

Atividade antibiofilme, mecanismo de ação e potencial terapêutico
de peptídeos bioinspirados na defensina *PvD₁* de *Phaseolus
vulgaris* L.

ANA CLARA OLIVEIRA LOPES SOARES

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO/2024

Atividade antibiofilme, mecanismo de ação e potencial terapêutico de peptídeos bioinspirados na defensina *PvD₁* de *Phaseolus vulgaris* L.

ANA CLARA OLIVEIRA LOPES SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Érica de Oliveira Mello
Coorientadora: Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S676

Soares, Ana Clara Oliveira Lopes.

Atividade antibiofilme, mecanismo de ação e potencial terapêutico de peptídeos bioinspirados na defensina Pvd₁ de *Phaseolus vulgaris* / Ana Clara Oliveira Lopes Soares. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

65 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientadora: Erica de Oliveira Mello.

Coorientadora: Valdirene Moreira Gomes.

1. Biofilmes polimicrobianos. 2. Novos fármacos. 3. Peptídeos antimicrobianos. 4. Resistência microbiana. 5. Peptídeos sintéticos . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Atividade antibiofilme, mecanismo de ação e potencial terapêutico
de peptídeos bioinspirados na defensina PvD₁ de *Phaseolus*
vulgaris L.

ANA CLARA OLIVEIRA LOPES SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2024.

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
PATRICIA DIAS GAMES
Data: 29/04/2024 15:24:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a. Patrícia Dias Games (Dr^a. em Bioquímica Agrícola) – UEMG

Dr. Kayan Eudorico Ventury Baptista (Dr. em Biociências e Biotecnologia) –
UENF

Prof. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Dr. em Biociências e Biotecnologia) –
UENF

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes (Dr^a. em Ciências Biológicas) – UENF
(Coorientadora)

Prof^a. Érica de Oliveira Mello (Dr^a. em Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientadora)

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a Deus, meu guia e protetor em todos os momentos da minha vida, que me concedeu a sabedoria necessária para percorrer este caminho até aqui. Expresso também minha dedicatória especial à minha mãe, Maria Dulce, e ao meu irmão, Jônatas, que têm sido pilares essenciais em minha existência. A eles, agradeço por nunca medirem esforços em minha formação, tanto profissional quanto pessoal.

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras que possam descrever a gratidão que sinto neste momento ao concluir este ciclo da minha vida. Foram muitos momentos preciosos e repletos de significado que vivi durante esse período. Aprendi lições que vão além do conhecimento acadêmico e tive a oportunidade de conhecer pessoas que contribuíram para a construção desse caminho. Com os olhos marejados, tentarei resumir em poucas palavras o tamanho da gratidão que carrego por algumas pessoas que fizeram parte do meu processo de aprendizado.

Primeiramente, a Deus, por ser quem me sustenta, me dá graça e forças para lutar cada batalha. Por vários momentos, sei que a mão d'Ele me sustentou, dando-me determinação e coragem para seguir meu caminho até aqui. A Ele toda honra e toda glória hoje e sempre.

À minha mãe, Maria Dulce, por nunca medir esforços para que eu tivesse o melhor, por ser minha inspiração na vida e por sempre me ensinar a ser uma pessoa honrada, digna e batalhadora. Obrigada por ser a mulher mais forte que conheço e fonte de tantas lições que me fizeram ser quem sou hoje, mesmo com tantas dificuldades durante esses anos. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por cada dia que suportou meus momentos de choro e cansaço. Tudo seria muito mais difícil sem a senhora ao meu lado.

Ao meu irmão Jônatas, por ser um dos pilares da minha construção como pessoa e por estar sempre presente quando eu precisei, mesmo a centenas de quilômetros de distância. Todos os dias eu acordava querendo ser um pouco mais como você e dar orgulho com meus passos e minha trajetória. Obrigada por sempre ver meu potencial, incentivar-me a crescer, ser uma pessoa melhor, me especializar e por oferecer suporte que vai além do emocional e financeiro. Espero conseguir, um dia, retribuir com meus simples gestos tudo que fez e faz por mim, e este é um deles.

À minha cunhada e irmã do coração, Mônica Rangel, expresse minha profunda gratidão por ser uma das mulheres que me incentiva e acalma ao longo de toda minha vida. Agradeço por cada vez que me escutou, por me apoiar, intermediar e impulsionar a ser mais determinada na busca pelos meus objetivos e metas, assim como você. Obrigada por trazer ao mundo uma das minhas pessoas favoritas neste mundo, sem nem ao menos ter nascido ainda.

À Prof^a Érica de Oliveira Mello, minha orientadora dedicada, que esteve ao meu lado diariamente durante meu projeto, sendo paciente, prestativa e amiga. Agradeço por compreender meus limites e, mesmo assim, com carinho, me ensinar que devo sempre me desafiar em busca de mais conhecimento. Levo grandes aprendizados, tanto acadêmicos quanto pessoais, de todos os nossos momentos. Fico imensamente feliz por seguir minha trajetória podendo ser orientado por uma fonte de inspiração como você.

À Prof^a Valdirene Moreira, minha coorientadora, agradeço por ser uma das primeiras a me introduzir ao mundo científico, transmitir um pouco do seu vasto conhecimento e auxiliar na condução do meu projeto. Obrigada por sempre estar disposta a ouvir minha empolgação a cada resultado, por abrir os meus caminhos no laboratório e por todo carinho que sempre tem com cada um dos seus "filhos científicos". Sou muito mais feliz por ter sido uma delas.

Ao Gabriel Taveira, minha gratidão pela colaboração e ajuda durante todo meu mestrado. Agradeço pelos puxões de orelha e pelas tantas vezes que me orientou, mostrando a direção certa. Cada momento durante o mestrado aumentou meu respeito e admiração por você.

À Prof^a Patrícia Games, Prof. Antônio Cogo e Dr. Kayan Ventury, membros da banca examinadora, bem como à Dra. Layrana Santos, revisora, expresso minha profunda gratidão por aceitarem tão gentilmente participar e contribuir com este trabalho. Agradeço pelo valioso tempo dedicado. Saibam que a seleção cuidadosa da banca foi feita com carinho, considerando a excelência profissional que representam.

Gostaria de agradecer a todos os meus colaboradores, à Prof. Ana Elisa pelo auxílio nos experimentos de difração circular, ao Prof. Glauber Dias e à Dra. Larissa Rezende pelos experimentos de biologia molecular, ao Prof. Sérgio Seabra e ao Dr. Felipe Moreira por toda a ajuda na experimentação de microscopia eletrônica de transmissão (MET), e a Gabriel Taveira e Emílio de Castro pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Daphne Dias, Gabriella Rodrigues, Lorena Mendes e Thomas Zacarone, que tornaram todos os dias no laboratório tão divertidos, leves e descontraídos, agradeço de coração. As tardes com café, conversas e brincadeiras tornavam os momentos cansativos da rotina muito mais felizes. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar, por serem pessoas de coração tão bom, que certamente se tornaram não apenas colegas de trabalho, mas parte da minha segunda família.

A minha família, por serem pessoas que, com cada jeitinho particular, estiveram presentes na minha vida durante todos esses anos. Cada um simboliza um tijolinho colocado na minha história de vida. Não poderia fazer parte de outra família senão essa; tenho um orgulho imenso de ser uma Oliveira.

Aos colegas de laboratório, que não citarei nomes para evitar falhas de memória, mas que foram fundamentais para minha jornada em me tornar mestre. Todos os dias da rotina ao lado de vocês foram muito mais especiais e excepcionais. Agradeço pelos bons momentos compartilhados ao longo de todo meu projeto.

Aos meus amigos e amigas, Adrienne Albuquerque, Ana Paula Lengruber, Bruna Abreu, Camila Couto, Daniele Rodrigues, Guilherme Augusto, João Victor Rangel, Laura Aguiar, Larissa Mendes, Nathália Barbosa, Natália Barcelos, Rodolfo Ribeiro, Yasmin Albuquerque, pessoas que a vida me deu durante esse período e que também fazem parte da minha trajetória. A vida é mais colorida, mais alegre, mais leve com aqueles que amamos ao nosso lado. Como diria Clarice Lispector: “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Aos professores do LFBM e do meu período de mestrado, agradeço por todo conhecimento compartilhado, e por fazerem parte da minha formação. Aprendi lições acadêmicas muito valiosas, mas também aprendi lições de vida ainda mais importantes.

Aos técnicos do LFBM, zeladores e responsáveis pela limpeza, que auxiliaram na criação de um ambiente acolhedor e me receberam todos os dias com um sorriso no rosto, meu muito obrigada.

À UENF, minha segunda casa ao longo desses anos, agradeço por proporcionar o contato com tantos profissionais dispostos a ouvir e ajudar, e pelos belos pores do sol no final do dia, que sempre renovaram minhas forças em meio ao cansaço da rotina. Agradeço também ao CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia, ao PGBB – Programa de Biociências e Biotecnologia, ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e à FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
Biofilme Polimicrobiano	15
Gênero <i>Malassezia</i>	17
Gênero <i>Bacillus</i>	19
Peptídeos antimicrobianos	20
OBJETIVOS	22
Objetivo Geral.....	22
Objetivos Específicos	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Obtenção dos peptídeos sintéticos	23
Microrganismos	24
Padronização de protocolo para a formação de biofilmes	24
Identificação dos microrganismos presentes no biofilme polimicrobiano	25
Avaliação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos sobre biofilme polimicrobiano pré-formado e determinação da CMI	26
Análise da viabilidade celular do biofilme polimicrobiano.....	27
Efeitos dos peptídeos sobre a permeabilização da membrana plasmática.....	27
Análise da estrutura secundária dos peptídeos sintéticos em solução e em modelo de membranas por difração circular (CD)	28
Ensaio de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)	29
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	29
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	30
Efeito dos peptídeos sintéticos na viabilidade de macrófagos e monócitos	30
Atividade hemolítica dos peptídeos sintéticos.....	31
Análise estatística	31
Descarte de rejeitos	32
RESULTADOS	32
Padronização de protocolo para a formação de biofilmes	32
Identificação dos microrganismos presentes no biofilme polimicrobiano	32

Avaliação da atividade dos peptídeos sintéticos na pré-formação do biofilme polimicrobiano pré-formado	35
Viabilidade celular	37
Efeitos dos peptídeos sintéticos na permeabilização da membrana plasmática	38
Estrutura secundária dos peptídeos sintéticos em modelo de membranas.....	40
Ensaio de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)	41
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	45
Avaliação da toxicidade e atividade hemolítica dos peptídeos.....	46
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do modelo de desenvolvimento de biofilme em cinco etapas	16
Figura 2: <i>Design</i>, alinhamento e características bioquímicas dos peptídeos sintéticos	24
Figura 3: Imagens das células de microrganismos isoladas e em biofilme polimicrobiano (A)	33
Figura 4: Imagens das células de microrganismos isoladas e em biofilme polimicrobiano (B)	34
Figura 5: Avaliação do efeito inibitório dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ sobre biofilme polimicrobiano pré-formado, cepas 153DR5 e 154DR8	36
Figura 6: Imagens de placas de Petri exibindo a formação de colônias e a porcentagem de viabilidade celular na presença e na ausência de diferentes concentrações do peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$	37
Figura 7: Imagens das células dos biofilmes 153DR5 após ensaio de permeabilização de membranas	39
Figura 8: Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de permeabilização de membranas	39
Figura 9: Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de permeabilização de membranas	39
Figura 10: Análise da estrutura secundária.....	41
Figura 11: Imagens das células dos biofilmes 153DR5 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	42
Figura 12: Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	43
Figura 13: Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	43
Figura 14: Imagens obtidas por MEV das células do biofilme 154DR8 tratadas e não tratadas.....	44
Figura 15: Imagens obtidas por MET das células do biofilme 154DR8 tratadas e não tratadas.....	45
Figura 16: Avaliação dos peptídeos do $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ quanto à citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7.	46
Figura 17: Avaliação dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ quanto à citotoxicidade em monócitos THP-1	47
Figura 18: Atividade hemolítica dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ em eritrócitos de carneiro	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação molecular dos isolados clínicos das cepas 153DR5 e 154DR8 através do sequenciamento da região 16S	35
Tabela 2: Valores de concentração citotóxica (CC₅₀) dos peptídeos γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ e γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ ns macrófagos RAW 264.7, monócitos THP-1 e eritrócitos	48

RESUMO

A formação de biofilme polimicrobiano representa um significativo risco para diversas infecções recorrentes, especialmente devido à resistência crescente de microrganismos aos tratamentos convencionais. Esta resistência é frequentemente associada à complexa estrutura do biofilme, uma matriz extracelular polimérica que surge quando microrganismos se unem. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas do sistema de defesa imune de praticamente todas as formas de vida, e que possuem um amplo espectro de atividades. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenhou dois peptídeos sintéticos inspirados na região γ -core da defensina PvD₁, isolada de *Phaseolus vulgaris* L. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial desses peptídeos sobre biofilmes polimicrobianos de isolados clínicos e o seu potencial terapêutico. Inicialmente, os peptídeos γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ e γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ foram testados em concentrações variando de 300 μ M a 37,5 μ M contra biofilmes polimicrobianos de isolados clínicos (153DR5 e 154DR8). Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI), a concentração mínima que elimina o biofilme (CMEB), analisada a viabilidade celular e investigado o modo de ação dos peptídeos por meio de ensaios de permeabilização de membranas e ensaios de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de microscopia de fluorescência. O peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ foi capaz de matar 100% das células dos biofilmes pré-formados, nas concentrações de 300, 150 e 75 μ M, sendo a CMI e a CMEB de 75 μ M. Observou-se que o peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ na concentração de 37,5 μ M causou comprometimento da membrana citoplasmática e aumentou a produção endógena de ROS nas células dos biofilmes. O dicróismo circular revelou diferentes estruturas secundárias nos peptídeos que ressaltam a importância da carga catiônica e hidrofobicidade para a interação dessas moléculas com membranas biológicas, associadas à seletividade e atividade antimicrobiana. Imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão revelaram a presença de células leveduriformes e bacterianas no biofilme polimicrobiano, além de uma redução significativa no número de células, quando tratadas com γ_{31-45} PvD₁⁺⁺. As células do controle apresentavam superfície lisa, matriz extracelular íntegra, enquanto as células tratadas com γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ exibiram alterações na sua superfície como *bebbling* de membranas, demonstrando perda de material citoplasmático e encolhimento celular. Além disso, observamos mudanças na estrutura da matriz extracelular, rompimento da membrana e resquícios de apoptose celular, destacando a eficaz atividade antibiofilme de γ_{31-45} PvD₁⁺⁺. Adicionalmente, γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ e γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ apresentaram baixa toxicidade sobre células de mamíferos e baixa atividade hemolítica, indicando o seu potencial uso no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Palavras-chave: Biofilmes polimicrobianos; novos fármacos; peptídeos antimicrobianos; resistência microbiana.

ABSTRACT

The formation of polybacterial biofilms represents a significant risk for various recurring infections, especially due to the increasing resistance of microorganisms to conventional treatments. This resistance is often associated with the complex structure of the biofilm, a polymeric extracellular matrix that arises when microorganisms adhere. Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules from the immune defense system of virtually all forms of life, possessing a broad spectrum of activities. In this context, our research group designed two synthetic peptides inspired by the γ -core region of the defensin PvD₁, isolated from *Phaseolus vulgaris* L. This study aimed to evaluate the potential of these peptides on polybacterial biofilms of clinical isolates and their therapeutic potential. Initially, the peptides γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ and γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ were tested at concentrations ranging from 300 μ M to 37.5 μ M against polybacterial biofilms of clinical isolates (153DR5 and 154DR8). The minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum concentration that eliminates the biofilm (MCEB), cell viability, and the mode of action of the peptides were determined through membrane permeabilization assays and endogenous induction of reactive oxygen species (ROS) assays using fluorescence microscopy. The peptide γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ killed 100% of cells in pre-formed biofilms at concentrations of 300, 150, and 75 μ M, with a MIC and MCEB of 75 μ M. The peptide at a concentration of 37.5 μ M compromised the cytoplasmic membrane and increased endogenous ROS production in biofilm cells. Circular dichroism revealed different secondary structures in the peptides, emphasizing the importance of cationic charge and hydrophobicity for their interaction with biological membranes, associated with selectivity and antimicrobial activity. Scanning and transmission electron microscopy images revealed the presence of yeast and bacterial cells in polybacterial biofilm and a significant reduction in the number of cells when treated with γ_{31-45} PvD₁⁺⁺. Control cells exhibited a smooth surface and intact extracellular matrix. In contrast, cells treated with γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ showed changes in their surface, such as membrane bubbling, demonstrating loss of cytoplasmic material, and cell shrinkage. Additionally, we observed changes in the extracellular matrix structure, membrane rupture, and remnants of cellular apoptosis, highlighting the effective antibiofilm activity of γ_{31-45} PvD₁⁺⁺. Furthermore, γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ and γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ demonstrated low toxicity against mammalian cells and low hemolytic activity, indicating their potential use in the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Polybacterial biofilms; new drugs; antimicrobial peptides; microbial resistance.

1. INTRODUÇÃO

Em 2015, a Organização das nações Unidas (ONU) divulgou 17 objetivos a serem alcançados até 2030, visando organizar um plano de ação para proteger o planeta e assegurar qualidade de vida para todos. Entre esses objetivos, destaca-se o compromisso de proporcionar à população acesso a serviços de saúde de qualidade, incluindo o apoio à pesquisa, desenvolvimento de vacinas e medicamentos para doenças transmissíveis ou não, especialmente aquelas que impactam predominantemente os países em desenvolvimento, disponibilizando tais recursos de maneira acessível (ONUBR, 2019). Essas preocupações estão diretamente ligadas aos desafios apresentados por microrganismos patogênicos que demonstram resistência aos antibióticos em uso, ressaltando a urgência do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desses patógenos (SILVA *et al.*, 2022).

Nesse contexto, é essencial enfatizar as preocupações com a saúde destacadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) durante a "Semana Mundial da Conscientização Antimicrobiana". Isso implica fortalecer a compreensão de que a colaboração entre indivíduos, governos, organizações da sociedade civil e profissionais de diversas áreas é fundamental para combater a resistência antimicrobiana. Além disso, é crucial promover a conscientização sobre a eficácia antimicrobiana, enfatizando práticas criteriosas e responsáveis (OMS, 2023).

A resistência microbiana vem sendo abordada como um tema de ampla preocupação dentro dos órgãos de saúde pública global. Essa resistência pode ser causada de maneira multifatorial, estando relacionada em grande parte a resistência natural ou adquirida de algumas espécies frente aos antimicrobianos (GIONO-CEREZO *et al.*, 2020). Sua intensificação nos últimos anos pode ser justificada devido ao uso indiscriminado de antibióticos para doenças que não há prescrição desses medicamentos, o que afeta não só o meio que está inserido, mas todo ecossistema ao seu redor. A ONU demonstra que mais de 50% dos medicamentos utilizados são erroneamente prescritos, dispensados e vendidos, além da utilização incorreta de muitos pacientes, como o abandono do tratamento antes do seu término, o que pode agravar ainda mais esse problema (PECORARO, 2022).

Com isso, as infecções fúngicas vem ganhando destaque dentro das doenças que acometem pacientes ao redor do mundo. Anualmente, as infecções fúngicas invasivas (IFIS) causam mais de 11,5 milhões de infecções graves e episódios recorrentes de micoses. Dessas ocorrências, aproximadamente 1,5 a 2 milhões resultam em óbito, e a

taxa de mortalidade é de aproximadamente 10%, dependendo da espécie fúngica. No Brasil, embora as infecções fúngicas sejam contínuas, não existe uma notificação oficial dessas condições, no entanto estudos apontam que mais de 3,8 milhões de indivíduos podem estar sofrendo de infecções fúngicas graves. Isso ocorre principalmente em pacientes com cânceres malignos, asma, transplantados, infecção pelo HIV, tuberculose e aqueles que vivem em áreas endêmicas para fungos verdadeiramente patogênicos (GIACOMAZZI *et al.*, 2016). Na maioria das vezes, as IFIS são associadas a paciente imunocomprometidos, ao uso inadequado de antimicrobianos, a procedimentos que levam a imunossupressão, ao tratamento com quimioterápicos ou ao uso contínuo de corticoides (DEBERALDINI e SANTOS, 2021). Além disso, GUSA *et al.* (2023) exploraram uma forma adicional de resistência adquirida por microrganismos, especialmente fungos, relacionada ao aumento da temperatura global. Em outubro de 2022, a OMS divulgou uma lista destacando os patógenos fúngicos mais críticos, identificando pelo menos sete fungos de alta prioridade. Essa preocupante situação afeta notavelmente os países mais quentes, nos quais há evidências do aumento da distribuição geográfica de fungos mais resistentes devido às mudanças climáticas (NNADI e CARTER, 2021).

Por outro lado, a formação de biofilme envolvendo espécies mistas é uma questão clínica mais frequentemente documentada. Esses biofilmes resultam das interações entre microrganismos, podendo pertencer a uma única espécie ou envolver várias espécies, como bactérias e fungos. Embora possam atuar como fontes de infecções, os estudos sobre essas interações ainda são limitados (KHAN *et al.*, 2021). A formação de biofilmes representa um dos principais mecanismos facilitadores para a invasão e proliferação desses microrganismos nos hospedeiros. Dentro dos biofilmes, as células encontram-se resguardadas contra estresses ambientais, incluindo as defesas imunológicas do hospedeiro e o tratamento antimicrobiano. Essa dinâmica tem implicações clínicas significativas no controle de infecções associadas a biofilmes (WALL *et al.*, 2019).

Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas muito promissoras para superar a resistência microbiana, devido seu amplo espectro de atividade inibitória, sobre bactérias, fungos e parasitas, tendo atividade comprovada na inativação de alguns vírus e sua ação sobre múltiplos alvos (KAZEMZADEH *et al.*, 2021). Outra vantagem na utilização dos AMPs é a sua especificidade na inibição ou eliminação de agentes patogênicos enquanto a toxicidade para as células hospedeiras na

proximidade é limitada. As diferenças entre as membranas das células do patógeno e do hospedeiro em termos de composição, hidrofobicidade e carga permite ao AMP distinguir entre os dois. Além disso, o desenvolvimento de resistência contra estes peptídeos é raro devido à sua especificidade de alvo (as membranas celulares) e sua rápida ação (VON BOROWSKI *et al.*, 2018). Além dos diferentes mecanismos de morte microbiana em comparação com os antibióticos convencionais, os AMPs têm a capacidade de sinergia com antibióticos e outros AMPs que diminuiriam o risco de desenvolvimento de resistência (MOLCHANOVA *et al.*, 2017).

Uma nova geração de AMPs sintéticos com a melhoria da seletividade e da atividade antimicrobiana e que são ideais para aplicações terapêuticas pode ser obtida. Estratégias como ciclização, modificações de hidrofobicidade e a incorporação de aminoácidos têm um enorme potencial para melhorar a estabilidade no soro e a resistência a sal de AMPs potentes, com efeitos mínimos de toxicidades (TORRES *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020).

1.1. Biofilme Polimicrobiano

O biofilme representa o modo de vida predominante para microrganismos na natureza, no qual células microbianas individuais se organizam em agregados ou aglomerados envolvidos por suas substâncias poliméricas extracelulares autogeradas (SAUER, *et al.*, 2022). Essa estrutura permite a organização dos microrganismos em comunidades diferenciadas, que podem ser formadas por um ou mais tipos de agentes microbianos. Ao interagirem entre si, geram uma resistência a antimicrobianos, se tornando então, de difícil remoção do ambiente biótico ou abiótico em que estão inseridos (MEIRA, 2021).

Sua sinergia entre moléculas secretadas e interações físicas aumenta a dinâmica das infecções aumentando potencialmente a dificuldade de tratamento, onde sua resistência pode ser até duas mil vezes maior que as de células planctônicas. Ainda é possível que a formação de biofilme agrave inúmeras doenças, podendo ocasionar sua forma crônica e resultando na recorrência da patologia após o final do tratamento (KOWALSKI *et al.*, 2019).

Ao contrário das culturas planctônicas, os biofilmes têm a capacidade de criar uma estrutura tridimensional complexa, com células aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. Essa estrutura facilita o estabelecimento de diálogos interespecíficos e interações sinérgicas (COSTA *et al.*, 2023). Embora o mecanismo de formação de

biofilme tenha sido extensivamente estudado em certos modelos de sistemas microbianos, tanto monoespécies quanto multiespécies, existe uma lacuna na investigação das organizações estruturais e interações interespécies em biofilmes associados a doenças humanas (BAI *et al.*, 2019).

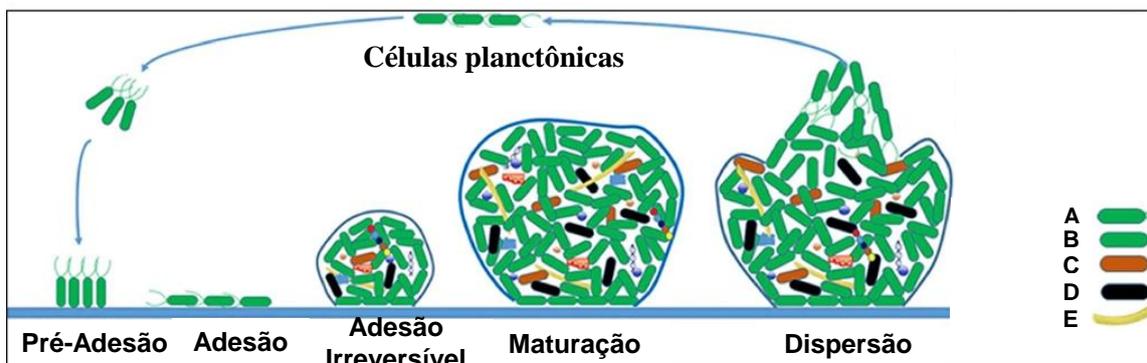


Figura 1. Representação esquemática do modelo de desenvolvimento de biofilme em cinco etapas. (A) Células Planctônicas, (B) Células Biofilme, (C) Células Persistentes, (D) Células mortas e (E) Ligações de água. Adaptado: SAUER *et al.*, 2022.

A formação do biofilme segue uma sequência de eventos, abrangendo a adesão e adaptação dos microrganismos ao ambiente. Conforme destacado por Capelletti (2016) (Figura 1), o estabelecimento dessa comunidade ocorre em cinco fases distintas. Na primeira fase, conhecida como pré-adesão, materiais orgânicos em diferentes locais com variações de temperatura e pH, presentes em superfícies, formam um filme condicionante crucial para a adesão dos microrganismos primários. Na segunda fase, denominada adesão reversível, as células são atraídas para se ligarem ao filme condicionante, dependendo da capacidade do microrganismo de formar agregados. A terceira fase, adesão irreversível, caracteriza-se pelo aumento da multiplicação dos microrganismos, formando agregados celulares. Nesse estágio, a mobilidade cessa, e os genes relacionados à comunicação celular e à produção de exopolissacarídeos são ativados, formando a uma matriz extracelular. A fase seguinte, maturação, representa a consolidação da estrutura, com aumento da densidade populacional e produção de exopolissacarídeos para reforçar a espessura e estabilidade do biofilme. Finalmente, a quinta fase, dispersão, é marcada pela mobilidade das células, que se desprendem do biofilme, podendo originar um novo biofilme na linha de produção.

Em locais suscetíveis à formação de biofilme, como a pele, a derme humana desempenha um papel crucial como a principal barreira contra patógenos, ao mesmo tempo em que abriga um ecossistema diversificado de microrganismos comensais, composto por bactérias e fungos (BOXBERGER *et al.*, 2021). Essas populações,

associadas ao corpo humano, ocupam nichos específicos na pele, desempenhando um papel crucial na proteção contra a colonização por patógenos, conforme destacado por Smythe e Wilkinson, 2023. Geralmente inofensivos para o hospedeiro humano, esses microrganismos comensais desempenham uma função vital na proteção da pele, funcionando como uma primeira barreira a patógenos (HETTWER *et al.*, 2018). No entanto, em situações de desbiose, caracterizadas pela desregulação dessa microbiota, pode ocorrer o início de algumas doenças associadas à pele (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2020). Nesse contexto, a modulação da microbiota surge como uma abordagem avançada para restabelecer e manter um ambiente saudável e equilibrado (MOSKOVICZ *et al.*, 2021).

Ao explorar o ecossistema microbiano da pele e o seu biofilme constituinte, notamos a diversidade de microrganismos que desempenham papéis distintos e, muitas vezes, interdependentes (JORDANA-LLUCH, *et al.*, 2020.). Nesse cenário, destacam-se dois gêneros de microrganismos que podem desempenhar papéis na saúde humana e na ecologia microbiana da pele: o gênero *Malassezia*, composto por leveduras lipofílicas com relevância dermatológica e sistêmica (THEELEN, 2018), e o gênero *Bacillus*, bactérias Gram-positivas reconhecidas por sua capacidade de formar endósporos e sua ampla distribuição em diferentes ambientes (RYU *et al.*, 2022).

1.2. Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é composto por leveduras lipofílicas, que apresentam crescimento em ácidos graxos de longas cadeias. Suas colônias possuem textura cremosa, friáveis, convexas e de aspecto branco-fosco. Apresentam tamanhos variados podendo ser ovais (1,5mm - 3mm), cilíndricas (2,5mm - 8mm) ou esféricas (2,5mm - 5mm de diâmetro), onde os filamentos podem aparecer de qualquer ponto da levedura e os brotos se formam na base larga das células (SCHLOTTFELDT *et al.*, 2002).

Inicialmente, o gênero *Malassezia* foi descoberto, identificado e associado à dermatite seborreica por Malassez no final do século XIX (MALASSEZ, 1874). Seu cultivo foi possível apenas em 1927, com a descoberta do requerimento da suplementação lipídica. Apenas em 1998, foi descoberta a existência de várias espécies classificadas como *Malassezia spp.*, dando origem ao gênero e intensificando as pesquisas relacionadas ao mesmo. Atualmente, *Malassezia* representa um gênero complexo, composto por 18 espécies, que recebeu sua própria classe,

Malasseziomycetes (CAFARCHIA *et al.*, 2011; GUÉHO, MIDGLEY e GUILLOT, 1996; THEELEN *et al.*, 2018).

A *Malassezia* é uma levedura amplamente encontrada no microbioma natural da pele humana, sendo um dos fungos mais comuns na flora natural da pele, onde vivem em nosso organismo desde que nascemos de maneira inócua (THEELEN, 2018). Um desequilíbrio nesse microbioma, em condições específicas, pode tornar essas leveduras um patógeno potencial, onde essas acabam invadindo o estrato córneo e, ao interagir com células do nosso organismo como queratinócitos, melanócitos, células no nosso sistema imune e outros mediadores químicos, podem desencadear diversas patologias dermatoses, como foliculites, pitíriase versicolor, dermatite seborreica, entre outras (SAUNTE, 2020).

O gênero *Malassezia* recentemente se destacou como patógenos emergentes que estão associados a infecções da corrente sanguínea causando infecções sistêmicas graves, principalmente em neonatos prematuros e pacientes imunocomprometidos que recebem nutrição parenteral (PEDROSA *et al.*, 2018). Dentre os fungos encontrados nessas infecções sanguíneas, os estudos demonstram que a espécie *Malassezia furfur* é a mais envolvida nesse tipo de infecção, uma vez que são mais comumente encontradas na colonização da pele e apresentam maior virulência dentro das cepas de *Malassezia* que estão envolvidas na fungemia (RHIMI *et al.*, 2020). Esse cenário mostra como esse é um gênero subestimado dentro das doenças fúngicas e como é necessário um diagnóstico precoce para que possamos prevenir doenças graves crônicas ou até mesmo a mortalidade.

A *Malassezia furfur* está associada à dermatopatologia pitíriase versicolor (PV), conhecida popularmente como “pano branco” ou “micose de praia”. Essa é ocasionada na maioria das vezes sob calor, peles oleosas, umidade, sudorese e quando há baixa resistência do sistema imune. Essa é uma infecção frequente em países tropicais, afetando mais adolescentes e jovens, uma vez que existe uma maior produção de sebo nessa faixa etária (CHEBIL, 2022).

Normalmente a PV é assintomática, onde sua identificação é feita por meio de lesões com manchas hiper ou hipo-pigmentadas, redondas e escamosas que podem acabar se agrupando em casos mais graves gerando manchas maiores e com formato irregular. Em alguns casos os pacientes relatam haver uma leve coceira. Os locais de maior prevalência da doença no corpo são os que mais estão expostos as suas condições de proliferação como tronco, braços, face, pescoço e couro cabeludo (LABEDZ, 2023).

O tratamento consiste em medicamentos tópicos que são considerados a primeira linha para combate da PV, esses são divididos em agentes antifúngicos não específicos, que são responsáveis por eliminar o tecido morto que impedem uma nova infecção, e os antifúngicos específicos, com ação fungistática e fungicida. Já os medicamentos de segunda linha são os orais, que são utilizados no caso de infecções sistêmicas, mais severas ou recorrentes (SAUNTE *et al.*, 2020). Em muitos casos os pacientes abandonam o tratamento tópico antes do seu final ou o utilizam de maneira inadequada. Isso pode comprometer a eficácia dos agentes utilizados e acaba gerando uma recorrência que varia entre 60 a 80% dos casos, fazendo com que a resistência desses fungos se torne maior e ocasionando cepas mais resistentes aos fármacos usados, gerando uma necessidade de novos fármacos que sejam mais efetivos ao final do tratamento (VILAÇA *et al.*, 2019).

1.3. Gênero *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, aeróbicas e mesófilas, com faixa de temperatura ótima de 30 a 37 °C, comuns nos solos e presentes em diversos ambientes e organismos e apresentam tamanhos variáveis de 0,5 x 1,2 a 2,5 x 10 µm e colônias de 3 - 5 mm. São de grande importância econômica e para a saúde, sendo reconhecidos como um dos principais grupos produtores de antibióticos (MELO *et al.*, 2021). As quatro espécies originais do grupo (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*) foram descobertas há mais de 40 anos (GORDON *et al.*, 1973; PRIEST *et al.*, 1987).

Uma de suas características marcantes é a produção de endósporos, permitindo a sobrevivência em condições adversas, como falta de oxigênio e água. A formação de endósporos proporciona resistência mesmo fora do estado vegetativo, permitindo a sobrevivência a condições extremas de estresse, como altas temperaturas, salinidade ou acidez. As bactérias permanecem em estado de dormência até que as condições se tornem favoráveis novamente ao crescimento (SALTON e BARON, 1996; CALVO *et al.*, 2010; RAY e RAYAN, 2014).

A espécie *Bacillus subtilis* se destaca como uma das bactérias mais minuciosamente estudadas, sendo um organismo padrão para bactérias Gram-positivas em formato de bastonetes (HÄRTIG e JAHN, 2012). Além de ser uma bactéria não patogênica que reside no solo e comumente se associa a plantas e à rizosfera, *B. subtilis* também é encontrada como parte comensal da microbiota natural da pele humana (RYU

et al., 2022). Essas bactérias são compostas por pequenas células vegetativas, com largura inferior a 1 µm (BARBE *et al.*, 2009). Geralmente mesofílicas e neutrofílicas, algumas podem tolerar pH elevado. A classificação dessas bactérias é complexa devido à sua ampla diversidade, sendo determinada por critérios como maquinaria biossintética, fontes, funções biológicas, propriedades, estrutura tridimensional, padrão de ligação covalente ou alvos moleculares. Notavelmente, a espécie *B. subtilis* apresenta um extenso conjunto de ferramentas genéticas e moleculares, facilitando sua manipulação e permitindo estudos *in vitro* de maneira eficiente (ARNAOUTELI *et al.*, 2021). Além disso, essa espécie é reconhecida por sua capacidade de produzir e secretar moléculas com efeito regulador sobre o crescimento de outras bactérias (CAULIER *et al.*, 2019).

Evidenciar qual papel *B. subtilis* desempenha na microbiota da pele é fundamental para melhor compreensão dos mecanismos utilizados por ela na formação de biofilme. RYU *et al.* (2022) evidenciaram como a disponibilidade de suor afeta a geração de eletricidade a longo prazo em *B. subtilis*, enquanto transitam entre o estado dormente de esporos e o retorno à vida na germinação. Isso demonstra a capacidade de esporulação na ausência de suor e nutrientes limitados, e a germinação em resposta ao suor, sem necessidade de germinantes adicionais, o que pode influenciar na formação de estruturas de resistência, como o biofilme.

Embora extensas pesquisas tenham sido conduzidas para entender a influência das bactérias da pele na saúde cutânea, poucos estudos se dedicaram a investigar as interações específicas entre membros da microbiota da pele. A elucidação dessas interações é fundamental para compreender a complexa organização das comunidades microbianas, como a microbiota humana (HERNANDEZ-VALDES *et al.*, 2020).

1.4. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são compostos encontrados em inúmeros organismos para sua defesa contra patógenos, sendo essenciais para imunidade inata de vários organismos. São caracterizados por pequeno tamanho, carga líquida positiva em pH fisiológico e alguns apresentam um grande número de cisteínas (4, 6 e 8), as quais conectam-se em pares, formando pontes dissulfeto, que conferem alta estabilidade a altas temperaturas para esses peptídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Embora eles compartilhem propriedades físicas semelhantes, mostram uma grande variedade de sequências e diferem na sua estrutura tridimensional e atividades biológicas (HAZAM *et al.*, 2019). Outra importante característica dos AMPs é que eles

apresentam uma vasta atividade inibitória sobre microrganismos, como vírus, bactérias Gram-positivas e negativas, fungos e parasitas, em concentrações micromolares (RIBEIRO *et al.*, 2023).

A atividade dos AMPs, assim como seus mecanismos de ação, ainda são pouco elucidados. Algumas evidências indicam que eles atuam permeabilizando a membrana do microrganismo, devido sua grande capacidade de interagir com diversas membranas biológicas (KOEBAK e CRAIK, 2019). Esta característica tem despertado o interesse em aprofundar os estudos desses peptídeos, com o intuito de desenvolver novos agentes terapêuticos (CHOWDHURY *et al.*, 2020).

Dentre os principais AMPs de origem vegetal, destacam-se as defensinas, que possuem uma estrutura primária composta por 45 a 54 resíduos de aminoácidos e uma carga positiva em pH neutro (BROEKAERT *et al.*, 1997; CARVALHO e GOMES, 2011). Com uma massa molecular aproximada de 6 kDa, esses peptídeos vegetais, ricos em cisteínas, manifestam atividade antimicrobiana, especialmente antifúngica, em concentrações micromolares contra diversos patógenos (CARVALHO e GOMES, 2011; MELLO *et al.*, 2019). Do ponto de vista estrutural, as defensinas apresentam regiões conservadas, como a γ -core, cuja importância fundamental na atividade biológica foi ressaltada por estudos anteriores (SAMBLANX *et al.*, 1997; SAGARAM *et al.*, 2011).

No entanto, a aplicação desses peptídeos enfrenta desafios significativos, e superar essas limitações requer um aprofundamento nos mecanismos de ação e nas características dos AMPs, com o objetivo de aprimorar a produção, estabilidade e atividade dessas substâncias (MAHLAPUU *et al.*, 2020). A abordagem racional para o *design* de novos fármacos é destacada na química medicinal atual. Os métodos de *design* racional de AMPs buscam criar futuros fármacos mais específicos para microrganismos, minimizando efeitos secundários e reduzindo custos (JIANG *et al.*, 2021.).

A compreensão das propriedades físico-químicas dos AMPs levou ao desenvolvimento de métodos de predição da atividade antimicrobiana, possibilitando a identificação prévia de AMPs antes da síntese. Parâmetros como cationicidade, propensão à estrutura helicoidal, anfipaticidade e hidrofobicidade estão inter-relacionados, de modo que modificações em um parâmetro podem resultar em mudanças significativas em outros (PORTO *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Mello *et al.* (2019), foram desenhados peptídeos com base na região γ -core da defensina de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

(denominada PvD_1) que foi isolada e caracterizada por Games *et al.* (2008). A introdução de alterações nos resíduos de aminoácidos carregados negativamente por outros com carga positiva, juntamente com modificações dimensionais, revelou uma correlação direta com o aumento da atividade antifúngica desses peptídeos.

Até o momento, uma ampla variedade de AMPs foi investigada, proveniente tanto de fontes naturais quanto sintéticas, revelando não apenas a capacidade de eliminar microrganismos patogênicos, mas também de oferecer outros benefícios, como promoção da cicatrização de feridas, atividade antitumoral, vantagens evidentes sobre os antibióticos convencionais (como o surgimento mais lento de resistência), atividade antibiofilme de amplo espectro e a capacidade de modular favoravelmente a resposta imune do hospedeiro (RADEK e GALLO, 2007; MAGANA *et al.*, 2020).

Controlar essas inter-relações pode ser crucial para conceber peptídeos mais potentes e específicos. Vários métodos de predição de atividade antimicrobiana derivaram de estudos de *design* racional (TAVEIRA *et al.*, 2022). Sendo assim, este estudo tem como finalidade aperfeiçoar a investigação dos AMPs no enfrentamento de biofilmes polimicrobianos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar o potencial antimicrobiano *in vitro* de peptídeos bioinspirados sobre biofilmes polimicrobianos de isolados clínicos, investigando seu possível mecanismo de ação. Além de avaliar a citotoxicidade em células de mamíferos, visando o seu potencial uso como novas moléculas para o controle de infecções microbianas.

2.2. Específicos

- A. Obter os peptídeos sintéticos;
- B. Padronizar a formação do biofilme;
- C. Identificar os microrganismos presentes no biofilme polimicrobiano;
- D. Avaliar a atividade antibiofilme dos peptídeos sintéticos sobre o biofilme polimicrobiano pré-formado;
- E. Avaliar o efeito dos peptídeos sintéticos na permeabilização da membrana plasmática;

- F. Avaliar possíveis alterações conformacionais dos peptídeos na presença de solvente orgânico e na presença de modelos de membranas com diferentes composições;
- G. Avaliar o efeito dos peptídeos sintéticos na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- H. Analisar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais nos biofilmes tratados com os peptídeos, através de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- I. Avaliar a citotoxicidade celular dos peptídeos sintéticos em culturas de macrófagos e monócitos e verificar a sua atividade hemolítica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos foram anteriormente desenhados por Mello *et al.* (2019) e obtidos comercialmente durante o desenvolvimento deste trabalho. O peptídeo com 15 resíduos, chamado $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$, contém a seguinte sequência de aminoácidos: RSGRARRRFRAWATK, com carga líquida +7 e massa molecular de 1875,19 Da. Já peptídeo de 9 resíduos de aminoácidos, chamado $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$, contém a seguinte sequência de aminoácidos GRARRRFRA, com carga líquida +5 e massa molecular de 1145,34 Da. Os peptídeos foram sintetizados pela GenOne Soluções em Biotecnologia (Rio de Janeiro, Brasil) onde o nível de pureza foi > 95% conforme determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (4,6×250 mm PLRP-S 100A), usando uma solução A (0,1% de ácido trifluoroacético em 100% de acetonitrila) e uma solução B (0,1% de ácido trifluoroacético em 100% de água) com o seguinte gradiente: 0%–15% da solução A de 0 a 25 min; 40%–100% da solução A de 25 a 30 min. Os resíduos de cisteínas (C) desses peptídeos foram trocados por resíduos de alanina (A). Além disso, dois resíduos de ácido aspártico (D) foram substituídos por dois resíduos de arginina (R) (Figura 2A). Suas massas moleculares foram determinadas pela ferramenta ExPASy Compute Mw (Figura 2B). Os peptídeos foram ressuspensos em água ultrapura estéril para serem usados em todas as etapas deste trabalho.

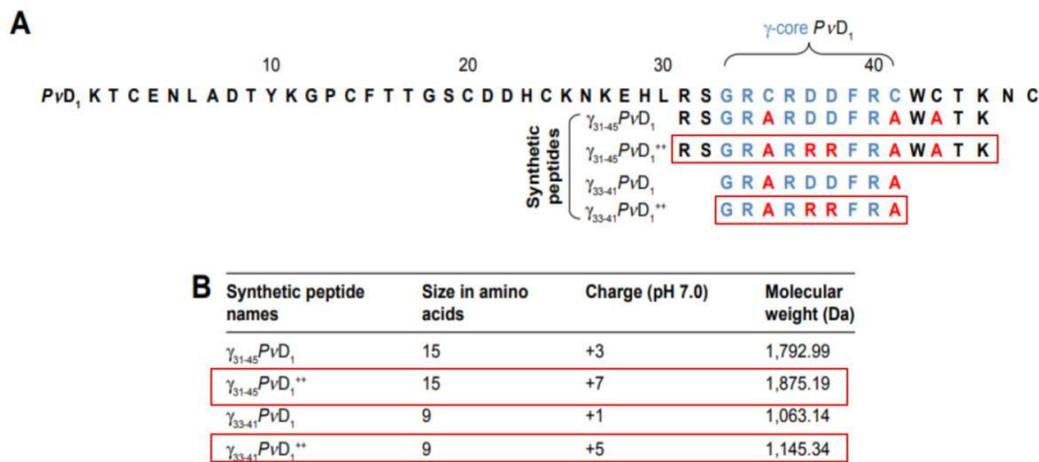


Figura 2: Design, alinhamento e características bioquímicas dos peptídeos sintéticos. Os peptídeos utilizados neste trabalho estão destacados em vermelho. (A) Alinhamento das estruturas primárias da defensina PvD₁ e dos quatro peptídeos sintéticos em código de uma letra para os aminoácidos. Números acima da sequência de PvD₁ indicam o tamanho do peptídeo em aminoácidos. Os resíduos de aminoácidos em azul representam a região γ-core de PvD₁. Os resíduos de aminoácidos em vermelho indicam os resíduos substituídos na sequência original de PvD₁. Os resíduos de aminoácidos em preto não pertencem à região γ-core e não sofreram alterações. Os números nos nomes dos peptídeos sintéticos indicam a posição do aminoácido na sequência original de PvD₁. Duplo sinal de mais (++) indica a substituição dupla dos resíduos de aminoácidos D por R na sequência original. (B) Características bioquímicas dos peptídeos sintéticos (MELLO *et al.*, 2019).

4.2. Microrganismos

As cepas 153DR5 e 154DR8 utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Professora Vânia Maria Maciel Melo, do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. Essas cepas foram isoladas de amostras clínicas de pacientes com patologias dermatológicas. As cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Merk S/A) modificado suplementado com 0,5% de Tween-80 (Synth), 0,5% de azeite e 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) (v/v) por 24h a 32° C para a obtenção de colônias isoladas para os ensaios.

4.3. Padronização de protocolo para a formação de biofilme

Iniciamos a padronização do protocolo de formação de biofilme, com a intenção de verificar qual concentração celular seria mais propícia para formar o biofilme. As células planctônicas foram crescidas em placa de Petri contendo ágar Sabouraud (Merk S/A) modificado (suplementado com 0,5% de Tween 80 (Synth), 0,5% de azeite) a 32 °C, por 24 h. Após esse período uma colônia foi transferida para 5 mL de caldo Sabouraud modificado (suplementado com 0,5% de Tween 80 (Synth), 0,5% de azeite e

2% de DMSO (Sigma-Aldrich)), onde permaneceu sob agitação a 150 rpm, a 32 °C por mais 24 h. Após esse período, a quantificação foi feita por contagem de células em câmara de Neubauer (Optik Labor) com o auxílio de um microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). O ensaio foi realizado em placas de cultura de células de 96 poços, fundo reto (Kasvi), contendo concentrações de células que variavam de 10^3 até 10^7 células/mL, com o intuito de identificar a faixa mais adequada para iniciar o processo de aglomeração celular e formação de biofilme. Posteriormente, aprofundamos a análise para determinar o tempo requerido para o início da formação de biofilme, observando o crescimento celular por 24 e 48 h. Para assegurar os parâmetros encontrados, conduzimos o ensaio por triplicatas em cada parâmetro específico (SILVA *et al.*, 2021).

4.4. Identificação dos microrganismos presentes no biofilme polimicrobiano

Inicialmente foram feitos diferentes inóculos das cepas 153DR5 e 154DR8 crescidas da presença de 50 µg/mL do antifúngico anfotericina B (Sigma–Aldrich) e também na presença de 50 µg/mL de ampicilina (Sigma–Aldrich). As células foram incubadas por 24 h, a 150 rpm, a 32 °C.

Para identificar a presença das leveduras no biofilme polimicrobiano, utilizamos a sonda fluorescente Calcofluor White (Sigma–Aldrich) que cora estruturas contendo quitina de modo que elas fiquem fluorescentes sob luz ultravioleta. As leveduras e bactérias isoladas e na formação do biofilme polimicrobiano, foram incubadas por 5 min a 30° C no escuro, com 10 µL de Calcofluor White. Após o período de incubação, as células foram examinadas em microscópio óptico (Axioplan. A2, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros de fluorescência (excitação 365 nm; emissão 397 nm) e acoplado a uma câmera AxioCAM MRc5 (Zeiss). As imagens capturadas e processadas utilizando o software Axiovision versão 4.0 (Zeiss).

A identificação das cepas de leveduras *Malassezia furfur* presentes nos biofilmes, já havia sido realizada previamente por Silva *et al.* (2021), através do sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer).

Para a identificação das bactérias presentes no biofilme polimicrobiano, seguimos a metodologia proposta por Bierhals *et al.* (2020). Neste método, inóculos foram preparados e, após um período de incubação de 24 h, demos início à extração do DNA genômico. No processo de extração do DNA bacteriano utilizamos o kit "Genomic DNA from soil" (Macherey-Nagel) e foi feita de acordo com o fabricante.

Uma solução de lise foi adicionada para romper as células bacterianas, liberando o DNA. Para evitar a degradação do DNA por nucleases presentes na amostra, foram adicionados inibidores de enzimas. A amostra foi então centrifugada para separar os componentes celulares e outras partículas indesejadas do DNA liberado. A solução resultante, contendo o DNA, foi transferida para uma coluna de extração presente no kit. Nessa coluna, o DNA foi retido por uma matriz, enquanto impurezas foram eliminadas por meio de lavagens com PBS. Após as lavagens, o DNA foi eluído da coluna, adicionou-se um tampão de eluição ou água estéril. Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA). O NanoDrop® também foi utilizado para avaliar a pureza das amostras. Além disso, foi realizada uma análise da integridade das amostras em gel de agarose 1% com brometo de etídio, visualizando-as sob luz UV no transluminador L-Pix Image EX (Loccus Biotecnologia, BR). Por fim, o DNA extraído foi armazenado em refrigeração para preservação.

Para avaliar a eficácia do DNA extraído, procedeu-se à amplificação por PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Foram empregados primers universais para a identificação do gene 16S bacteriano. A composição da reação incluiu concentrações de 10 µL de TaqMan Universal PCR, 0,25 µM de cada primer e sonda, 2 µL de amostra (padronizadas em aproximadamente 1 ng/µL) e água estéril isenta de DNase/RNase, totalizando um volume final de 20 µL. A amplificação foi conduzida no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems®). Já as sequências parciais geradas a partir do processo de sequenciamento foram examinadas utilizando o software Geneious Prime® (v2020.1.2). A sequência consenso resultante foi alinhada e comparada com outras sequências depositadas no Banco de Dados GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4.5. Avaliação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos sobre biofilme polimicrobiano pré-formado e determinação da CMI

A atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2021), com modificações. Inicialmente os microrganismos foram crescidos como descrito no item 4.3. Em seguida, a quantificação foi feita por contagem de células em câmara de Neubauer (Optik Labor) com o auxílio de um microscópio óptico

(Axioplan, Zeiss). O ensaio foi realizado em placas de cultura de células de 96 poços, fundo reto (Kasvi), contendo os peptídeos, as células na concentração final de 10^3 UFC/mL e um volume final de 150 μ L de caldo Sabouraud modificado. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 32 °C por um período de 48 h. Os peptídeos γ_{31-45} PvD_1^{++} e γ_{33-41} PvD_1^{++} foram avaliados em concentrações variadas para diluição seriada iniciando em 300 μ M. A CMI (concentração mínima inibitória) foi definida como a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento de microrganismos. O crescimento celular sem a adição dos peptídeos sintéticos também foi determinado. As leituras foram realizadas usando leitor de microplaca (EZ Read 400, Biochrom), a 620 nm. Todo o procedimento foi realizado em triplicata, sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar.

4.6. Análise da viabilidade celular do biofilme polimicrobiano

A análise da viabilidade celular foi avaliada segundo metodologia descrita por Soares *et al.* (2017). Após o período de 48 h do ensaio de inibição, as alíquotas de todas as condições testadas, foram retiradas e uniformemente espalhado, com o auxílio da alça de Drigalski, sobre a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud (Merck S/A). Em seguida, as placas foram incubadas a 32° C por mais 48 h. Ao término desse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram analisadas para cada espécie e cada condição, e as placas de Petri foram documentadas fotograficamente. O mesmo protocolo foi repetido para células não tratadas com os peptídeos sintéticos. Os experimentos foram executados em triplicata, e os resultados são apresentados considerando o controle como representante de 100% de viabilidade celular. A CMEB (concentração mínima de eliminação do biofilme) foi definida como a menor concentração dos peptídeos sintéticos, em μ M, que ocasiona a morte de 100% das UFC, após o período de incubação de 48 h.

4.7. Efeito dos peptídeos sintéticos na permeabilização da membrana plasmática

A avaliação da permeabilização da membrana foi conduzida por meio de microscopia óptica de fluorescência, utilizando a sonda *Sytox Green*, sendo esse um corante de alta afinidade a ácidos nucleicos. O teste foi conduzido conforme explicado na seção 4.5. Após o período de 48 h, as células tratadas com 37,5 μ M dos peptídeos γ_{31-45} PvD_1^{++} e γ_{33-41} PvD_1^{++} , 300 μ M de γ_{33-41} PvD_1^{++} e também as células não tratadas (controle), foram incubadas com 0,2 μ M de *Sytox Green* (Invitrogen) por 10 min, ao

abrigo da luz e sob agitação constante de 500 rpm a 30 °C. Em seguida, alíquotas de células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por microscopia de contraste diferencial (DIC) e por microscopia de fluorescência utilizando uma câmera Axio Cam MRc5 (Zeiss), onde as imagens foram analisadas no software Axiovision versão 4.0. As fluorescências foram realizadas utilizando um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína, com excitação no comprimento de onda entre 450 nm – 490 nm e emissão de 500 nm, acoplados ao microscópio (THEVISSSEN *et al.*, 1999).

4.8. Avaliação da estrutura secundária dos peptídeos sintéticos em solução e em modelo de membranas por dicroísmo circular (CD).

Os experimentos de CD foram realizados a 20 °C em um espectropolarímetro (Jasco J-815) usando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram registrados a 100 nm/min de 280 nm a 190 nm e uma média foi obtida a partir de 6 varreduras para cada espectro. A largura de banda e o tempo de resposta foram ajustados, respectivamente, para 1 nm e 2 s. As medições de CD de 50 µM dos peptídeos $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ foram feitas em tampão (10 mM HEPES, 5 mM MES, pH 6,5), na presença de grandes vesículas unilamelares (LUVs): 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina/1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPC/POPG) 3/1 (mol/mol) a 0,5 mM e 1,0 mM e 50% e 91% (v/v) de solução de trifluoreto de etila (TFE). Os espectros finais foram obtidos subtraindo-se os espectros das amostras de controle adquiridas nas mesmas condições. Os dados foram processados no CDToolX (MILES *et al.*, 2018) e convertidos em elipticidade de resíduo molar $[\theta]$ (em graus $cm^2 dmol^{-1}$). A análise da estrutura secundária foi realizada usando o método CCDSTR junto com o banco de dados do conjunto de referência 4 (SREERAMA e WOODY, 2000) no servidor *DichroWeb* (WHITMORE e WALLACE, 2007). A qualidade dos ajustes foi avaliada investigando o desvio quadrado médio da raiz normalizada (NRMSD) e por inspeção visual dos espectros calculados. LUVs de 100 nm de diâmetro de fosfolipídios selecionados POPC e POPG (Avanti Polar Lipids, Inc.) foram preparadas conforme descrito por Crusca *et al.* (2018).

4.9. Efeito dos peptídeos sintéticos na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para investigar se os peptídeos sintéticos induzem estresse oxidativo nas células do biofilme pré-formado, utilizamos a sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Calbiochem) para a medição de ROS intracelulares, seguindo a metodologia de Mello *et al.* (2011). Após o ensaio de inibição, conforme descrito na seção 4.5, uma alíquota das células tratadas com 37,5 µM dos peptídeos $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$, 300 µM do peptídeo $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e das células não tratadas (controle) foi incubada com 20 µM da sonda H₂DCFDA por 30 min, ao abrigo da luz e sob agitação constante de 500 rpm, a 30 °C. Após esse período, as células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por microscopia de contraste diferencial (DIC) e microscopia de fluorescência utilizando uma câmera Axio Cam MRc5 (Zeiss). As imagens foram processadas no software Axiovision versão 4.0, sendo as fluorescências realizadas com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína, com excitação entre 450 nm – 490 nm e emissão de 500 nm, acoplados ao microscópio.

4.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o ensaio de inibição do crescimento conforme a seção 4.5, as células foram fixadas em uma solução aquosa composta por 0,5% de formaldeído, 0,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Este procedimento ocorreu em um estufa circulante a 37 °C por 30 min.

Posteriormente, as células foram submetidas a uma nova solução fixadora contendo 1,5% de formaldeído, 1,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, permanecendo em estufa circulante a 37 °C por mais 30 min. A última etapa de fixação foi realizada em uma solução contendo 2% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, mantida à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas a três lavagens em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, cada uma com duração de 45 min.

A pós-fixação foi conduzida utilizando ósmio tetroxido e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 1 h à temperatura ambiente. As células foram submetidas novamente às etapas de lavagem descritas anteriormente. O processo de desidratação foi realizado por meio de uma série crescente de solvente cetônico (20%, 40%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100% superseco - 30 min em cada etapa). Subsequentemente, as células foram

submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ (CPD 030, Baltec), montadas em stubs com auxílio de fita adesiva de carbono de 8 MM e revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de paládio (SCD 050, Baltec). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG, FEI) a 20 Kv (MACHADO *et al.*, 2020).

4.11. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células foram também analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, após o ensaio de inibição do crescimento descrito na seção 4.5. Inicialmente, as células foram fixadas e pós-fixadas como descrito anteriormente, no item 4.10.

Por fim, a imersão da amostra em resina foi realizada, na qual o material permaneceu até a completa polimerização. Em seguida, removeu-se o excesso de resina polimerizada para expor o material de estudo, permitindo seu subsequente fatiamento no ultramicrotomo. A ultramicrotomia é um método empregado para o corte de espécimes em fatias ou seções extremamente finas. As amostras tratadas e não tratadas foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400 Plus) a 120 Kv (DUARTE *et al.*, 2021).

4.12. Efeito dos peptídeos sintéticos na viabilidade de macrófagos e monócitos

As células de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC, TIB-71) e a linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (ATCC, TIB-202) cresceram a 37 °C com 5% de CO₂ em DMEM-F12 suplementado com 10% de FBS e gentamicina (50 µg/mL).

As células foram semeadas separadamente em placas de cultura de tecidos de 96 poços (1 x 10⁵ células/mL) e incubadas com os peptídeos $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 µM por 24 h. Após esse período, 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço e incubados por mais 2 h a 37 °C em 5% de CO₂. Em seguida, para células RAW 264,7, a solução de MTT foi cuidadosamente aspirada, enquanto para células THP-1, a placa de 96 poços foi primeiro centrifugada a 400 x g, 4 °C por 5 min e a solução de MTT foi removida. Após, 100 µL de isopropanol acidificado foram adicionados para dissolver o formazan cristalino formado. A absorbância foi medida a 570 nm e a absorbância para correção de fundo foi determinada a 620 nm usando leitor de microplaca (EZ Read 400, Biochrom) A cultura de células não tratadas foi usada como controle positivo e células tratadas com detergente Triton X-100 a 1% como controle negativo. A porcentagem de viabilidade

celular foi calculada da seguinte forma: % viabilidade celular = $100 \times (\text{experimental ABS} - \text{controle de viabilidade negativo}) / (\text{controle de viabilidade positivo} - \text{controle de viabilidade negativo})$. A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi definida como a concentração de peptídeo (μM) que reduziu a viabilidade celular em 50% e foi estimada por análise de regressão não linear (MOSMANN *et al.*, 1983).

4.13. Atividade hemolítica dos peptídeos sintéticos

A atividade hemolítica dos peptídeos $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ foi determinada contra glóbulos vermelhos de carneiro desfibrinados (sRBCs) usando a metodologia descrita por Oren e Shai (1997) com modificações. Os sRBCs desfibrinados foram lavados com solução salina (0,15 M NaCl) por centrifugação por 10 min a 2400 x g e ressuspenso em solução salina. Os peptídeos foram preparados em microtubos contendo solução salina. Posteriormente, 50 μL dos peptídeos $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 μM foram incubados a 37 °C por 1 h com 50 μL da suspensão de sRBC (concentração final de eritrócitos, 1% v/v). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2400 x g por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um poço em uma microplaca de 96 poços. O conteúdo de hemoglobina livre foi medido a 405 nm, usando leitor de microplaca (EZ Read 400, Biochrom). Uma solução contendo 1% de Triton X-100 foi usada como controle positivo de hemólise (C+) e eritrócitos em solução salina foram usados como controle negativo (C-). Três experimentos independentes foram realizados para cada condição. A porcentagem de atividade hemolítica foi calculada assumindo que o controle positivo representa 100% de hemólise de acordo com a fórmula: % de atividade hemolítica = $100 \times (\text{peptídeoABS405} - \text{C-ABS405}) / (\text{C+ ABS405} - \text{C-ABS405})$. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi definida como a concentração de peptídeo (μM) que causou hemólise em 50% e foi estimada por análise de regressão não linear. Os resultados apresentados são valores médios obtidos em três experimentos, realizados em triplicata. Curvas dose-resposta foram construídas e *** p<0,001 em relação ao grupo tratado com Triton X-100 (100% de atividade hemolítica) pelo teste de Tukey.

4.14. Análise estatística

Os dados foram relatados como média ± erro padrão e avaliados por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey. Softwares: Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 8.

4.15. Descarte de rejeitos

O material foi descartado conforme Resolução CIBIO nº 02 de 31 de julho de 2019, item 17: “Os resíduos gerados como culturas e estoques de microrganismo, meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas, amostras biológicas, devem ser acondicionados de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado, que poderá ser um processo físico ou outro que venha a ser validado para obtenção de redução/eliminação da carga microbiana”.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização de protocolo para a formação de biofilme

Constatamos que, com o tempo de incubação de 24 h, todas as concentrações celulares testadas (10^3 a 10^7 células/mL) já haviam formado biofilme. Desta forma, determinamos a concentração de 10^3 células/mL e o período de incubação de 24 h, como ideais para a formação de biofilmes pré-formados. Essas condições padronizadas foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

5.2. Identificação dos microrganismos presentes no biofilme polimicrobiano

Nos inóculos onde foi adicionado anfotericina B, observamos apenas a presença de bactérias. Já nos inóculos em que adicionamos ampicilina, observamos apenas o crescimento de leveduras. Esse resultado foi obtido tanto para a cepa 153DR5 (Figura 3), quanto para a cepa 154DR8 (Figura 4). Nas imagens obtidas por DIC é possível observar uma morfologia celular diferente, com as células bacterianas apresentando formato de bastão e as células fúngicas apresentando formato leveduriforme em ambas as cepas.

Após a incubação com a sonda fluorescente Calcofluor White, vimos que as células isoladas de *M. furfur* na cepa 153DR5 (Figura 3) apresentaram marcação pelo corante, enquanto que para as células bacterianas isoladas não foi observada marcação. No entanto, ao analisarmos as células do biofilme polimicrobiano formado, observamos marcação pela sonda (Figura 3A).

O mesmo resultado foi observado para a cepa 154DR8, onde as células isoladas de *M. furfur*, apresentaram marcação fluorescente (Figura 4), enquanto as células

bacterianas isoladas, não apresentaram marcação. Já as células do biofilme polimicrobiano, foram marcadas pela sonda (Figura 4).

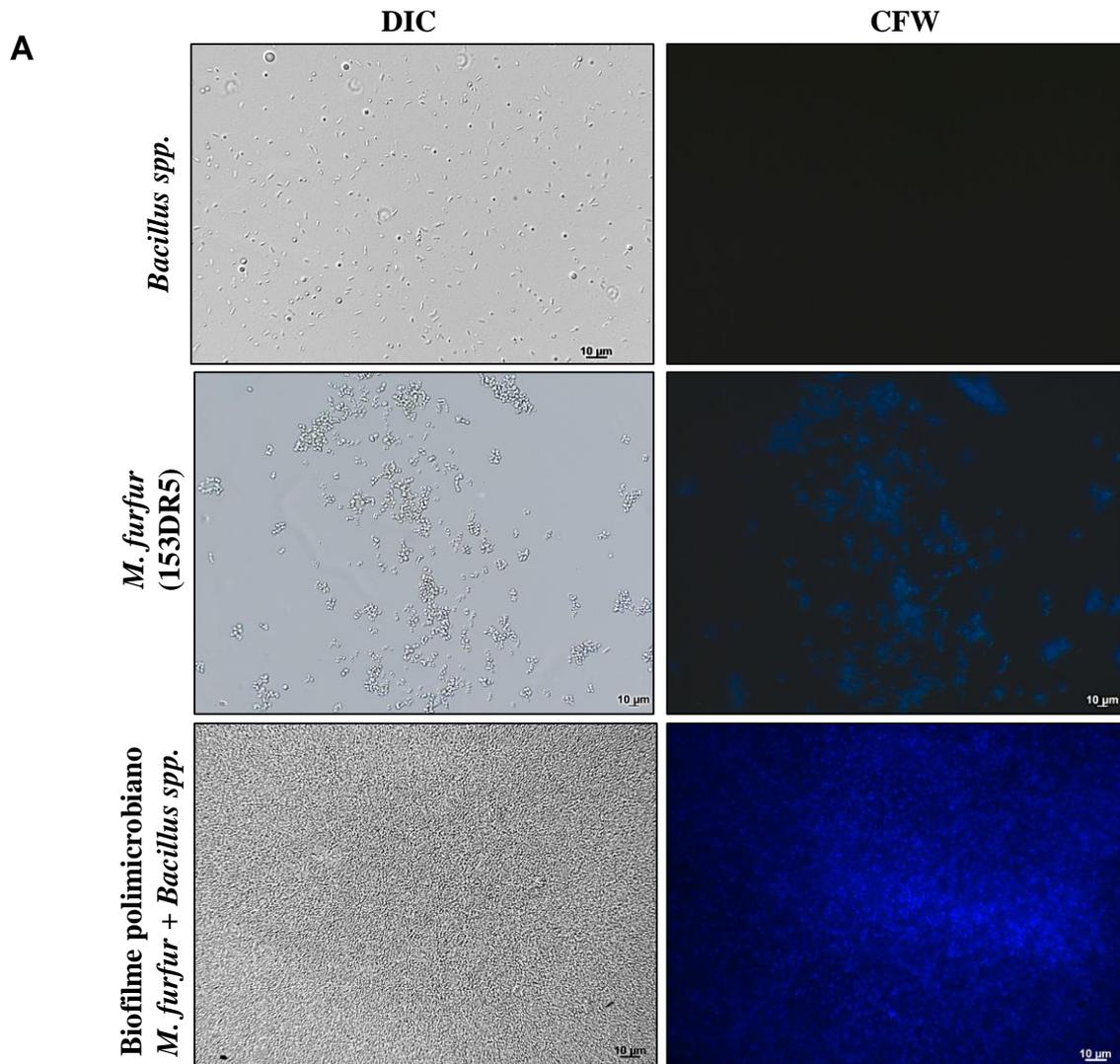


Figura 3: Imagens das células de microrganismos isoladas e em biofilme polimicrobiano. (A) Cepa 153DR5: células isoladas de *Bacillus spp.*, *M. furfur* e em biofilme polimicrobiano. Barras 10 μm . DIC = Contraste de Interferência Diferencial. CFW = Calcofluor White.

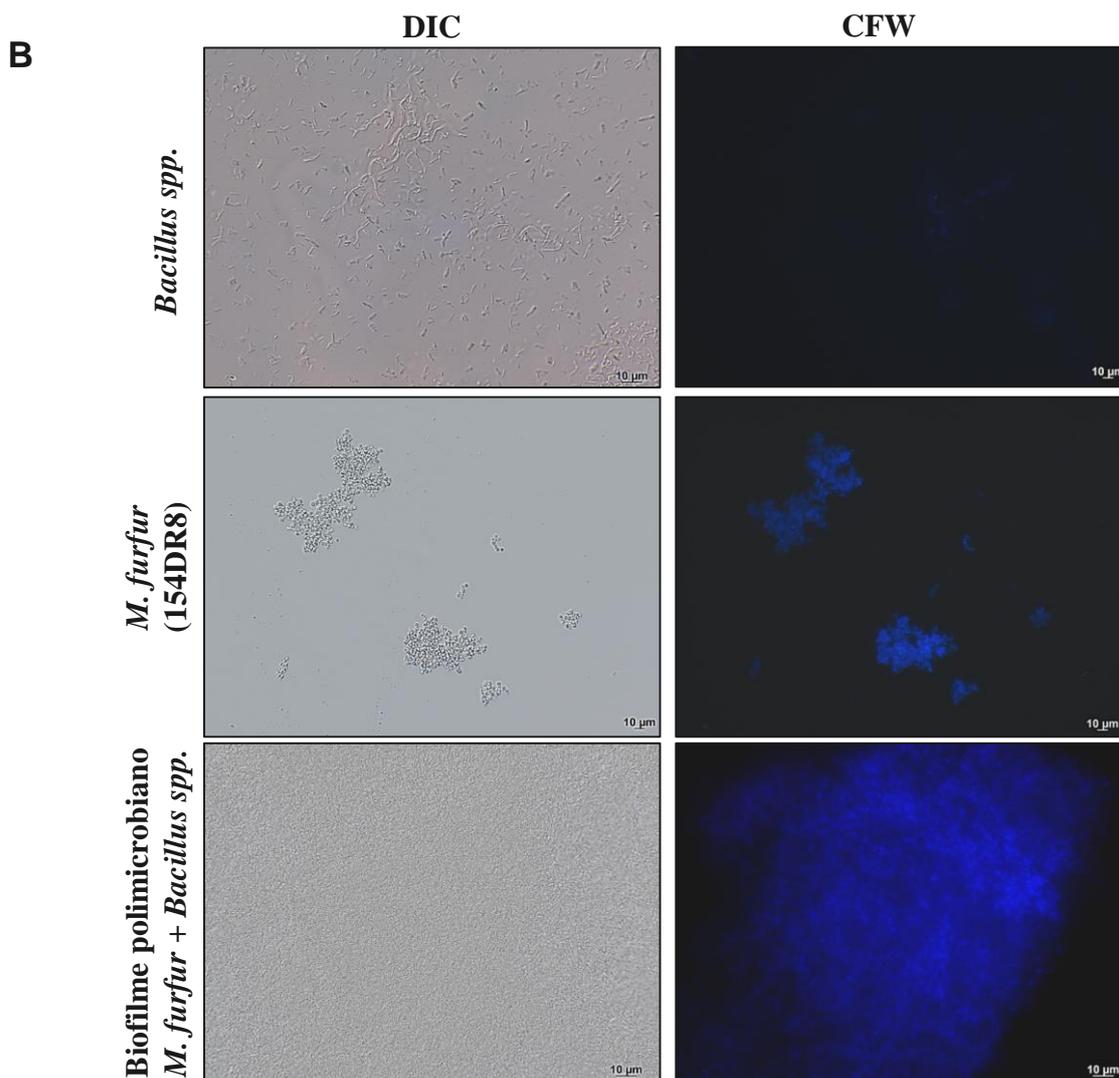


Figura 4: Imagens das células de microrganismos isoladas e em biofilme polimicrobiano. (B) Cepa 154DR8: células isoladas de *Bacillus spp.*, *M. furfur* e em biofilme polimicrobiano. Barras 10 μm . DIC = Contraste de Interferência Diferencial. CFW = Calcofluor White.

Por meio da análise da região 16S do DNA ribossômico, as bactérias isoladas das cepas 153DR5 e 154DR8 demonstraram uma maior afinidade genética com o gênero *Bacillus*. Ambas exibiram uma identidade genética acima de 99,8% com a espécie de referência *Bacillus subtilis* (Acesso GenBank OM807213.1 e MT613862.1, respectivamente) e superior a 99,8% com diversas cepas da mesma espécie de *Bacillus spp.* (Acesso GenBank MG470748.1), conforme indicado no alinhamento da sequência no banco de dados do NCBI (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação molecular dos isolados clínicos das cepas 153DR5 e 154DR8, através do sequenciamento da região 16S.

Isolado	Fragmento (pb)	Estirpe	Cobertura	Identidade	Nº de acesso do Genbank
153DR5	1430	<i>Bacillus subtilis</i> S1	100%	99,8%	OM807213.1
154DR8	1420	<i>Bacillus subtilis</i> UYY	99%	99,8%	MT613862.1

Fonte: elaborado pela autora

5.3. Avaliação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos sobre biofilme polimicrobiano pré-formado

Ao testarmos a atividade dos peptídeos sintéticos sobre o biofilme polimicrobiano, observamos que o peptídeo γ_{31-45} PvD_1^{++} foi capaz de inibir significativamente 100% da atividade de ambos os biofilmes, nas respectivas concentrações de 300, 150 e 75 μM . Já na concentração mais baixa, de 37,5 μM , o mesmo peptídeo inibiu 18,9 e 56,17% dos biofilmes 153DR5 e 154DR8, respectivamente (Figuras 5B e 5D).

Por outro lado, observamos que o peptídeo γ_{33-41} PvD_1^{++} , apresentou maior inibição apenas nas maiores concentrações. Na concentração de 300 μM desse peptídeo, o percentual de inibição foi de 29,5% para 153DR5 (Figura 5A) e 77,5% para 154DR8 (Figura 5C). Nas concentrações de 150 μM e 75 μM inibiram apenas 21 e 10%, respectivamente (Figura 5C). Com base nos resultados obtidos, foi possível determinar que a concentração mínima inibitória (CMI) para o peptídeo γ_{31-45} PvD_1^{++} foi 75 μM para ambos os biofilmes testados.

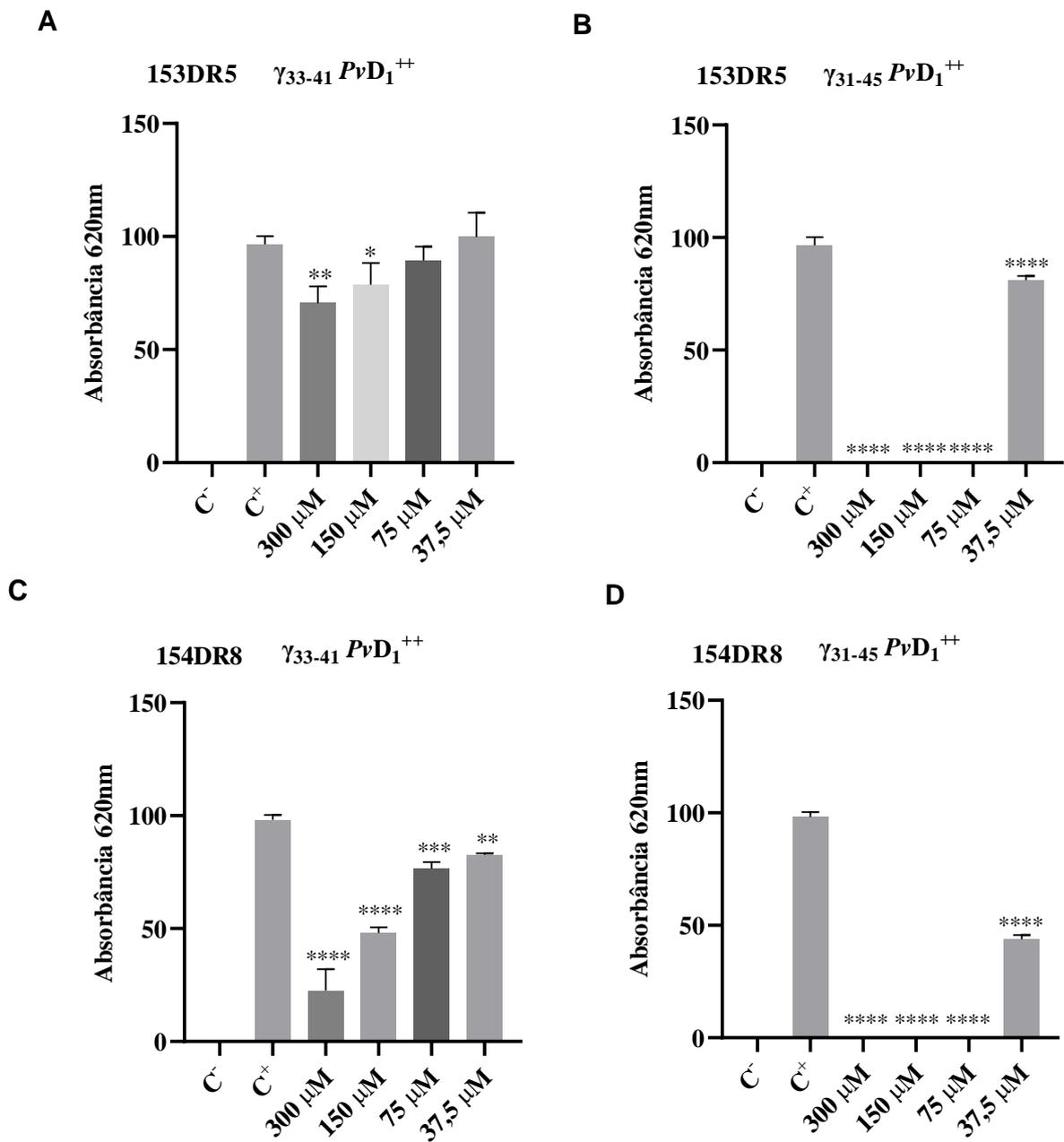


Figura 5. Avaliação do efeito inibitório dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ sobre biofilme polimicrobiano pré-formado, cepas 153DR5 e 154DR8. (A e B) Efeito inibitório dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ contra o biofilme 153DR5 (C e D) Efeito inibitório dos peptídeos $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ contra o biofilme 154DR8. C⁻: meio Sabouraud modificado. C⁺: meio Sabouraud modificado e células sem tratamento. Os valores são representados como média \pm desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) (n=3) em relação ao controle negativo.

5.4. Viabilidade Celular

Após observarmos que o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$, nas concentrações de 300, 150 e 75 μM , inibiu 100% do crescimento dos biofilmes 153DR5 e 154DR8, nós realizamos o teste de viabilidade celular. As células tratadas com o peptídeo apresentaram 100% de perda de viabilidade em todas as concentrações, mostrando que o peptídeo foi capaz de matar as células de microrganismos presentes no biofilme (Figuras 6A e 6B).

A partir desses resultados, todos os ensaios subsequentes foram realizados usando o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ na concentração de 37,5 μM , pois, nessa concentração, abaixo da CMI determinada, conseguimos obter quantidade razoável de células para análises por microscopia óptica e eletrônica. Adicionalmente, é relevante ressaltar que tanto a concentração mínima inibitória (CMI) quanto a CMEB (concentração mínima para eliminar o biofilme) é de 75 μM para peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ (Figuras 6A e 6B).

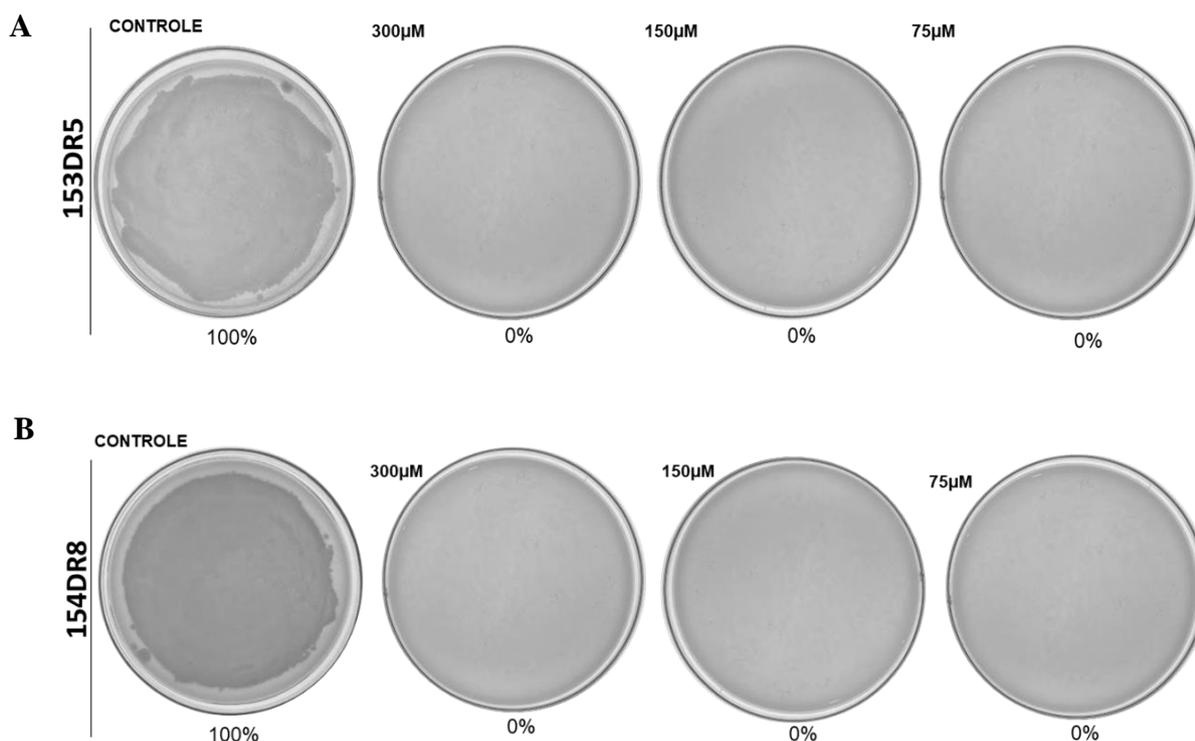


Figura 6. Imagens de placas de Petri exibindo a formação de colônias e a porcentagem de viabilidade celular na presença e na ausência de diferentes concentrações do peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ após 48 h de incubação. (A) Biofilme 153DR5, (B) Biofilme 154DR8. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.5. Efeito dos peptídeos sintéticos na permeabilização da membrana plasmática

Após a conclusão dos ensaios de inibição, iniciamos uma investigação voltada para a elucidação parcial do mecanismo de ação subjacente à inibição do crescimento do biofilme. As células presentes nos biofilmes 153DR5 e 154DR8 tratados com o peptídeo $\gamma_{31-45} Pvd_1^{++}$, na concentração de 37,5 μM , foram marcadas pela sonda *Sytox Green*. Nenhuma marcação foi observada nas células dos controles, indicando que o peptídeo foi capaz de permeabilizar a membrana das células e consequentemente, a marcação pelo corante. Além disso, nas imagens obtidas por DIC, foi evidenciada uma redução significativa no número de células e a ausência de formação do biofilme, quando comparado ao grupo controle (Figuras 7 e 8).

Adicionalmente, vimos que as células do biofilme 154DR8, na presença de 300 μM do peptídeo $\gamma_{33-41} Pvd_1^{++}$, também apresentaram marcação pela sonda fluorescente (Figura 9), revelando evidências de permeabilização da membrana dessas células.

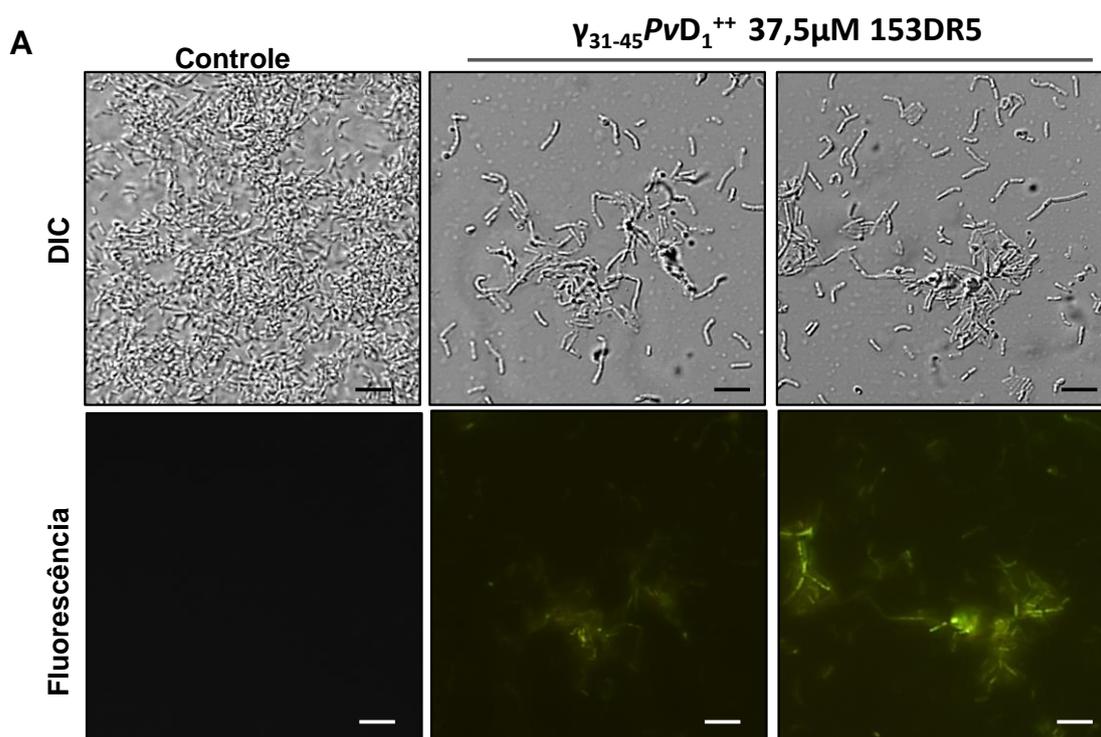


Figura 7. Imagens das células dos biofilmes 153DR5 após ensaio de permeabilização de membranas, usando a sonda fluorescente *Sytox Green*. (A) Células do biofilme 153DR5 tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45} Pvd_1^{++}$ a 37,5 μM . Barras 5 μm . DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

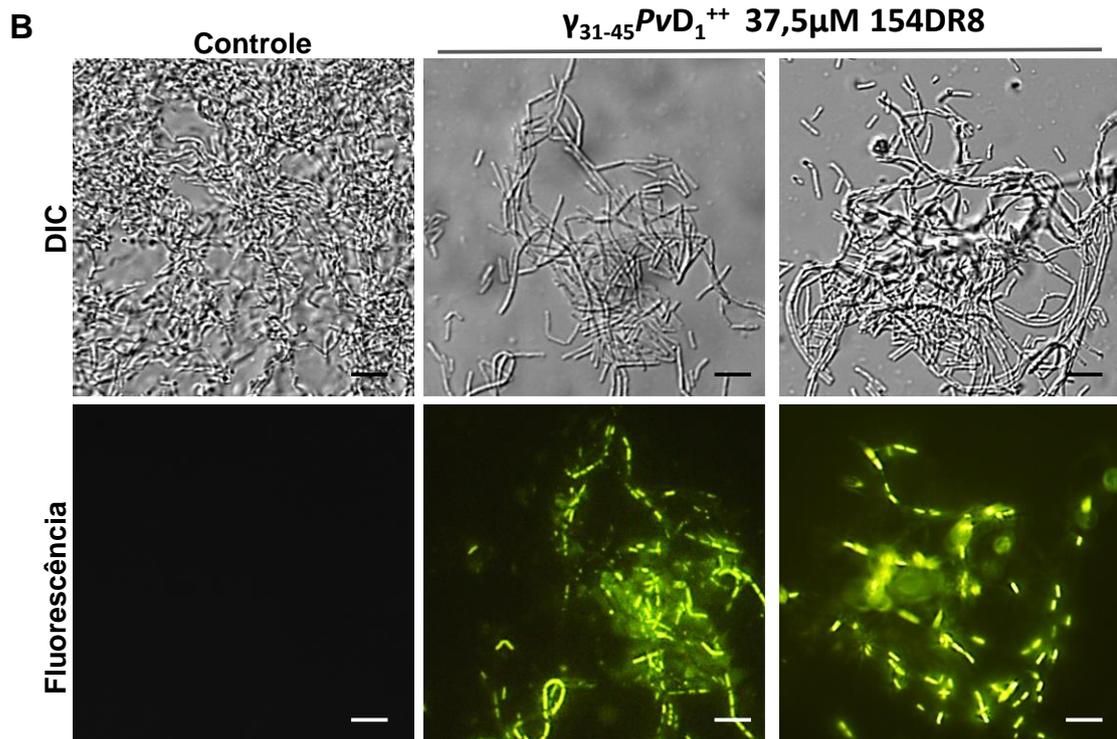


Figura 8. Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de permeabilização de membranas, usando a sonda fluorescente *Sytox Green*. (B) Células do biofilme 154DR8 tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$ a 37,5 μ M. Barras 5 μ m. DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

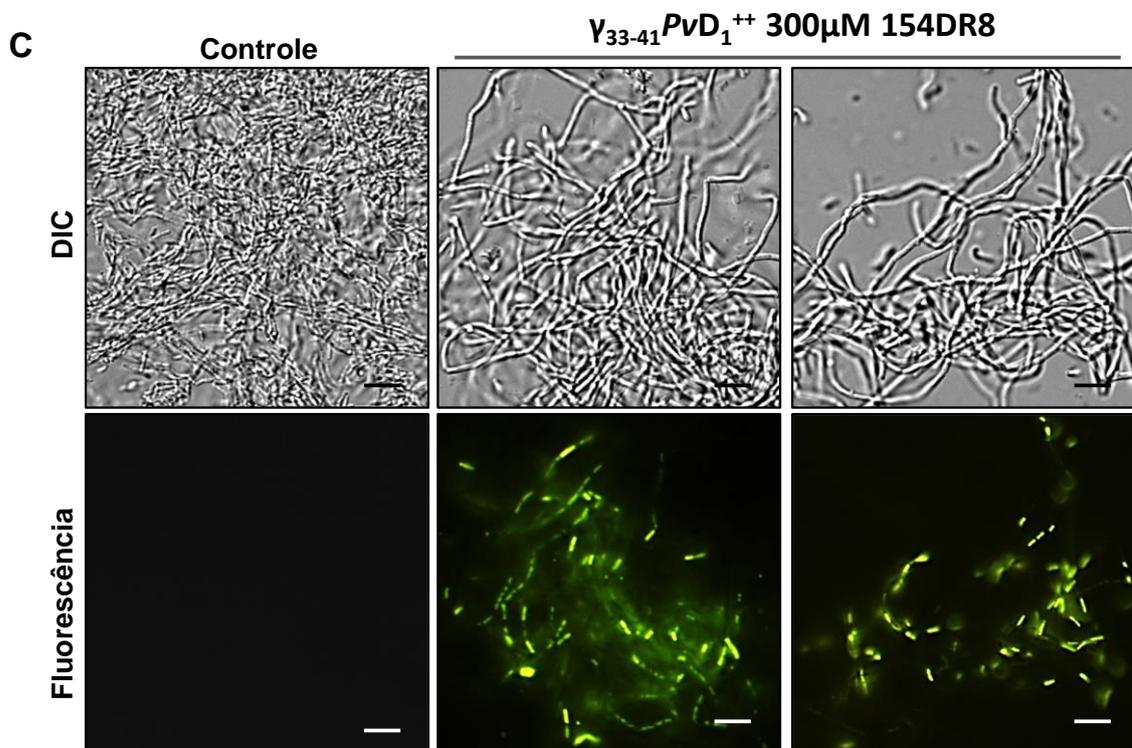


Figura 9. Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de permeabilização de membranas, usando a sonda fluorescente *Sytox Green*. (C) Células do biofilme 154DR8 tratadas com o peptídeo $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$ a 300 μ M. Barras 5 μ m. DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

5.6. Estrutura secundária dos peptídeos sintéticos em modelo de membranas

O espectro de CD do $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ em solução aquosa exibe um pico mínimo em 194 e 197 nm, respectivamente, característico de peptídeos que possuem uma conformação desordenada (Figuras 10A e 10B). Esse mesmo padrão foi observado para o peptídeo $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ na presença de TFE (Figura 10A). Por outro lado, é visto que o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ adquire uma estrutura secundária α -helicoidal na presença de 91% de TFE, com pico positivo em 193 nm e um pico negativo em 205 nm, características de peptídeos que adotam uma estrutura α -helicoidal (Figura 10B).

Na presença da POPC, ambos os peptídeos apresentam uma conformação desordenada, sugerindo a falta de mudança conformacional na presença de vesículas zwitteriônica (Figuras 10C e 10D). No entanto, na presença de vesículas aniônicas POPC-POPG, os peptídeos $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ formam aglomerados visíveis a olho nu. Essa aglomeração é uma indicação de interação dos peptídeos com as membranas compostas por POPC-POPG, o que pode sugerir uma alteração conformacional dos peptídeos ao se ligarem à membrana aniônica. Apesar do peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ não ter adquirido conformação em hélice na presença das vesículas, este peptídeo tem a propensão a formar hélice, evidente com o experimento com TFE (Figura 10A). Em contrapartida, a quantificação precisa dessa interação não pôde ser realizada devido à formação significativa de aglomerados na cubeta, impedindo a passagem de luz e sua captação pelo equipamento.

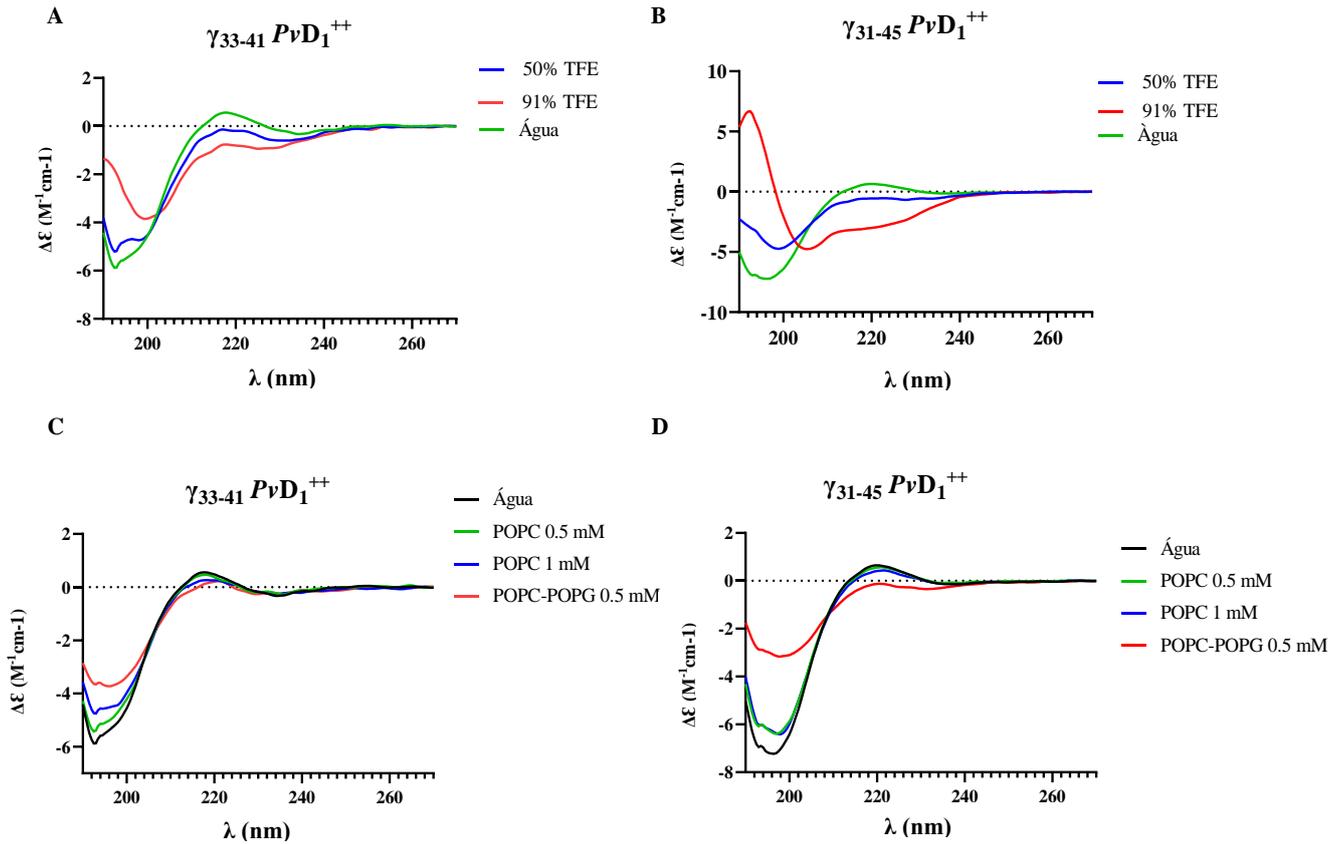


Figura 10. Análise da estrutura secundária. (A e B) Espectros de DC de 50 μM de $\gamma_{33-41} \text{PvD}_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} \text{PvD}_1^{++}$, respectivamente em água (linhas verdes), na presença de TFE 50% (linhas azuis), TFE 91% (linhas vermelhas). (C e D) Espectros de DC de 50 μM de $\gamma_{33-41} \text{PvD}_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} \text{PvD}_1^{++}$ em água (linhas pretas), 0,5 mM POPC (linhas verdes), 1,0 mM POPC (linhas azuis) e 0,5mM POPC-POPG (linhas vermelhas). Os espectros foram registrados a 20 °C e apresentados como elipticidade média por resíduo. Os espectros de CD de $\gamma_{33-41} \text{PvD}_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} \text{PvD}_1^{++}$ em POPC, POPC/POPG e TFE foram deconvoluídos usando o método CCDSTR e a base de dados de referência 4 no servidor DichroWeb.

5.7. Ensaio de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A avaliação do aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada utilizando a sonda 2'7' diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). Vimos que tanto as células do biofilme 153DR5 quanto as células do biofilme 154DR8, após o tratamento com 37,5 μM do peptídeo $\gamma_{31-45} \text{PvD}_1^{++}$, apresentaram-se marcadas pela sonda mostrando que o peptídeo causou um aumento da indução de ROS nas condições testadas. Já nas células do controle (crescidas na ausência do peptídeo), nenhuma marcação foi observada (Figura 11 e 12).

Nas imagens obtidas por DIC, observamos que o peptídeo $\gamma_{31-45} \text{PvD}_1^{++}$ causou uma diminuição significativa no número de células e impediu a formação de biofilme, quando comparado às células controle (Figura 11 e 12).

Além disso, observamos que o peptídeo $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ na concentração de 300 μM também foi capaz de causar um aumento na produção endógena de ROS nas células do biofilme 154DR8, enquanto que no controle, nenhuma marcação foi observada (Figura 13).

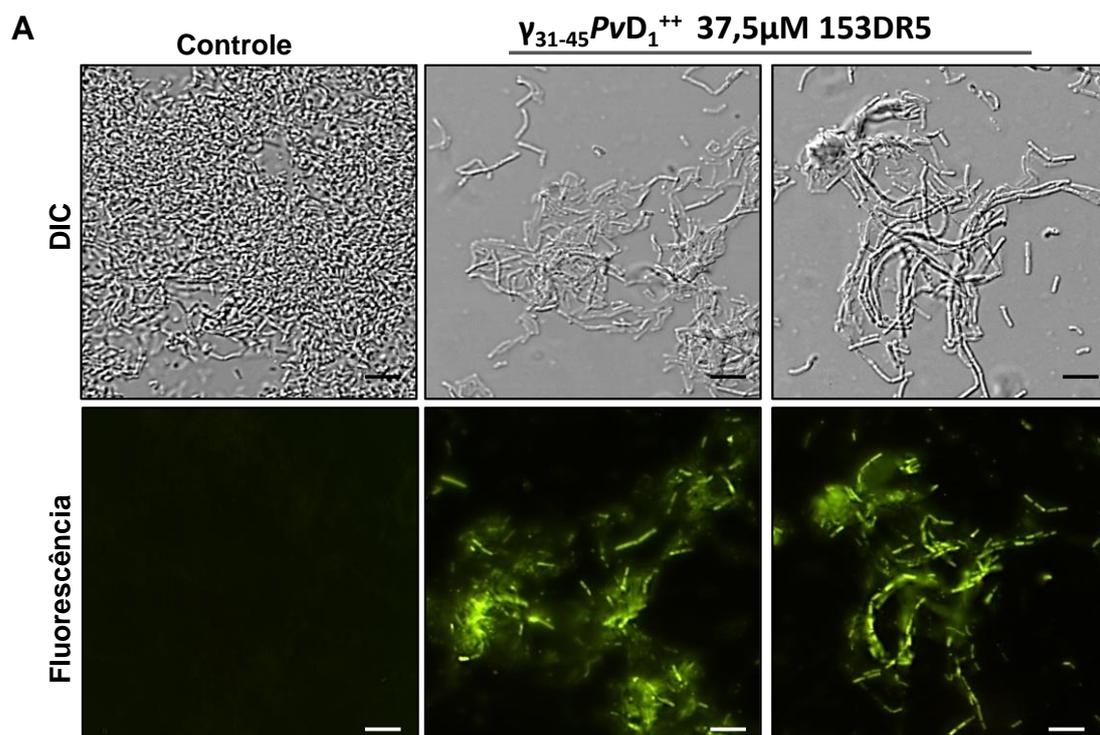


Figura 11. Imagens das células dos biofilmes 153DR5 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando a sonda diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). (A) Células do biofilme 153DR5 tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ a 37,5 μM . Barras 5 μm . DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

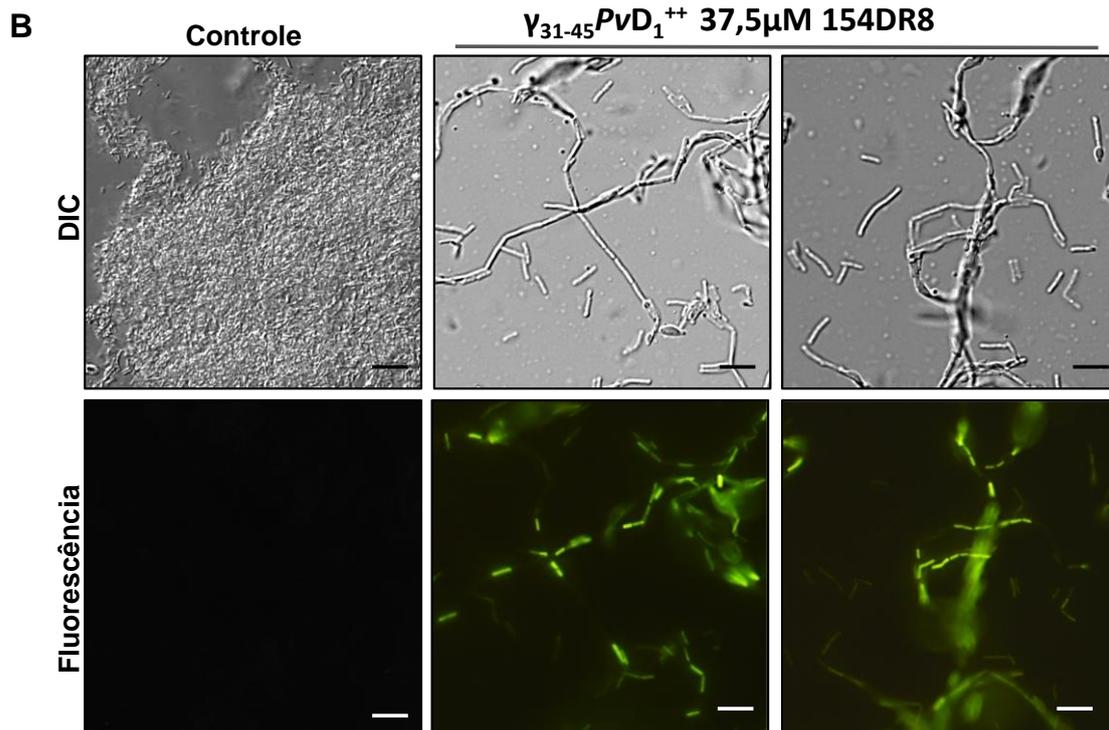


Figura 12. Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando a sonda diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). (B) Células do biofilme 154DR8 tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$ a 37,5 μ M. Barras 5 μ m. DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

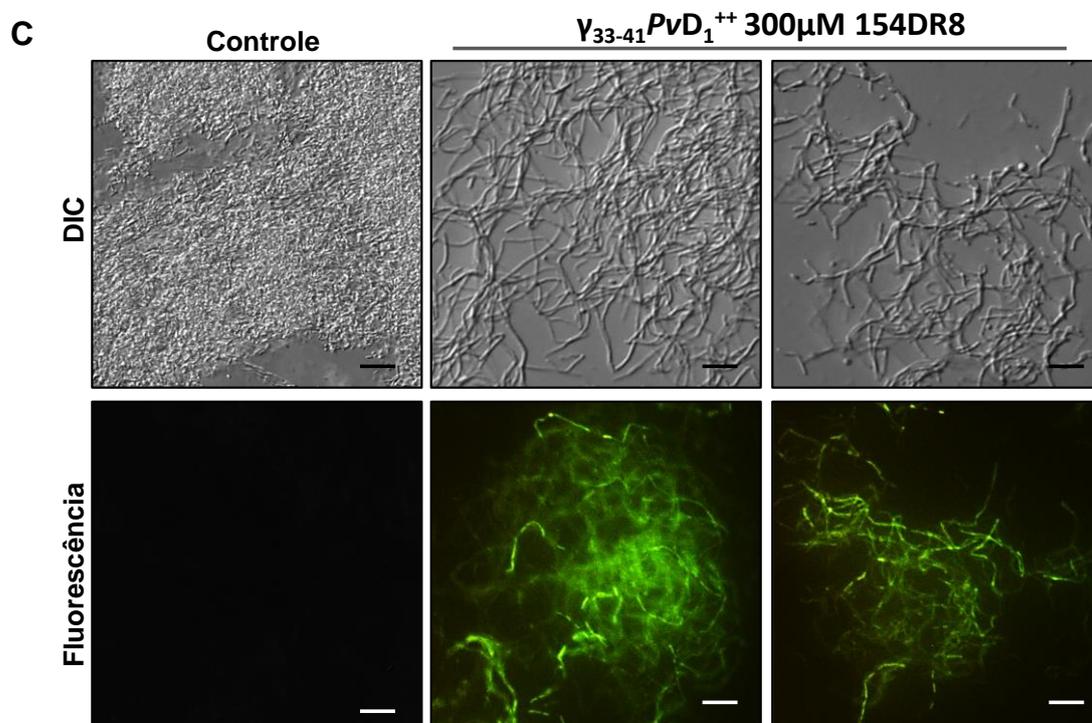


Figura 13. Imagens das células dos biofilmes 154DR8 após ensaio de indução endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando a sonda diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). (C) Células do biofilme 154DR8 tratadas com o peptídeo $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$ a 300 μ M. Barras 5 μ m. DIC = Contraste de Interferência Diferencial.

5.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A investigação foi realizada utilizando o biofilme 154DR8 tratado com o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$, na concentração de 37,5 μM . Nas imagens obtidas observamos a presença de células leveduriformes (leveduras) e também de células no formato de bastão (bactérias). Vimos também uma redução significativa no número dessas células na presença do peptídeo, se comparado ao controle. As células de controle (Figura 14/1^a coluna) mostraram a formação do biofilme polimicrobiano, apresentando uma superfície lisa, uniforme, sem rupturas aparentes, além de uma notória presença da matriz extracelular envolvendo essas células. No entanto, as células tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ (Figura 14/2^a coluna) apresentaram uma série de alterações em suas superfícies, como: múltiplas protrusões que podem ser *blebbings* de membrana, aparente perda de conteúdo citoplasmático e concolhimento celular, além de redução ou ausência da matriz extracelular envolvendo essas células.

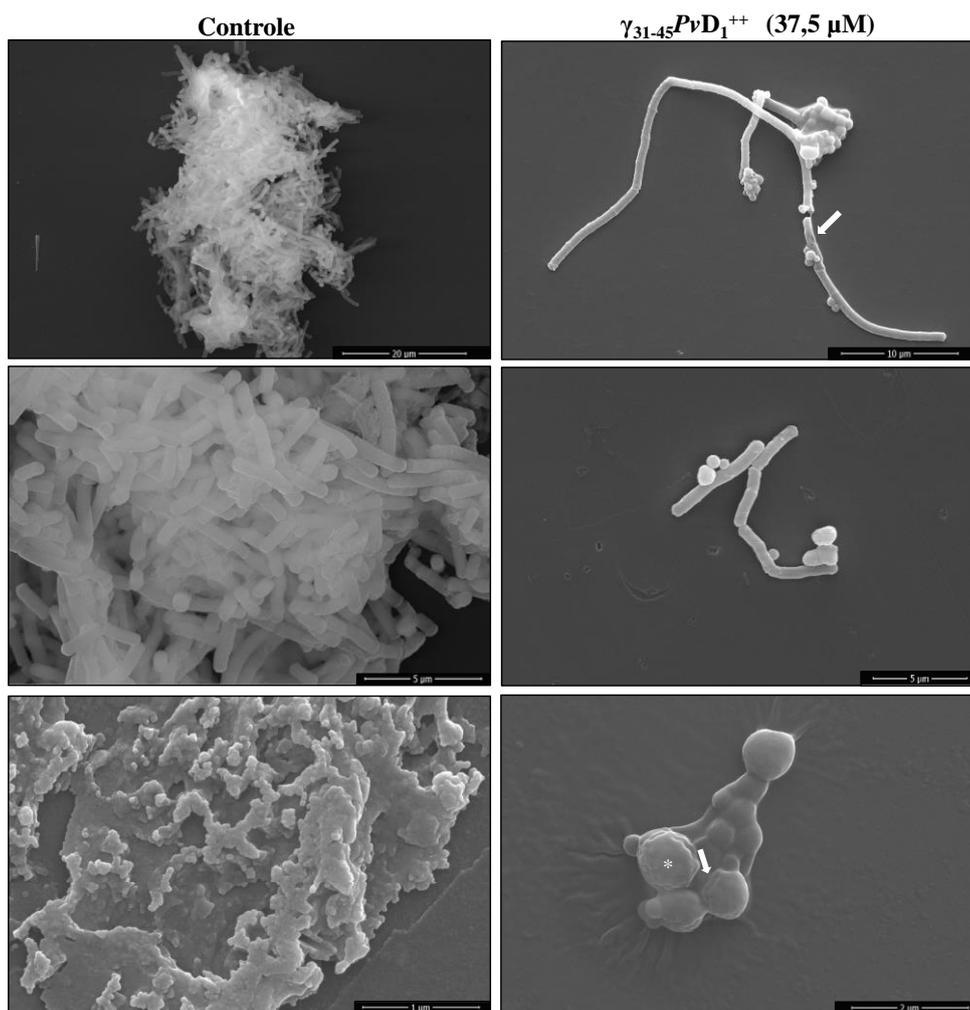


Figura 14. Imagens obtidas por MEV das células do biofilme 154DR8 tratadas e não tratadas (controle) com o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ na concentração de 37,5 μM . Asterisco: indica *blebbings* de membrana. Seta branca: indica possível perda do conteúdo citoplasmático e encolhimento celular.

5.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise foi conduzida com o biofilme 154DR8 tratado com o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$, na concentração de 37,5 μM . As imagens obtidas mostraram evidências da permeabilização da membrana das células tratadas com o peptídeo, se comparadas às células controle (Figuras 15E e 15B, respectivamente). Também podemos observar uma mudança da estrutura da matriz extracelular, que nas células do controle, está presente de uma forma mais contínua e uniforme ao redor das células (Figuras 15A e 15C), enquanto que nas células tratadas com o peptídeo, observamos apenas vestígios de matriz extracelular fragmentada (Figura 15F). No tratamento, também podemos observar possíveis resquícios de apoptose celular, o que demonstra a atividade do peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ sobre o biofilme polimicrobiano (Figura 15D).

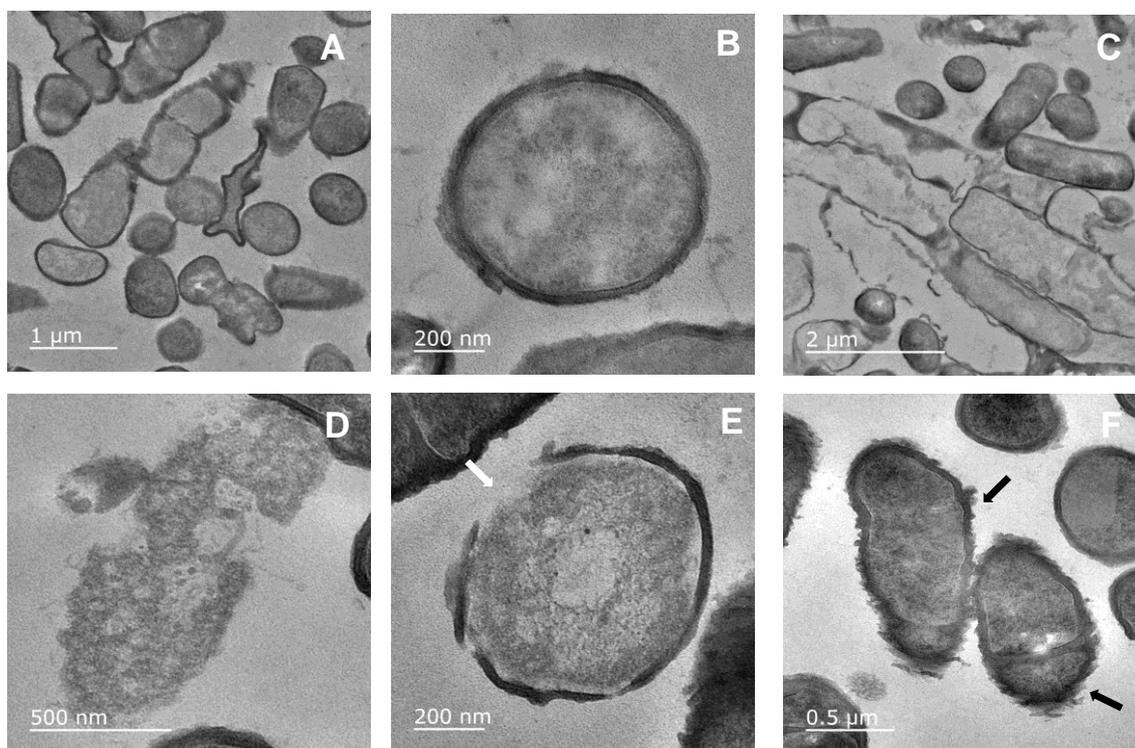


Figura 15. Imagens obtidas por MET das células do biofilme 154DR8 tratadas e não tratadas (controle) com o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ na concentração de 37,5 μM . (A) Biofilme formado com células de levedura, bacilos e moléculas poliméricas da matriz extracelular, (B) Célula de levedura com parede celular intacta utilizada como controle, (C) Imagem de uma conformação da matriz extracelular organizada de maneira padronizada, (D) Células tratadas com o peptídeo, aparentemente sofrendo apoptose, (E) Células leveduriformes, apresentando dano e rompimento da membrana citoplasmática após o tratamento com peptídeo e (F) Células envolvidas por resquícios de matriz extracelular fragmentada. Seta branca: indica rompimento da membrana citoplasmática. Seta preta: indica resquícios de matriz extracelular fragmentada.

5.10. Avaliação da toxicidade e atividade hemolítica dos peptídeos

Para avaliar a toxicidade dos peptídeos em células hospedeiras, monitoramos a viabilidade de macrófagos e monócitos, avaliando a capacidade dessas células metabolizar o MTT em cristais de formazan.

Na análise quanto à toxicidade dos peptídeos, observamos de maneira geral que $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ manifestam uma toxicidade muito reduzida para todas as linhagens celulares avaliadas (Figuras 16 e 17). O peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$, na concentração mais elevada (200 μM), apresentou uma taxa de toxicidade de 14% na linhagem de macrófagos RAW 264.7, enquanto que nas concentrações de 100, 50 e 25 μM demonstraram menos de 6% de toxicidade celular (Figura 16B). Em relação ao peptídeo $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$, observou-se uma taxa de toxicidade de 14% nas células na maior concentração, enquanto em 100 μM foi registrada uma taxa de 12%. As concentrações inferiores, como 50 e 25 μM , exibiram níveis reduzidos de toxicidade, atingindo 7 e 6%, respectivamente (Figura 16A).

Quanto à linhagem de monócitos THP-1, o peptídeo $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$, nas concentrações de 200 e 100 μM , apresentou apenas 17 e 15% de toxicidade, respectivamente, enquanto as concentrações menores permaneceram entre 9 e 7%, indicando uma capacidade reduzida de toxicidade (Figura 17A). Por outro lado, o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ exibiu uma taxa de 16% de toxicidade na linhagem THP-1 na concentração mais elevada testada, e nas concentrações de 100, 50 e 25 μM , apresentou 9, 4 e 7% de toxicidade, respectivamente (Figura 17B).

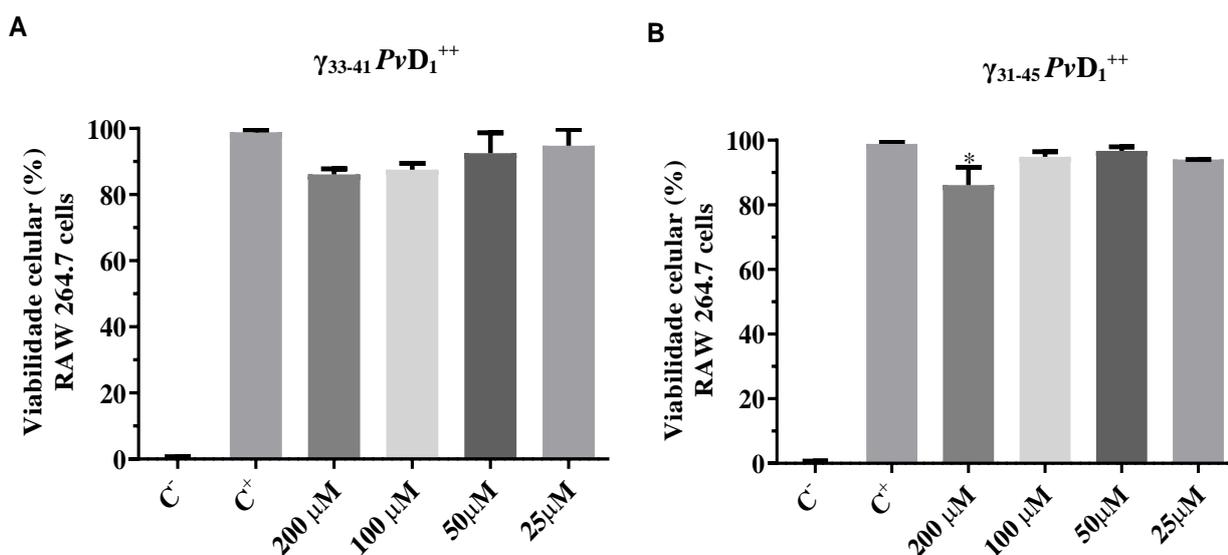


Figura 16. Avaliação dos peptídeos (A) $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e (B) $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ quanto à citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 plaqueados (5×10^5 células/mL) foram estimulados

por LPS (1 µg/mL) e tratados com as amostras nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL (em ordem crescente). Como controle positivo, foi utilizado a cultura de macrófagos somente estimulados por LPS e como controle negativo, a cultura de macrófagos estimulada e tratada com 1% de Triton X-100. Os valores são representados como média ± desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) ($n=3$) em relação ao controle negativo.

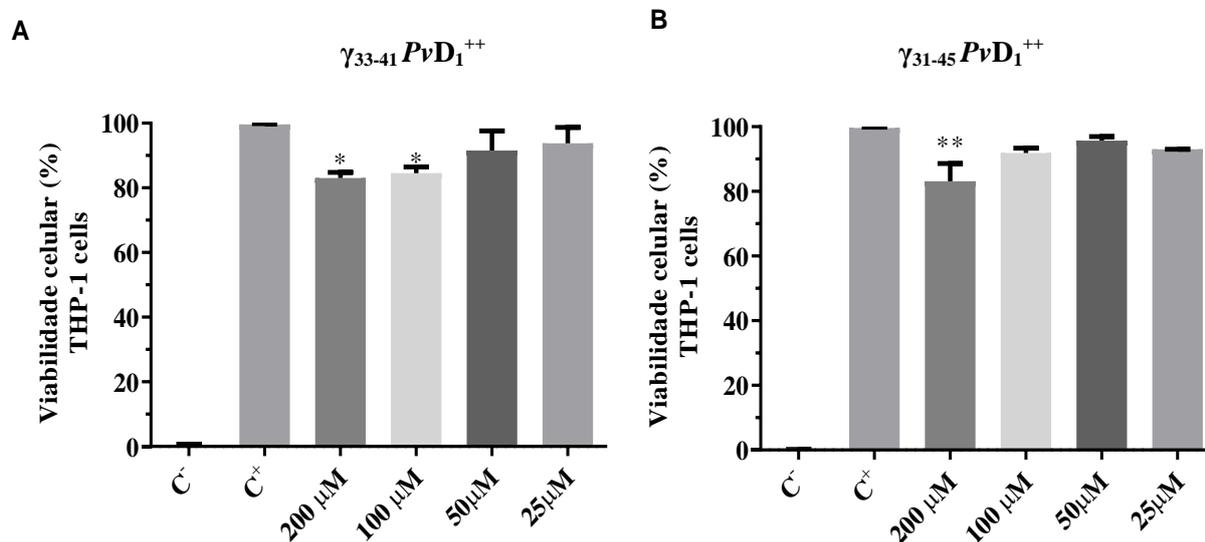


Figura 17. Avaliação dos peptídeos (A) γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ e (B) PvD₁⁺⁺ e γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ quanto à citotoxicidade em monócitos THP-1. As células foram tratadas com peptídeos nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 µM, e após 24 h, a viabilidade celular foi medida pelo método MTT. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo (C-), células tratadas com 1% (v/v) de detergente Triton X-100 (O.D. $0,12 \pm 0,01$, viabilidade celular - 0% em A e B), e ao controle positivo (C+), células não tratadas. Os valores são representados como média ± desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) ($n=3$) em relação ao controle negativo.

Também avaliamos a atividade hemolítica dos peptídeos γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ e γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ utilizando eritrócitos desfibrinados de carneiro, A atividade hemolítica observada para o peptídeo γ_{33-41} PvD₁⁺⁺ nas concentrações de 200 e 100 µM foi apenas de 2 e 1%, respectivamente, sendo que nas concentrações de 50 e 25 µM não houve nenhuma atividade (Figura 18A). Semelhante ao observado para o peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺, que nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 µM apresentou 4, 2, 1 e 0,5% de atividade, respectivamente (Figura 18B).

Esses resultados reforçam as evidências obtidas no teste de toxicidade com macrófagos e monócitos, indicando que a concentração necessária para causar 50% de citotoxicidade (CC₅₀) é > 200 µM (Tabela 2).

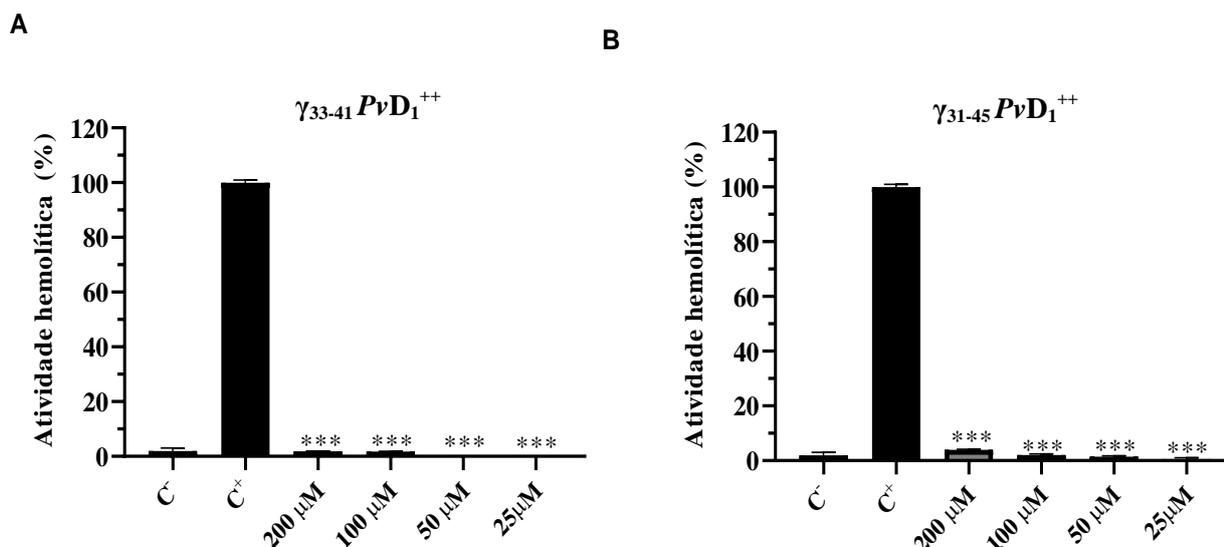


Figura 18. Atividade hemolítica dos peptídeos (A) $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$ e (B) $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$ em eritrócitos de carneiro. Os dados são apresentados como porcentagem de atividade hemolítica nas células tratadas com os peptídeos (200, 100, 50 e 25 μM), (C^-) controle negativo não tratado (NaCl 0,15 M) e (C^+) controle positivo tratado com 1% (v/v) de detergente Triton X-100 a 37 °C por 1 h. A porcentagem de atividade hemolítica foi calculada em relação ao controle positivo (atividade hemolítica - 100%) e ao controle negativo (atividade hemolítica - 0%). Os resultados apresentados são médias obtidas em três experimentos, cada um realizado em triplicata. Os valores são representados como média \pm desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) ($n=3$) em relação ao controle negativo.

Tabela 2. Valores de concentração citotóxica (CC_{50}) dos peptídeos $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$ e $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$ em células de macrófagos RAW 264.7, monócitos THP-1 e eritrócitos.

	CC_{50} (μM)		
	RAW 264.7	THP-1	Atividade hemolítica
$\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$	> 200	> 200	> 200
$\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$	> 200	> 200	> 200

Fonte: elaborado pela autora.

Obs.: Os resultados apresentados são médias obtidas em três experimentos, cada um realizado em duplicata para as células RAW 264.7 e THP-1 e triplicata para os eritrócitos de carneiro. Curvas de resposta foram construídas onde * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação com seus respectivos grupos de controle, determinado pelo teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

A resistência microbiana representa uma preocupação global na saúde pública, sendo vinculada à resistência natural ou adquirida de espécies aos antimicrobianos (GIONO-CEREZO *et al.*, 2020). O uso indiscriminado de antibióticos intensifica esse problema, afetando não apenas o ambiente imediato, mas todo o ecossistema (PECORARO, 2022). A formação de biofilmes por espécies mistas, como bactérias e fungos, é reconhecida como um desafio clínico, facilitando a invasão e disseminação

desses microrganismos nos hospedeiros (KHAN *et al.*, 2021). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) emergem como alternativas promissoras, demonstrando amplo espectro de atividade contra diversos patógenos (NAZARIAN-FIROUZABADI *et al.*, 2023). A aplicação desses AMPs se destaca pela especificidade na inibição de agentes patogênicos, com baixa toxicidade para as células hospedeiras e reduzida propensão ao desenvolvimento de resistência favorecendo a resposta imune do hospedeiro (RADEK e GALLO, 2007; MAGANA *et al.*, 2020). Uma estratégia fundamental para superar as limitações envolvendo o *design* racional e a síntese de AMPs bioinspirados é realizar o ajuste dos resíduos de aminoácidos para melhorar sua eficácia antimicrobiana, reduzir custos e minimizar a toxicidade, promovendo sua aplicação mais ampla como agentes antimicrobianos naturais (TAVERIA *et al.*, 2022). Este estudo visou aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação e características antibiofilme dos dois peptídeos modificados desenhados a partir da região do γ -core da defensina PvD₁ (Figura 2) (Mello *et al.*, 2019), considerando que a atividade de peptídeos antimicrobianos é influenciada por fatores como carga, tamanho e hidrofobicidade (YOU *et al.*, 2023).

A análise inicial deste estudo foi conduzida para identificar os microrganismos presentes nas cepas designadas como 153DR5 e 154DR8 (Figura 3 e 4). Por se tratarem de isolados clínicos, a observação microscópica revelou um padrão celular variado, destacando-se a movimentação de células de maneira incoerente com as características típicas de células fúngicas. Considerando o potencial risco de contaminação por outros microrganismos do ambiente circundante, especialmente em isolados clínicos da pele que abrigam diversas espécies de microrganismos comensais, a identificação dos microrganismos presentes permitiu avançar na elucidação dos microrganismos para os quais os peptídeos sintéticos poderiam gerar inibição e quais seriam as possíveis sinergias entre essas células quando em biofilme polimicrobiano (ARMOUTELI *et al.*, 2021). A compreensão desses sistemas resulta na análise aprofundada dos microambientes do biofilme, o que possibilita o desenvolvimento de abordagens terapêuticas abrangentes para evitar a formação de biofilme e combater aqueles que já se formaram, resultando em uma maior eficácia dos medicamentos (OSHIRO *et al.*, 2019).

Após a identificação das cepas, iniciamos os testes de atividade antibiofilme dos peptídeos. Os resultados obtidos na análise da atividade dos peptídeos sintéticos revelaram o potencial dessas moléculas como agentes antimicrobianos na fase inicial da formação do biofilme. O peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ destacou-se, demonstrando uma eficácia

consistente de matar 100% das células presentes em ambos os biofilmes (Figura 5B e 5D), impedindo a sua formação nas concentrações mais elevadas (300, 150 e 75 μM). Além disso, mesmo em concentrações mais baixas, como 37,5 μM (Figura 5B, 5D), exibiu uma inibição significativa dos biofilmes, sugerindo uma notável eficácia em doses menos concentradas. Por outro lado, o peptídeo $\gamma_{33-41} PvD_1^{++}$ apresentou um padrão de inibição mais expressivo apenas nas concentrações mais altas, indicando uma resposta menos efetiva em doses mais baixas (Figura 4A e 4C). A concentração mínima inibitória (CMI) de 75 μM para o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ (Figura 5B e 5D) reforça sua capacidade de inibir o crescimento do biofilme polimicrobiano, indicando que concentrações relativamente baixas são suficientes para obter um impacto significativo.

No estudo conduzido por Silva *et al.* (2020), a avaliação da atividade antibiofilme de peptídeos sintéticos derivados da profilina de *Spodoptera frugiperda* revelou resultados similares aos nossos. Esses peptídeos demonstraram eficácia contra biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentando uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 2,5 μM . Outros estudos realizados por Choi *et al.* (2013), com um peptídeo semelhante à lactoferrina B, derivado de *Scolopendra subspinipis* (centopeia), demonstrou resultados promissores para cepas formadoras de biofilme de *M. furfur* com uma CIM de 10–20 μM , embora apenas uma cepa tenha sido estudada. Esses achados sugerem que o *design* do peptídeo, incluindo a modificação na carga líquida positiva e o tamanho da sequência, desempenha um papel importante na sua eficácia da atividade dessas moléculas contra os biofilmes pré-formados mesmo em baixas concentrações (HANCOCK *et al.*, 2021).

Os resultados do teste de viabilidade celular fortalecem ainda mais a eficácia do peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ como um agente antifúngico e antibacteriano. A perda de viabilidade celular de 100% (Figura 6A e 6B) observada nas células tratadas com 300, 150 e 75 μM indica que o peptídeo foi capaz de matar as células fúngicas e bacterianas presentes nos biofilmes. Devido ao grande número de células e rápida formação de biofilme, não é possível quantificar as colônias existente no controle, uma vez que o espalhamento na placa de Petri se realiza de maneira uniforme, sem obtenção de colônias após 24 h. Diante desses resultados, a escolha de trabalhar com a concentração de 37,5 μM do peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ nos ensaios subsequentes é justificada pela obtenção de quantidades adequadas de células para visualização por microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão.

Neste trabalho, não nos limitamos apenas aos estudos dos testes antimicrobianos, mas também aos mecanismos envolvidos nessas atividades. Por isso, foi empregado o teste de permeabilização de membranas com *Sytox Green*. Após os ensaios de atividade antimicrobiana em biofilmes pré-formados, esse teste foi realizado a fim de avaliar a integridade da membrana celular, compreender o mecanismo de ação e visualizar diretamente os efeitos dos peptídeos sintéticos, especialmente em biofilmes, onde a resistência microbiana é ainda mais desafiadora. O corante *Sytox Green* é utilizado como um teste de viabilidade celular, conhecido por sua impermeabilidade em membranas íntegras, permitindo penetrar facilmente em células com membranas comprometidas (PEREIRA *et al.*, 2023).

Nas imagens de fluorescência, a marcação das células pela sonda foi nitidamente identificada e isso mostra que houve uma possível ruptura e dano dessas membranas em todas as concentrações testadas. A análise foi conduzida nos biofilmes tratados com o peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ a uma concentração de 37,5 μ M, escolhida com base no crescimento celular observado durante o experimento de inibição da formação de biofilme, que revelou indícios de permeabilização da membrana dessas células tal qual a menor concentração do peptídeo (Figura 7 e 8). Outros estudos na literatura demonstram que existe um aumento da permeabilidade da membrana, como em Dias *et al.* (2020), onde RcAlb-PepII, um peptídeo sintético bioinspirado na albumina 2S proveniente de sementes de *Ricinus communis* também apresentou maior permeabilização da membrana célula contra *Klebsiella pneumoniae* e *Candida parapsilosis*. No estudo conduzido por Almeida *et al.* (2021), a investigação da permeabilidade da membrana bacteriana foi realizada através da absorção do corante *Sytox Green* de semelhante modo ao nossos estudos, onde o peptídeo RQ18, um AMP sintético com notável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de leveduras do gênero *Candida*, demonstrou um aumento significativo em sua permeabilidade membranar.

Esses resultados são de grande importância uma vez que a capacidade de atravessar a membrana é um elemento essencial para o êxito terapêutico de um fármaco, impactando sua absorção, distribuição, potência e seletividade (SKRZYNIARZ *et al.*, 2023). Com esses resultados, foi dado seguimento para a melhor compreensão se a mudança de conformação desses peptídeos seria um dos mecanismos nessa atividade.

Com o objetivo de investigar quais seriam os possíveis motivos dessas permeabilização de membrana, optamos pelo uso do dicroísmo circular como método

para explorar propriedades estruturais e interações entre peptídeos sintéticos e biofilmes polimicrobianos, orientando a formulação de estratégias antimicrobianas (SOUSA, 2021). Neste estudo, o $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ mostrou interação significativa com o co-solvente TFE, que foi utilizado para induzir uma estrutura secundária em α -hélice nos peptídeos, contribuindo para a estabilização de sua conformação.

Os espectros de CD, obtidos em diferentes condições biológicas, validaram a dinâmica da estrutura secundária do $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$, exibindo variações em resposta ao ambiente de interação do peptídeo. A eficácia antibiofilme de $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ parece associar-se à permeabilidade iônica da membrana celular em biofilmes polimicrobianos, conforme descrito por Peixoto *et al.* (2017), no qual o óleo essencial de *Laurus nobilis* aumentou a permeabilidade da parede celular e da membrana iônica contra biofilmes de *Candida spp.* Estudos de Crusca *et al.* (2018), demonstram um aumento de permeabilidade de membrana de peptídeos sintéticos de Pantinina provenientes de veneno de escorpião, apresentando conformação de α -hélice em solução aquosa, TFE e na presença de diferentes vesículas lipídicas.

Essas descobertas aprimoram a compreensão da interação entre o peptídeo e as membranas, enfatizando a dinâmica e especificidade desse processo. Além disso, podemos sugerir que a alteração na conformação está possivelmente relacionada à permeabilização da membrana, fenômeno importante no vazamento intracelular e, conseqüentemente, na perturbação da homeostase celular, como previsto por Taveira *et al.*, 2022. No estudo citado, o peptídeo CaDef₂.1G27-K44, inspirado na defensina presente em frutos de *C. annuum*, ao se ligar a membros aniônicos, demonstrou uma modificação estrutural para uma α -hélice, o que evidencia o aumento na permeabilidade da membrana e correlação com sua atividade antifúngica.

Para melhor caracterizar a atividade antibiofilme desses peptídeos, avaliamos a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), mediante o uso da sonda fluorescente 2'7' diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). Essa sonda é classificada como uma sonda citoplasmática, indicando que sua entrada na célula acarreta na conversão para DCFH no citoplasma. Nessa região intracelular, a sonda participa da reação com espécies reativas de oxigênio, oferecendo uma abordagem sensível para a detecção e quantificação dessas espécies. Nossos resultados revelaram um aumento significativo na geração de ROS nos biofilmes 153DR5 e 154DR8 após a incubação com o peptídeo $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ (Figura 11 e 12).

Avaliar essa condição é importante uma vez que as ROS constituem moléculas altamente reativas, abrangendo peróxidos, superóxidos e radicais livres, desempenhando um papel essencial na resposta imune e na defesa contra patógenos (LENNICKE e COCHEMÉ, 2021). Diversos agentes antimicrobianos, incluindo peptídeos, têm a capacidade de desencadear a produção de ROS nas células-alvo que é importante na perspectiva da atividade antimicrobiana, já que a indução controlada de ROS pode ser um mecanismo eficaz. Esse aumento de ROS pode resultar em danos oxidativos às células microbianas, comprometendo suas membranas, ácidos nucleicos e proteínas (KAUSHIK *et al.*, 2022).

Em nossos resultados, foi observada uma redução expressiva no número de células e a ausência de formação de biofilme, quando comparado ao grupo controle. Nos estudos de Oliveira *et al.* (2019) também foi evidenciado que o peptídeo Mo-CBP3-PepIII, inspirado em uma proteína antimicrobiana das sementes de *Moringa oleifera*, provocou a formação de poros na membrana plasmática e a superprodução de ROS nas células de *C. parapsilosis*. De maneira análoga, o peptídeo RcAlb-PepII causou danos à membrana celular e estimulou a superprodução de ROS em *C. parapsilosis* (DIAS *et al.*, 2020). Esses resultados sugerem que a presença do peptídeo está associada a uma resposta intensificada de ROS, indicando um possível papel do peptídeo na indução de estresse oxidativo nas células do biofilme.

Para avaliarmos as células que apresentaram danos na membrana e produção de ROS quando tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$, empregamos a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Essa abordagem apresenta uma vantagem significativa, pois é capaz de fornecer imagens tridimensionais detalhadas, destacando as alterações morfológicas com alta resolução. A utilização de técnicas avançadas de microscopia possibilitou uma análise mais aprofundada e abrangente das potenciais modificações tanto nas células quanto na matriz extracelular. Isso resultou em uma compreensão mais profunda dos efeitos do peptídeo no biofilme polimicrobiano. Os resultados da análise das cepas tratadas com o peptídeo $\gamma_{31-45} PvD_1^{++}$ (Figura 14) revelaram alterações significativas nas células do biofilme polimicrobiano.

Na microscopia eletrônica de varredura, confirmamos a redução notável no número de células, tanto fúngicas quanto bacterianas, em comparação com as células de controle. As células de controle exibiam uma superfície lisa e uniforme, com matriz extracelular evidente, enquanto as tratadas apresentavam protruções, perda aparente de conteúdo citoplasmático e encolhimento celular, indicando permeabilização da

membrana e redução considerável no número celular. Com base nas observações das imagens de MEV dos controles presentes nos estudos de Pedrosa *et al.*, 2019, que evidenciam uma heterogeneidade estrutural nos biofilmes entre as cepas de *Malassezia sympodialis* e *M. furfur* na superfície, onde foi identificada uma formação de matriz extracelular rudimentar e uma estrutura heterogênea organizada em aglomerados multicamadas, semelhante ao controle em nossos resultados, podemos inferir que a redução da matriz e do número de células foi notável.

Nas análises realizadas pela microscopia eletrônica de transmissão, foram evidenciadas modificações na matriz extracelular. No grupo de controle, observou-se a presença de estruturas poliméricas (Figura 15A, 15B e 15C), enquanto no grupo submetido ao tratamento, notou-se uma matriz fragmentada com diminuição na densidade eletrônica e rompimento da membrana citoplasmática (Figura 15D, 15E e 15F). Esses achados são semelhantes aos visualizados por Motta *et al.* (2008), que, ao utilizar metabólitos secundários da bactéria *Burkholderia spp.* contra a levedura *M. pachydermatis*, identificaram, nas imagens, a perda de eletrondensidade e a desestruturação de organelas e vesículas. Ao analisar as imagens, também notamos a presença de sinais indicativos de apoptose celular. Em comparação com o estudo de Voget *et al.* (2015), no qual a exposição das células de *M. pachydermatis* à polimixina B resultou na formação de bolhas e pequenos túbulos na superfície, nossos resultados revelaram que as células, apresentando materiais semelhantes a filmes adjacentes com baixa densidade eletrônica, que também exibiram bolhas e uma névoa de material transparente ao elétron ao redor das células, indicando apoptose. A perda de forma celular foi claramente observada, com paredes inchadas e citoplasma mais granular, por vezes até mesmo eletron-transparente. Isso destaca a eficácia do peptídeo sintético na diminuição dos biofilmes polimicrobianos. A aplicação dessa técnica de microscopia foi importante devido à sua elevada resolução, possibilitando a visualização detalhada de estruturas celulares e subcelulares, bem como a análise de estruturas internas das células.

Uma das principais desafios que dificultam a incorporação de AMPs no desenvolvimento de medicamentos terapêuticos seria uma possível toxicidade desses peptídeos para as células de mamíferos (MCGREGOR, 2008). Por isso, a escolha das células de macrófagos e monócitos para avaliar a toxicidade dos peptídeos foi realizada a fim de analisar a interação desses peptídeos com células do nosso sistema imune (GRECO *et al.*, 2020). A preservação da viabilidade dessas células, mesmo em

concentrações mais elevadas dos peptídeos, destaca a potencial segurança imunológica dessas substâncias. Os peptídeos $\gamma_{33-41} P\upsilon D_1^{++}$ e $\gamma_{31-45} P\upsilon D_1^{++}$ revelaram, de maneira consistente, uma baixa atividade hemolítica (Figura 13), sendo este teste importante para avaliação da preservação da integridade da membrana dos eritrócitos (CAVALCANTI *et al.*, 2023). Estes resultados reafirmam as evidências obtidas nas células de macrófagos RAW 264.7 (Figura 16) e monócitos THP-1 (Figura 17) e eritrócitos (Figura 18) sugerindo que as concentrações necessárias para causar 50% de citotoxicidade (Tabela 2) são consideravelmente superiores às empregadas nos ensaios de inibição de biofilme, reforçando a baixa citotoxicidade de peptídeos sintéticos (GOMES, 2018).

No estudo de Silva *et al.* (2020), a avaliação da viabilidade dos fibroblastos foi conduzida ao expor as células MRC-5 a várias concentrações do peptídeo sintético PEP-IA18, por um período de 24 h. Notavelmente, somente em concentrações superiores a 17,5 μM de PEP-IA18, houve um impacto significativo na viabilidade das células MRC-5. Quanto à atividade hemolítica, observou-se que o PEP-IA18 não induziu hemólise nos eritrócitos humanos em concentrações inferiores a 225 μM . De semelhante modo, nos estudos conduzidos por Taveira *et al.* (2020), mesmo ao empregar uma concentração de 200 μM de CaDef₂.1G27-K44, a citotoxicidade não ultrapassou 28% para macrófagos e monócitos, e para os eritrócitos não foi além de 19%.

Esses resultados destacam os peptídeos sintéticos como promissores para abordagens terapêuticas devido à sua biocompatibilidade celular, atuando como ligantes naturais para receptores de superfície celular, o que lhes confere alta afinidade e especificidade (AYUSSO, 2023). Além disso, sua baixa toxicidade sugere potencial para fármacos com elevada atividade e seletividade. Essa característica também contribui para uma baixa taxa de efeitos colaterais em comparação com medicamentos convencionais (ERAK *et al.*, 2018; HENNINOT *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

Como conclusão, os peptídeos sintéticos, especialmente derivados de plantas, vêm ganhando destaque como candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos, sendo uma proposta contra a crescente resistência a medicamentos convencionais. Nossa pesquisa, centrada na ação antibiofilme, revelou que os peptídeos sintéticos derivados da defensina $P\upsilon D_1$ apresentam uma eficácia expressiva, contra biofilmes polimicrobianos e consequentemente demonstrando atividades antifúngicas e

antibacterianas. A análise das interações dos peptídeos com biofilmes polimicrobianos proporcionou alguns indícios nos microambientes do biofilme, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam mais seletivas contra patógenos. Os resultados evidenciam que o peptídeo γ_{31-45} PvD₁⁺⁺ se destaca, impedindo efetivamente a formação de biofilmes polimicrobianos, sendo a CMI e a CMEB de 75 μ M. Além disso, esse peptídeo causou permeabilização de membranas, aumento de espécies reativas de oxigênio, impedindo ou reduzindo a produção da matriz extracelular, que é um componente crucial para a resistência de biofilmes. Adicionalmente, o peptídeo demonstrou baixa citotoxicidade e atividade hemolítica, indicando o seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. V. *et al.* Differential interactions of the antimicrobial peptide, RQ18, with phospholipids and cholesterol modulate its selectivity for microorganism membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 9, p. 129937, 2021.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, pág. 3389-3402, 1997.
- ARMOUTELI, S., BAMFORD, N. C., STANLEY-WALL, N. R., & KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p.600-614, 2021.
- ARNAOUTELI, S. *et al.* *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 600-614, 2021.
- AYUSSO, G. M. Avaliação de peptídeos sintéticos na inibição do vírus Chikungunya. **Tese Doutorado**, 2023.
- BAI, F.; CAI, Z.; YANG, L. Recent progress in experimental and human disease-associated multi-species biofilms. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1234-1244, 2019.
- BARBE, V. *et al.* From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 6, p. 1758, 2009.

- BIERHALS, N. D. *et al.* Extração de dna genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e in house. **Saúde (Santa Maria)**, 2020.
- BOXBERGER, M. *et al.* Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. **Microbiome**, v. 9, p. 1-14, 2021.
- BROEKAERT, W. F. *et al.* Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 3, p. 297-323, 1997.
- CAFARCHIA, C. *et al.* Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and cellular probes**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2011.
- CALVO, P.; ZÚÑIGA, D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). **Ecologia aplicada**, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2010.
- CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. **Tese de Doutorado**, 2016.
- CARVALHO, A.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, 2011.
- CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.
- CAVALCANTI, M. *et al.* Atividade biológica e perfil fitoquímico do extrato aquoso de *Chrysobalanus icaco*. **Peer Review**, v. 5, n. 19, p. 285-302, 2023.
- CHEBIL, W. *et al.* Epidemiology of Pityriasis versicolor in Tunisia: Clinical features and characterization of *Malassezia* species. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 2, p. 101246, 2022.
- CHOI, H.; HWANG, J.; LEE, D. G. Antifungal effect and pore-forming action of lactoferricin B like peptide derived from centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2745-2750, 2013.
- CHOWDHURY, R. *et al.* IPRO+/-: Computational protein design tool allowing for insertions and deletions. **Structure**, v. 28, n. 12, p. 1344-1357. e4, 2020.

- COSTA, R. C. *et al.* Polymicrobial biofilms related to dental implant diseases: unravelling the critical role of extracellular biofilm matrix. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 370-390, 2023.
- CRUSCA, E. J. *et al.* Biophysical characterization and antitumor activity of synthetic Pantinin peptides from scorpion's venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 11, p. 2155-2165, 2018.
- DEBERALDINI, M. G.; SANTOS, J. L. Invasive Fungal Infections: An Overview and Treatment. **Ulakes Jornal of Medicine**, v. 1, n. 3, p. 209-221, 2021.
- DIAS, L. P. *et al.* RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis*, is a potent antimicrobial agent against *Klebsiella pneumoniae* and *Candida parapsilosis*. **Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183092, 2020.
- DUARTE, A. G. P. *et al.* Anti-toxoplasma gondii effect of metalocomplex compounds N0414 and N5814. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16541-16555, 2021.
- ERAK, M. *et al.* Peptide chemistry toolbox–Transforming natural peptides into peptide therapeutics. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2759-2765, 2018.
- GAMES, P. D. *et al.* Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2090-2100, 2008.
- GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.
- GIONO-CEREZO, S. *et al.* Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. **Gaceta Médica de México**, v. 156, n. 2, p. 172-180, 2020.
- GOMES, B. *et al.* Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 2, p. 415-429, 2018.
- GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. The genus *Bacillus*. **Agricultural Research Service**, US Department of Agriculture, 1973.

- GRECO, I. *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 13206, 2020.
- GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-355, 1996.
- GUSA, A. *et al.* Genome-wide analysis of heat stress-stimulated transposon mobility in the human fungal pathogen *Cryptococcus deneoformans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 4, p. e2209831120, 2023.
- HANCOCK, R. E. W.; ALFORD, M. A.; HANEY, E. F. Antibiofilm activity of host defence peptides: Complexity provides opportunities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 786-797, 2021.
- HÄRTIG, E.; JAHN, D. Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. **Advances in microbial physiology**, v. 61, p. 195-216, 2012.
- HAZAM, P. K.; GOYAL, R.; RAMAKRISHNAN, V. Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 142, p. 10-22, 2019.
- HENNINOT, A.; COLLINS, J. C.; NUSS, J. M. The current state of peptide drug discovery: back to the future? **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1382-1414, 2018.
- HERNANDEZ-VALDES, J. A. *et al.* Impact of spatial proximity on territoriality among human skin bacteria. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 30, 2020.
- HETTWER, S. *et al.* Equilíbrio da Microbiota para Benefício da Pele. **Cosmetics & Toiletries**, v. 30, p. 49-54, 2018.
- JIANG, Y. *et al.* Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 261-280, 2021.
- JORDANA-LLUCH, Elena *et al.* A simple polymicrobial biofilm keratinocyte colonization model for exploring interactions between commensals, pathogens and antimicrobials. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 521062, 2020.

- KAUSHIK, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Interaction of RecA mediated SOS response with bacterial persistence, biofilm formation, and host response. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2022.
- KAZEMZADEH, N. M. *et al.* Strategies for antimicrobial peptide coatings on medical devices: A review and regulatory science perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 94-120, 2021.
- KHAN, F. *et al.* Mixed biofilms of pathogenic Candida-bacteria: Regulation mechanisms and treatment strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 699-727, 2021.
- KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 7, p. 517–528, jul. 2019.
- KOWALSKI, C. H. *et al.* Fungal biofilm morphology impacts hypoxia fitness and disease progression. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2430-2441, 2019.
- LABEDZ, N. *et al.* Pityriasis Versicolor—A Narrative Review on the Diagnosis and Management. **Life**, v. 13, n. 10, p. 2097, 2023.
- LENNICKE, C.; COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, v. 81, n. 18, p. 3691-3707, 2021.
- MACHADO, N. I. *et al.* Treatment with melatonin induces a reduction of *Toxoplasma gondii* development in LLC-MK2 cells. **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2703-2711, 2020.
- MAGANA, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The lancet infectious diseases**, v. 20, n. 9, p. e216-e230, 2020.
- MAHLAPUU, M.; BJÖRN, C.; EKBLÖM, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 978-992, 2020.
- MALASSEZ, L. Note sur le champignon du pityriasis simple. **Archives of Physiology**, s.l., v. 1, p. 451-459, 1874.
- MCGREGOR, D. P. Discovering and improving novel peptide therapeutics. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 616-619, 2008.

- MEIRA, R. R. Interação entre fungos e bactérias no biofilme: influência na virulência microbiana. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 8-8, 2021.
- MELLO, É. O. *et al.* Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD_{1r} from *Phaseolus vulgaris* L.(common bean) seeds. **BMC biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2014.
- MELLO, É. O. *et al.* Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from PvD₁ and their mechanism of action against *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 407, 2019.
- MELO, T. A. *et al.* O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e18110917817-e18110917817, 2021.
- MILES, A. J.; WALLACE, B. A. CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. **Protein Science**, v. 27, n. 9, p. 1717-1722, 2018.
- MOLCHANOVA, N.; HANSEN, P. R.; FRANZYK, H. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1430, 2017.
- MOSDANN, T. J. J. I. M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSKOVICZ, V. *et al.* Skin microbiota dynamics following *B. subtilis* formulation challenge: an in vivo study in mice. **BMC microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2021.
- MOTTA, O. V. *et al.* Atividade in vitro dos metabólitos secundários de *Burkholderia sp.* sobre a levedura *Malassezia pachydermatis*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 410-417, 2008.
- NAZARIAN-FIROUZABADI, F.; TORRES, M. D. T.; FUENTE-NUNEZ, C. D. L. Recombinant production of antimicrobial peptides in plants. **Biotechnology Advances**, p. 108296, 2023.
- NNADI, N. E.; CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009503, 2021.

- OLIVEIRA, A. P. B. F. *et al.* Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: A mini review. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 453-466, 2022.
- OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, v. 157, p. 10-21, 2019.
- ONUBR. **Nações Unidas do brasil**. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/>Acesso em: 23 novembro 2023. 2019.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure– function study. **Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1826-1835, 1997.
- OSHIRO, K. G. N. *et al.* Bioactive peptides against fungal biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2169, 2019.
- PECORARO, V. *et al.* Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 2, p. e13706, 2022.
- PEDROSA, A. F. *et al.* *Malassezia* colonisation on a reconstructed human epidermis: imaging studies. **Mycoses**, v. 62, n. 12, p. 1194-1201, 2019.
- PEDROSA, A. F.; LISBOA, C.; RODRIGUES, A. G. *Malassezia* infections with systemic involvement: Figures and facts. **The Journal of Dermatology**, v. 45, n. 11, p. 1278-1282, 2018.
- PEIXOTO, L. R. *et al.* Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida spp.* **Archives of oral biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.
- PEREIRA, J. V. *et al.* High-throughput viability testing of microbial communities in a probiotic product using flow cytometry. **Applied Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 1068-1082, 2023.
- PORTO, W. F.; PIRES, Á. S.; FRANCO, O. L. CS-AMPPred: an updated SVM model for antimicrobial activity prediction in cysteine-stabilized peptides. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51444, 2012.

- PRIEST, F. G. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 37, n. 1, p. 69-71, 1987.
- RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. In: Seminars in immunopathology. **Springer-Verlag**. p. 27-43, 2007.
- RAY, C. G.; RYAN, K. J. (Ed.). **Sherris medical microbiology**. New York, NY, USA: McGraw-Hill Education/Medical, 2014.
- RHIMI, W. *et al.* *Malassezia spp.* yeasts of emerging concern in fungemia. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 370, 2020.
- RIBEIRO, M. C. *et al.* Anti-Candida Potential of Peptides from Immature and Ripe Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 5, p. 1124-1136, 2023.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. *et al.* Pathogenesis and clinical relevance of Candida biofilms in vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 544480, 2020.
- RYU, J.; LANDERS, M.; CHOI, S. A sweat-activated, wearable microbial fuel cell for long-term, on-demand power generation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 205, p. 114128, 2022.
- SAGARAM, U. S. *et al.* Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18550, 2011.
- SALTON, M. R. J.; KIM, K. S.; BARON, S. **Medical microbiology**. University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, 1996.
- SAMBLANX, G. W. *et al.* Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1171-1179, 1997.
- SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608-620, 2022.
- SAUNTE, D. M. L.; GAITANIS, G.; HAY, R. J. *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 112, 2020.

- SCHLOTTFELDT, F. S. *et al.* Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clínico laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 199-204, 2002.
- SILVA, A. C. B. *et al.* Development of a novel anti-biofilm peptide derived from profilin of *Spodoptera frugiperda*. **Biofouling**, v. 36, n. 5, p. 516-527, 2020.
- SILVA, G. O. *et al.* Effects of lipopeptide biosurfactants on clinical strains of *Malassezia furfur* growth and biofilm formation. **Medical Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1191-1201, 2021.
- SILVA, L. O. P.; ALVES, E. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Consequences of indiscriminate use of antimicrobials during the COVID-19 pandemic. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10381-10397, 2022.
- SKRZYNIARZ, K. *et al.* Dendritic systems for bacterial outer membrane disruption as a method of overcoming bacterial multidrug resistance. **Biomaterials Science**, v. 11, n. 19, p. 6421-6435, 2023.
- SMYTHE, P.; WILKINSON, H. N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3950, 2023.
- SOARES, J. R. *et al.* Interaction between the plant ApDef1 defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle-and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3429-3443, 2017.
- SOUSA, V. K. Aplicações da espectroscopia de dicroísmo circular e da tensiometria em monocamadas de Langmuir no estudo de proteínas e peptídeos antimicrobianos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2021.
- SOUZA, P. F. N. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, v. 175, p. 132–145, 1 ago. 2020.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

- TAVEIRA, G. B. *et al.* A new bioinspired peptide on defensin from *C. annuum* fruits: Antimicrobial activity, mechanisms of action and therapeutical potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1866, n. 11, p. 130218, 2022.
- THEELEN, B. *et al.* *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S10-S25, 2018.
- THEVISSSEN K. T. F. R., BROKAERT W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**. 65(12):5451–5458, 1999.
- TORRES, M. D. T. *et al.* Peptide design principles for antimicrobial applications. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3547-3567, 2019.
- VILAÇA, D. H. V. *et al.* Tratamento farmacológico da pitíriase versicolor: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 2107-2116, 2019.
- VOGET, M. *et al.* Is transmission electron microscopy (TEM) a promising approach for qualitative and quantitative investigations of polymyxin B and miconazole interactions with cellular and subcellular structures of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*?. **Veterinary Microbiology**, v. 181, n. 3-4, p. 261-270, 2015.
- VON, G. R. B. *et al.* Promising antibiofilm activity of peptidomimetics. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2157, 2018.
- WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1-6, 2019.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Semana Mundial da Conscientização Antimicrobiana**, 2021.
- YOU, Y. H. *et al.* Rational design of stapled antimicrobial peptides. **Amino Acids**, v. 55, n. 4, p. 421-442, 2023.