor estabilidade do que os lipossomas obtidos por extrusão, principalmente quando armazenados a 4°C. A alta energia utilizada no processo de formação dos lipossomas, quando obtidos por sonicação, pode resultar em maior durabilidade da formulação, aumentando sua estabilidade.

4.6 Cinética de liberação

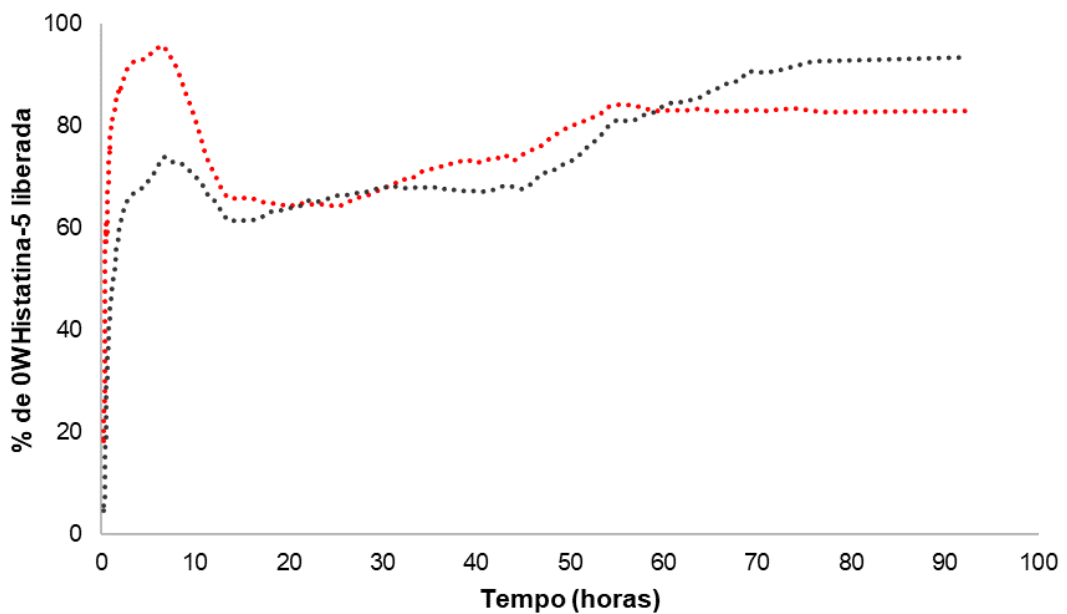
Como controle para o experimento, uma solução concentrada de 0WHistatina-5 foi adicionada a membrana de diálise e o tempo de liberação foi monitorado, conforme Figura 30. As Figuras 31 a 33 mostram o perfil de liberação para F1, F2 e F3, respectivamente.

Figura 31 - Perfil de liberação para 0WHistatina-5 *in vitro*.



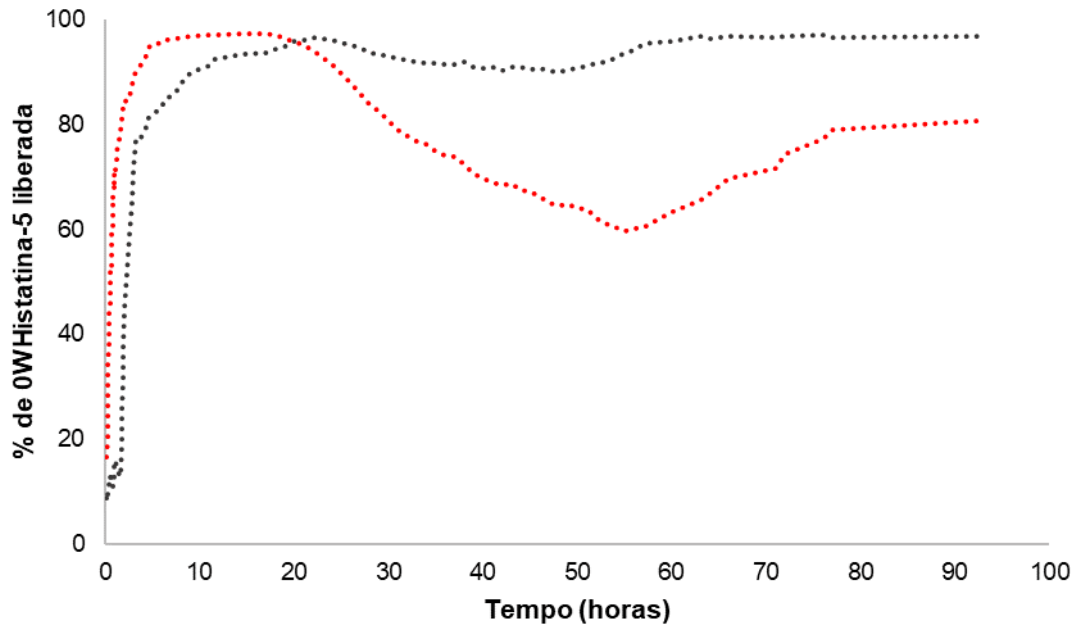
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 32 - Perfil de liberação *in vitro* para F1 encapsulada com 0WHistatina-5.



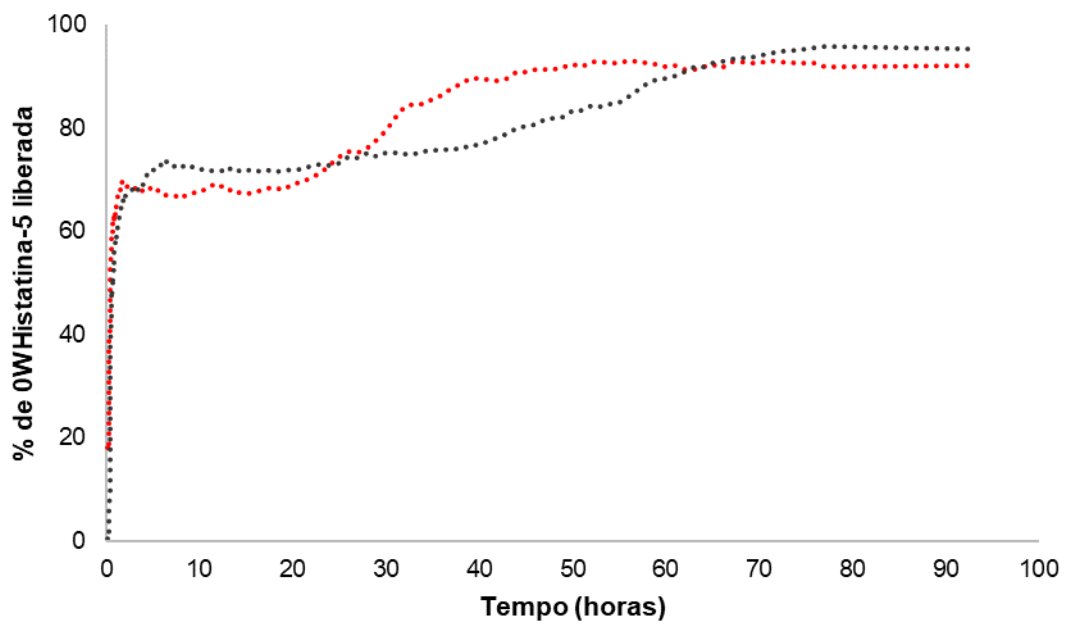
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 33 - Perfil de liberação *in vitro* para F2 encapsulada com 0WHistatina-5.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 34 - Perfil de liberação *in vitro* para F3 encapsulada com 0WHistatina-5.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

A Figura 31 mostra que a liberação total do peptídeo ocorre após 5 horas. Para F1, F2 e F3 (Figura 32 a 34), é observado pico de liberação no tempo de 5 horas, semelhante ao observado para o perfil de liberação do peptídeo livre. O perfil obtido indica a ocorrência de efeito “burst”, que se caracteriza pela grande quantidade de fármaco que é liberado nas primeiras 24 horas (HUANG; BRAZEL, 2001; LUAN et al., 2006). Este efeito é vantajoso, pois a liberação de grande quantidade do peptídeo OWHistatina-5 em curto período de tempo pode ser utilizada como dose de ataque para conter o crescimento de microrganismos momentos após sua aplicação no local de ação. Por se tratar de um sistema de liberação que visa aplicação tópica para tratamento das lesões bucais causada pela *C. albicans*, a liberação rápida e diretamente no local de ação, inibiria rapidamente a proliferação do microrganismo (HUANG; BRAZEL, 2001).

Para todas as formulações, os perfis observados para extrusão e sonicação foram semelhantes, e a utilização de técnicas distintas para a produção de lipossomas não interfere em sua cinética de liberação. O efeito burst observado nas primeiras 5 horas indica que o conteúdo liberado não está encapsulado nos lipossomas, ou que pode estar interagindo com sua superfície externa, conforme também observado por CALIENNI e colaboradores. Assim, o processo de liberação para esses lipossomas é considerado “bifásico”. Inicialmente há uma rápida liberação, seguida de queda que indica o equilíbrio do sistema de diálise devido a forças osmóticas, para em um segundo momento liberar a quantidade remanescente do peptídeo, lentamente, por 96 horas. A etapa de liberação lenta, está relacionada com o rompimento dos lipossomas, que desse modo conseguiria liberar o peptídeo contido em seu interior. (LOPES et al., 2012).

A cinética de liberação para nanocarreadores está relacionada com sua eficiência de encapsulação e estabilidade. Uma eficiência de encapsulação maior certamente irá resultar em um pico de liberação maior, principalmente se ocorrer efeito burst. (LUAN et al., 2006). A maior EE observada para F1 obtida por sonicação, pode ser confirmada em seu perfil de liberação (Figura 32), pois a segunda fase de sua liberação é maior do que para a mesma formulação obtida por extrusão. Assim, de forma geral, as formulações obtidas por sonicação, que possuem EE maior, também apresentam maior aumento em seu segundo momento no perfil de liberação.

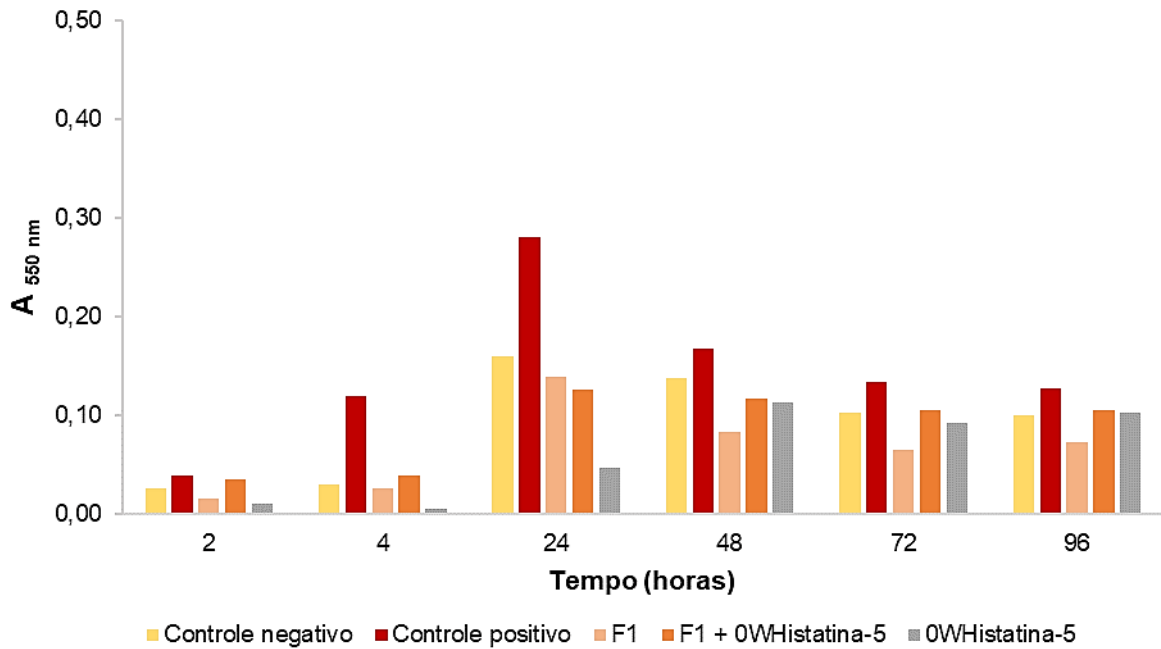
A formulação F2, contém PEG em sua formulação e se mostrou bastante estável ao se comparar com F1. A presença de PEG nos lipossomas contribui para sua estabilidade mas ainda assim existe a presença do efeito “burst”, diferente do observado experimentalmente em outros trabalhos, que quando adicionado PEG às formulações, houve ausência deste efeito (RAI et al., 2008; ZHOU; TAO; SHI, 2017). No entanto, é possível notar que a segunda fase de liberação para esta formulação é muito branda, comparada às outras formulações. Na Figura 33, principalmente na curva referente à liberação dos lipossomas preparados por sonicação, é possível notar que após o pico inicial de liberação, a porcentagem de liberação do peptídeo permanece praticamente constante até o tempo final do ensaio. Isso demonstra que o componente PEG desta formulação, dificulta o rompimento dos lipossomas e, conseqüentemente, liberação do mesmo ao meio.

Para F3, não é observado a queda referente ao equilíbrio, somente o aumento da liberação no tempo de 30 horas (Figura 34). F3 apresenta um perfil de liberação mais constante, mantendo estáveis os valores liberados ao longo do tempo, inclusive após a liberação do peptídeo em seu interior. Este resultado confirma que esta formulação é bastante estável, devido à adição de POPG, mesmo em pequenas quantidades, que também contribui para a melhora do perfil de liberação do peptídeo, o qual é liberado de maneira constante ao longo das 96 horas de ensaio.

4.7 Avaliação da atividade antifúngica da formulação F1

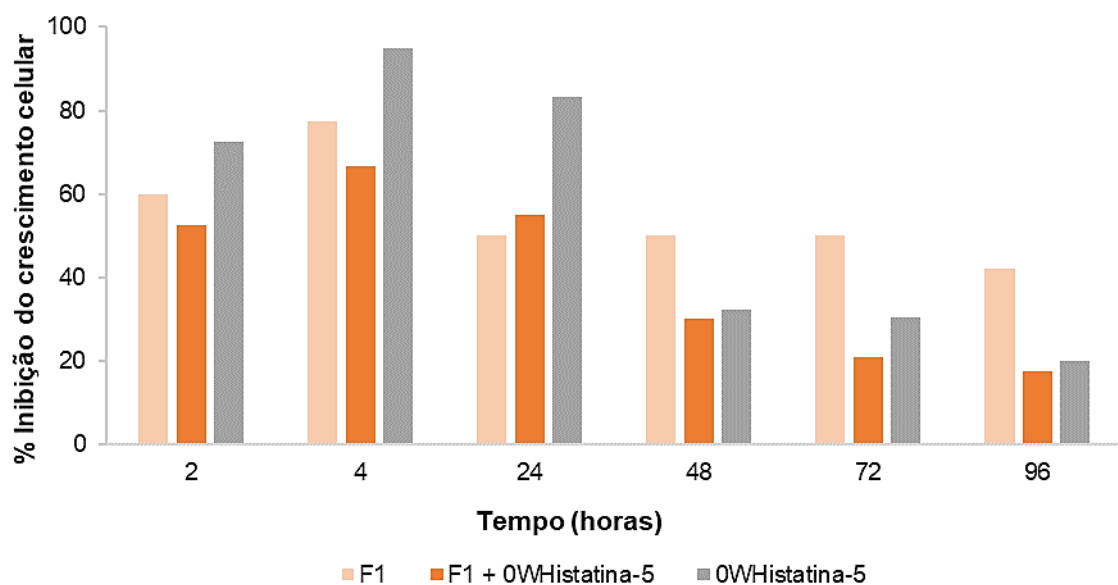
Para o teste de avaliação de atividade antifúngica, a formulação F1, obtida por sonicação, foi escolhida devido a sua capacidade de encapsular uma maior quantidade do peptídeo. Sua EE é de 34,5%, além de apresentar de forma bem característica o “efeito burst” em sua cinética de liberação.

Figura 35 - Crescimento de *C. albicans* submetidas a tratamento com F1, F1+Histatina-5 e 0WHistatina-5 livre.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 36 - Porcentagem de inibição de *C. albicans* ao longo do tempo, submetidas a tratamento com F1, F1+0WHistatina-5 e 0WHistatina-5 livre.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Foi observado inibição do crescimento microbiano nas primeiras 24 horas de experimento. Após esse período, como mostra a Figura 35, o controle positivo de crescimento diminui, mostrando que houve morte celular devido a fatores intrínsecos ao experimento. Fatores como diminuição de nutrientes e pressão ambiental devido ao aumento do número de células, pode ter causado este efeito. Desse modo, após 24 horas de experimento não foi mais possível avaliar a porcentagem de inibição causada pelo peptídeo ou pelo sistema lipossomal, devido a morte celular natural também presente no meio de cultura. Dessa forma, a metodologia utilizada para esse ensaio permitiu avaliar a inibição somente nas primeiras 24 horas, sendo necessário a utilização de outra metodologia para avaliar a morte celular em períodos mais longos de tempo.

Mesmo assim, a formulação F1 apresenta porcentagem de inibição de 52,5% nas primeiras duas horas, com aumento para 66,5% após 4 horas de tratamento. Para o peptídeo livre também se observa aumento da inibição, com máximo de 95% nas primeiras 4 horas. Mesmo não apresentando inibição superior a 0WHistatina-5 livre, F1+0WHistatina-5 foi capaz de manter o crescimento de *C. albicans* abaixo de 50% por mais de 12 horas, indicando que o sistema desenvolvido possui capacidade antifúngica, sendo mais eficaz nos períodos iniciais de sua ação.

O efeito “burst” observado no perfil de liberação desta formulação também é observado aqui. A inibição é maior logo após o contato do sistema lipossomal com o microrganismo, funcionando como dose de ataque, e fungicida. O segundo momento do perfil de liberação está relacionado com a manutenção da porcentagem de inibição nas primeiras 24 horas, com pequena queda. Neste caso, como a liberação é lenta e em pequenas quantias, o efeito do sistema lipossomal sobre o microrganismo pode ser fungistático. O peptídeo original, Histatina-5, demonstra ampla faixa de inibição, em concentrações que vão de 25 a 800 µg/mL (MOFFA et al., 2015b), por esse motivo a variação da quantidade liberada não influenciaria sua ação. Este resultado está de acordo com o observado para o peptídeo 0WHistatina-5, que mesmo sendo um análogo de Histatina-5, apresentou inibição na mesma faixa de ação do peptídeo original.

A formulação F1, também demonstrou capacidade para inibir o crescimento celular. A quantidade elevada de lipídeos presente no meio, principalmente devido ao colesterol, gera dificuldade de crescimento para *C. albicans*, o que reflete nas

porcentagens de inibição observadas. Para confirmar se F1 causava a morte celular das leveduras, uma alíquota de cada tubo foi retirada e plaqueada em meio de cultura Ágar Sabouraud e, posteriormente incubada por 48 horas. Observou-se que houve crescimento do microrganismo, indicando que F1 possui ação fungistática, dificultando o crescimento celular quando presente no meio. Isto auxilia no potencial de inibição de F1+0WHistatina-5, controlando o crescimento do microrganismo.

Embora a capacidade de inibição de F1+0WHistatina-5 nas células de *C. albicans* testadas não tenha sido de 100%, seu uso por tempo prolongado consegue controlar e manter o crescimento microbiano estável. Por se tratar do desenvolvimento de um sistema de liberação que possui a intenção de viabilizar a utilização de um peptídeo, os resultados obtidos foram satisfatórios.

5 CONCLUSÕES

Com relação aos resultados obtidos para as duas técnicas de preparação dos lipossomas aqui comparadas, os lipossomas obtidos por extrusão são mais homogêneos, enquanto que os lipossomas obtidos por sonicação apresentam maior polidispersão. Este resultado está de acordo com o observado para a caracterização dos lipossomas, que indica a técnica de extrusão como capaz de produzir lipossomas com parâmetros melhores. No entanto, os valores de eficiência de encapsulação foram maiores para os lipossomas obtidos por sonicação. A técnica de sonicação também demonstrou produzir lipossomas mais estáveis durante o armazenamento em diferentes temperaturas, principalmente quando armazenadas a 4°C, e a formulação F3 foi a mais estável nesta temperatura.

Os resultados observados nos estudos de cinética de liberação indicam que há uma relação entre a estabilidade da formulação dos lipossomas com o perfil de liberação do peptídeo ao longo do tempo. A formulação F3, que apresentou parâmetros de maior estabilidade, manteve um perfil de liberação constante, por até 30 horas. Esta formulação é a única que contém POPG, um lipídeo aniônico que é responsável por manter a fluidez da bicamada lipídica, podendo modular sua estabilidade e capacidade de liberação. Por sua vez, a formulação F1 apresentou melhor EE, e foi observado o efeito burst no ensaio de liberação, o que é vantajoso para a aplicação desejável. Neste sentido, podemos concluir que a adição de componentes à formulação dos lipossomas pode trazer benefícios como melhora da estabilidade e melhor cinética de liberação. Em contrapartida, dependendo do componente adicionado, dificultou a incorporação do peptídeo 0WHistatina-5, além de prejudicar sua liberação, conforme foi observado para F2.

A formulação F1 foi utilizada nos testes de inibição de crescimento microbiano e nas primeiras 4 horas de testes o valor de inibição foi de 66,5%. Este resultado, juntamente com os outros até aqui descritos, indicam que o sistema lipossomal proposto é capaz de encapsular, compartimentalizar, estabilizar e liberar o peptídeo 0WHistatina-5, atingindo o objetivo inicial de propor um sistema carreador para este peptídeo antifúngico com potencial promissor.

PERSPECTIVAS

O sistema nanocarreador proposto, demonstrou capacidade de incorporar o peptídeo 0WHistatina-5 e promover inibição do crescimento da *C. albicans* em testes preliminares realizados. Sendo assim, mais testes antifúngicos devem ser realizados na intenção de avaliar melhor a capacidade antifúngica das outras formulações, como F2 e F3. Também deve-se estudar de forma mais aprofundada a relação entre a cinética de liberação com o tempo de inibição do crescimento microbiano, o que permitirá no futuro o desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada. Também deve ser estudada a degradação de tais sistemas quando presente em saliva humana, uma vez que o sistema será aplicado na cavidade bucal.

A intenção é que, nos próximos estudos, seja desenvolvida uma formulação tópica, contendo o sistema lipossomal incorporado com peptídeo 0WHistatina-5. Esta formulação permitiria a aplicação do sistema diretamente sobre lesões bucais causadas pela *C. albicans*. E por apresentar liberação lenta, diminuiria o número de aplicações diárias, caracterizando um tratamento prolongado e direcionado.

Referências

BAEV, D.; LI, X. S.; DONG, J.; KENG, P.; EDGERTON, M. Human salivary Histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4777–4784, Sept. 2002.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, Aug. 1965.

BARRETO, G. R. **Como interpretar os dados do Zetasizer Nano**: análise de tamanho. Disponível em: <https://www.brainshark.com/brainshark/viewer/GetAsset.ashx?pi=631894377&typ=SUP&supp_id=9015496&fname=Brainshark_GB_Perguntas_e_Respostas_Zetasizer_Nano.pdf&ftype=Adobe+Acrobat&fsize=2.2+MB&ver=558&sid=8525233&sky=660ce1edccd247eab66f44c07d441433&uid=0&s>. Acesso em: 22 jan. 2018.

BERBEL MANAIA, E.; PAIVA ABUÇAFY, M.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; LALLO SILVA, B.; OSHIRO-JÚNIOR, J. A.; CHIAVACCI, L. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4991–5011, July. 2017.

BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v.10, p. 237–245, July. 2017.

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

CALIENNI, M. N.; TEMPRANA, C. F.; PRIETO, M. J.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; TEKINAY, A. B.; ALONSO, S. del V.; MONTANARI, J. Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro, and in vivo toxicological evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 1–19, Dec. 2017.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; TANABE, K.; NIIMI, M.; MONK, B. C. *Candida albicans* drug resistance - Another way to cope with stress. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3211–3217, 2007.

ÇELİK, B.; SAĞIROĞLU, A. A.; ÖZDEMİR, S. Design, optimization and characterization of coenzyme Q10- and D-panthenyl triacetate-loaded liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p. 4869–4878, July. 2017.

CHANG, T. M. S. Semipermeable Microcapsules. **Science**, v. 146, n. 3643, p. 524–525, Oct. 1964.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; OLIVEIRA, A. G. de; SCARPA, M. V. Efeito de tensoativos na estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 87, n. 4, p. 108–111, set. 2006.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; DE OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 31–37, ago. 2007.

EBRAHIMI, H. A.; JAVADZADEH, Y.; HAMIDI, M.; JALALI, M. B. Repaglinide-loaded solid lipid nanoparticles: effect of using different surfactants/stabilizers on physicochemical properties of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 46, Dec. 2015.

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Química**, v. 99, p. 39–51, 2005.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511–518, jun. 2005.

GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína ccdb**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

GARRIDO, S. S. ; OLIVEIRA, I. C. ; ZAMBOM, C. R. ; VAZ, A.B.S ; MARCHETTO, R.; BARBOSA, L. C. B. . Avaliação quantitativa da susceptibilidade do crescimento de *Staphylococcus aureus* na presença de sistemas antimicrobianos de alta complexidade. **Eclética Química**, v. 40, p. 95-105, 2015.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Letters**, v. 14, n. 2, p. 95–99, Apr. 1971.

HAN, J.; JYOTI, M. A.; SONG, H.-Y.; JANG, W. S. Antifungal Activity and Action Mechanism of Histatin 5-Halocidin Hybrid Peptides against *Candida* ssp. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1-18, Feb. 2016.

HELMERHORST, E. J.; BREEUWER, P.; VAN 'T HOF, W.; WALGREEN-WETERINGS, E.; OOMEN, L. C. J. M.; VEERMAN, E. C. I.; AMERONGEN, A. V. N.; ABEE, T. The cellular target of Histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7286–7291, Mar. 1999.

HELMERHORST, E. J.; ALAGL, A. S.; SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061–1070, Dec. 2006.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, June. 2001.

JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W.; LUKER, J.; PORTER, S. R. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis oral candidosis is one of the most common conditions encountered in individuals with HIV infection and AIDS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, p. 103–114, Jan. 1995.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 285–289, Mar. 2004.

LI, L.; FINNEGAN, M. B.; ÖZKAN, S.; KIM, Y.; LILLEHOJ, P. B.; HO, C.-M.; LUX, R.; MITO, R.; LOEWY, Z.; SHI, W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 384–390, Dec. 2010.

LOPES, S.; SIMEONOVA, M.; GAMEIRO, P.; RANGEL, M.; IVANOVA, G. Interaction of 5-fluorouracil loaded nanoparticles with 1,2-dimyristoyl- sn -glycero-3-phosphocholine liposomes used as a cellular membrane model. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 667–675, Jan. 2012.

LUAN, X.; SKUPIN, M.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 2, p. 168–175, Nov. 2006.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, July. 1963.

MOFFA, E. B.; MACHADO, M. A. A. M.; MUSSI, M. C. M.; XIAO, Y.; GARRIDO, S. S.; GIAMPAOLO, E. T.; SIQUEIRA, W. L. In vitro identification of histatin 5 salivary complexes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–13, Nov. 2015a.

MOFFA, E. B.; MUSSI, M. C. M.; XIAO, Y.; GARRIDO, S. S.; MACHADO, M. A. A. M.; GIAMPAOLO, E. T.; SIQUEIRA, W. L. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–7, Aug. 2015b.

MOHAN, A.; MCCLEMENTS, D. J.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. **Food Chemistry**, v. 213, p. 143–148, Dec. 2016.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1990. 161 p.

NIEMELÄ, P. S.; MIETTINEN, M. S.; MONTICELLI, L.; HAMMAREN, H.; BJELKMAR, P.; MURTOLA, T.; LINDAHL, E.; VATTULAINEN, I. Membrane proteins diffuse as dynamic complexes with lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 22, p. 7574–7575, June. 2010.

NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 198–205, July. 2005.

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, Aug. 2014.

RAI, P.; VANCE, D.; POON, V.; MOGRIDGE, J.; KANE, R. S. Stable and potent polyvalent anthrax toxin inhibitors: raft-inspired domain formation in liposomes that contain PEGylated lipids. **Chemistry - A European Journal**, v. 14, n. 26, p. 7748–7751, Sept. 2008.

RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; BRAGA-SILVA, L. A.; SANTOS, A. L. S. dos; PINTO, M. R.; SGARBI, D. B. da G. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 2, p. 122–125, Apr. 2015.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. FUNK-0002-2016, Oct. 2016. doi:10.1128/microbiolspec.

RON-DOITCH, S.; SAWODNY, B.; KÜHBACHER, A.; DAVID, M. M. N.; SAMANTA, A.; PHOPASE, J.; BURGER-KENTISCHER, A.; GRIFFITH, M.; GOLOMB, G.; RUPP, S. Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV. **Journal of Controlled Release**, v. 229, p. 163–171, May. 2016.

ROY, B.; GUHA, P.; BHATTARAI, R.; NAHAK, P.; KARMAKAR, G.; CHETTRI, P.; PANDA, A. K. Influence of lipid composition, pH, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 5, p. 399–411, Dec. 2016.

SALADE, L.; WAUTHOZ, N.; DELEU, M.; VERMEERSCH, M.; DE VRIESE, C.; AMIGHI, K.; GOOLE, J. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8531–8543, Nov. 2017.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1181–1185, abr. 2002.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10–24, 1 Jan. 2013.

SATO, M. R.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T. A.; DE SOUZA, P. C.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 909–921, Mar. 2017.

SEO, M.-D.; WON, H.-S.; KIM, J.-H.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.-J. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 12276–12286, Oct. 2012.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 3, p. 310–318, Nov. 1968.

VOLTAN, A.; QUINDÓS, G.; ALARCÓN, K.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; CHORILLI, M. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3715–3730, Aug. 2016.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, Jan. 2002.

ZHOU, X.; TAO, H.; SHI, K.-H. Development of a nanoliposomal formulation of erlotinib for lung cancer and in vitro/in vivo antitumoral evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*, v. Volume 12, p. 1–8, Dec. 2017.