

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA NETO” - UNESP

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

MARIANA DE MELO FACETO PORTELLA

**Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra
*Candida albicans***

ARARAQUARA

2023

Mariana de Melo Faceto Portella

**Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra
*Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química – Campus Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^o. Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara

2023

Mariana de Melo Faceto Portella

**Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra
*Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química – Campus Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Araraquara, 9 de janeiro de 2023

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Prof.^a Dr.^a Denise Bevilaqua

Prof.^a Dr.^a Fernanda Zanolli Freitas

“I’ll be living one life for the two of us”

- Louis Tomlinson

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luana e Vanderlei, minha irmã Laura e minha avó Maria por todo suporte durante os anos de graduação, pelos momentos de desabafo e pelo apoio de cada um para que esse momento se tornasse possível.

Agradeço aos meus avós Antônio (*in memoriam*) e Leondina (*in memoriam*) que são meu motivo de saudades diário e, ao meu avô Santo (*in memoriam*) pelo incentivo e ensinamentos desde cedo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, por ter me possibilitado e orientado no desenvolvimento desta pesquisa e por ter me recepcionado tão bem e prontamente no grupo.

Agradeço aos colegas de pesquisa, em especial à Luna (Gabriela Zolin) e ao Fauller que me deram suporte durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao grupo de pesquisa Milagre Lab, pelo suporte e confraternizações, aos ensinamentos e colegas que compartilharam momentos importantes. Em especial à Dr.^a Iris Teixeira com quem aprendi muito, dividi preocupações e obtive ótimos conselhos.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Cíntia Milagre pelo acolhimento no grupo de pesquisa e os dois anos no qual tive a oportunidade de ser sua orientada, pelos direcionamentos e pelas oportunidades.

Agradeço aos colegas de classe e às amigas que adquiri ao longo dos anos, sejam os alunos da 018 e de anos anteriores e posteriores também.

Agradeço aos membros dos projetos de extensão, PET, Flores da Acácia, CriAÇÃO, Comissão de Recepção, Comissão da Semana da Química, dos quais fiz parte, pelo ensinamento e contribuição de cada um em minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço à Pr.^a Dr.^a Denise Bevilaqua por sempre me receber, seja para conversas triviais até conselhos pessoais e profissionais, por ter sido minha tutora do PET e ter me ensinado muito ao longo da minha jornada no IQ.

Agradeço ao Instituto de Química pela estrutura concedida para a realização do meu curso, e às agências de fomento que me concederam bolsa até o momento.

RESUMO

O combate à candidíase tem se tornado cada vez mais difícil devido à resistência que sua principal causadora, a espécie fúngica *Candida albicans*, tem adquirido aos medicamentos comerciais. Tal resistência vem acompanhada de alterações genéticas, impossibilitando o tratamento tradicional com fluconazol, o agente antifúngico mais aplicado no caso de candidíase. Portanto, a busca por novas moléculas capazes de combater este micro-organismo, vem sendo um grande desafio. Diante dessa problemática, os peptídeos biologicamente ativos encontrados naturalmente em organismos vivos, tem sido uma estratégia para esta finalidade, destacando as Histatinas, que são peptídeos comumente presentes na saliva humana, ricos no aminoácido histidina e que exibem uma grande atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e *Porfiromonas gengivalis*, além da *Candida albicans*, sendo o peptídeo Histatina-5 (Hst-5), o que se destaca com maior atividade contra este último micro-organismo. Como estratégia de melhorar a atividade antifúngica do peptídeo Hst-5, foi projetado e sintetizado o peptídeo 8WHst-5, o qual contém apenas oito aminoácidos da região funcional do peptídeo Hst-5. Estudos desenvolvidos anteriormente demonstraram que o peptídeo 8WHst-5 apresentou uma melhor atividade contra *C. albicans*, comparado com seu precursor original Hst-5. Neste trabalho, portanto, foi utilizado como base o peptídeo 8WHst-5, do qual projetou-se e sintetizou-se o peptídeo 8WHst-5Duo, cuja estrutura apresenta a sequência de aminoácidos duplicada, a fim de se obter uma maior atividade antifúngica, principalmente em cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol. A atividade antimicrobiana do peptídeo 8WHst-5Duo foi testada frente a três cepas de *C. albicans* (ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231). O peptídeo 8WHst-5Duo apresentou uma melhora na atividade se comparado ao 8WHst-5 para todas as variantes da espécie de *C. albicans* testadas. Também houve melhora se comparado ao peptídeo Hst-5, o qual apresenta a mesma atividade que o peptídeo 0WHst-5 utilizado neste trabalho, em especial contra *C. albicans* ATCC 18804, a qual é resistente à fluconazol, apresentando uma concentração inibitória mínima de 80 µM. Desse modo, a estratégia de duplicação da cadeia de aminoácidos foi capaz de aumentar a atividade antifúngica do peptídeo na inibição de *C. albicans*, o que pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por este micro-organismo.

Palavras chaves: *Candida albicans*, antifúngico, peptídeos, Histatina-5.

ABSTRACT

Combating candidiasis has been a great challenge due to the resistance that its main cause, the fungal species *Candida albicans*, has acquired to prescribed drugs. Such resistance is a result of genetic modifications, making impracticable traditional treatment with fluconazole, the most applied antifungal agent for the candidiasis. Therefore, the process for searching new molecules capable of combating this microorganism is a matter of the utmost importance. Taking into consideration the problematic mentioned above, antimicrobial peptides, found in living organisms, have been a strategy for this purpose. Emphasis on Histatins, which are peptides commonly present in human saliva, rich in the amino acid histidine and which exhibit great antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* and *Porfiromonas gengivalis*, in addition to *Candida albicans*, with the peptide Histatin-5 (Hst-5), highlights its great activity against it. As a strategy to improve the antifungal activity of the Hst-5 peptide, the 8WHst-5 peptide was designed and synthesized, that contains only eight amino acids from the functional region of the Hst-5 peptide. Previously studies presented that the 8WHst-5 peptide showed better activity against *C. albicans* compared to its original Hst-5 precursor. In this study, therefore, the peptide 8WHst-5 was used as a basis, from which the peptide 8WHst-5Duo was designed and synthesized, whose structure presents a duplicated amino acid sequence, in order to obtain a greater antifungal activity, mainly in strains of *C. albicans* resistant to fluconazole. The antimicrobial activity of the 8WHst-5Duo peptide was tested against three strains of *C. albicans* (ATCC 90028, ATCC 18804 and ATCC 10231). The 8WHst-5Duo peptide showed an improvement in activity compared to 8WHst-5 for all variants of the *C. albicans* species tested. There was also an improvement compared to the Hst-5 peptide, which has the same activity as the 0WHst-5 peptide used in this study, especially against *C. albicans* ATCC 18804, which is resistant to fluconazole, with a minimum inhibitory concentration of 80 μ M. Thus, the amino acid chain duplication strategy was able to increase the antifungal activity of the peptide in inhibiting *C. albicans*, which may be an alternative for the treatment of infections caused by this microorganism.

Keywords: *Candida albicans*, antifungal, peptides, Histatin-5.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os diferentes sítios de ação de medicações antifúngicas	Erro!	Indicador	não definido.
Figura 2: Peptídeo 8WHst-5Duo			18
Figura 3: Esquema de desproteção e acoplamento dos aminoácidos para a síntese em fase sólida do peptídeo 8WHst-5Duo.....			21
Figura 4: Esquema das etapas do processo de síntese de peptídeos em fase sólida.....			22
Figura 5: Microplaca de 96 poços			25
Figura 6: Cromatograma peptídeo 8WHst-5Duo bruto.....			27
Figura 7: Cromatograma peptídeo 8WHst-5Duo puro.....			28
Figura 8: Espectro de massas do peptídeo 8WHst-5Du puro.....			29
Figura 9: Gráfico da Curva Analítica			30
Figura 10: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 160 µmol/L			31
Figura 11: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 80 µmol/L			31
Figura 12: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 40 µmol/L			32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência estrutural da Histatina-5, análoga e fragmentos	21
Tabela 2: Relação m/z do espectro de massas	29
Tabela 3: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{mol/L}$	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aminoácidos

Ala (A) - Alanina

Arg (R) - Arginina

Asn (N) - Asparagina

Asp (D) - Ácido Aspártico

Cys (C) - Cisteína

Gln (Q) - Glutamina

Glu (E) - Ácido Glutâmico

Gly (G) - Glicina

His (H) - Histidina

Ile (I) - Isoleucina

Leu (L) - Leucina

Lys (K) - Lisina

Met (M) - Metionina

Phe (F) - Fenilalanina

Pro (P) - Prolina

Ser (S) - Serina

Thr (T) - Treonina

Trp (W) - Triptofano

Tyr (Y) - Tirosina

Val (V) - Valina

Outras

ACN – Acetonitrila

CIM – Concentração inibitória mínima

DCM – Diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DMF – N,N-Dimetilformamida

DO – Densidade ótica

Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonila

H₂O – água

HAc – Ácido Acético

HOBt – N-Hidroxibenzotriazol

HPLC – High performance liquid chromatography

Hst – Histatina

IST – Infecções sexualmente transmissíveis

LC/ESI-MS – Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric

MM – Massa Molar

SDA – ágar Sabouraud Dextrose

SDB – caldo Sabouraud Dextrose

SPFS – Síntese de peptídeo em fase sólida

TFA – Ácido Trifluoracético

TIS – Triisopropilsilano

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Gênero <i>Candida</i>	13
1.2 <i>Candida albicans</i>	13
1.3 Tratamentos antifúngicos	14
1.3.1 Resistência antifúngica	15
1.4 Peptídeos antimicrobianos	16
1.5 Histatina-5	16
1.6 Fragmentos peptídicos de Hst-5	17
2. OBJETIVO	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 Síntese dos peptídeos	20
3.2 Purificação e caracterização dos peptídeos	23
3.3 Preparo de inóculo de <i>Candida albicans</i>	24
3.4 Curvas Analíticas	24
3.5 Concentração Inibitória Mínima	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 8WHst-5Duo	27
4.2 Curva analítica	30
4.3 Inibição do crescimento do micro-organismo	30
4.4 Concentração Inibitória Mínima	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Candida*

Os fungos são membros do Reino *Fungi* e apresentam uma estrutura celular eucariótica, parede celular de quitina e membrana citoplasmática fosfolipídica composta por proteínas. Dentre os vários participantes desse reino, é possível encontrar micro-organismos uni ou multicelulares. As leveduras, por exemplo, são organismos unicelulares.

O gênero *Candida* se caracteriza como leveduras não fotossintéticas, que podem ser encontradas no corpo humano, como um microrganismo comensal, na área gastrointestinal e mucosas genital e oral de indivíduos saudáveis (Rocha *et al.*, 2021).

Devido a capacidade de variação morfológica entre os estados de levedura e hifal, os micro-organismos do gênero *Candida* podem causar quadros infecciosos no organismo hospedeiro, se caracterizando, portanto, como patógenos oportunistas. Essa infecção pode ser superficial ou mais invasiva, de forma cutânea, em mucosa, em órgãos profundos ou até mesmo no sangue (Pappas *et al.*, 2018).

De todas as doenças causadas por leveduras, o gênero *Candida* contém suas espécies em destaque devido sua alta incidência em casos de infecção fúngica. A espécie *Candida albicans* é a principal causadora da candidíase, porém, tem sido observado que outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* vem sendo mais frequentemente identificados em casos de infecção (Silva *et al.*, 2012).

A candidíase, ou candidose, por sua vez, é uma micose oportunista justamente por ser previamente encontrada na microbiota humana, tornando-se infecciosa quando há alteração das condições normais no organismo, resultando em patógena. Tal doença pode ter duas origens: endógena, proveniente da própria microbiota; e exógena, como uma infecção sexualmente transmissível (IST) (Barbedo *et al.*, 2010).

1.2 *Candida albicans*

As infecções causadas por *Candida* dependem de alguns fatores e, dentre eles, a imunidade do hospedeiro e a alteração da microbiota da mucosa. Essas condições favorecem a disseminação dessa levedura no organismo hospedeiro (Rossi *et al.*, 2011; Pappas *et al.*, 2018).

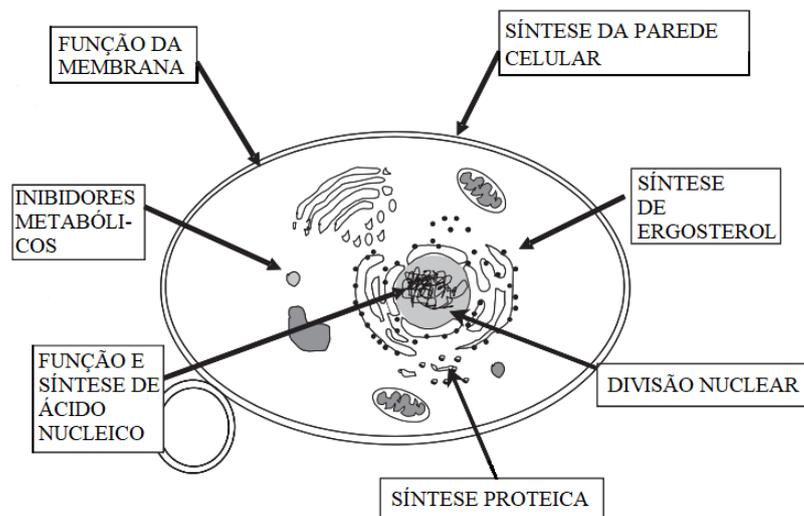
A *C. albicans*, maior representante do gênero, possui alta capacidade de adaptação, de forma que consegue crescer em diversos ambientes. Quando as condições do hospedeiro são atingidas, o fungo transita da forma de levedura à forma de hifas e pseudo-hifas, as quais estão associadas à uma maior virulência do micro-organismo. A infecção se dá pela invasão celular no hospedeiro, por diferentes mecanismos, permitindo que seu crescimento seja efetivo. Dependendo do nível da invasão, pode resultar em danos irreversíveis à célula hospedeira, causando sua morte (Rossi *et al.*, 2011).

1.3 Tratamentos antifúngicos

Sendo uma espécie com alta capacidade de adaptação a situações de estresse, a *C. albicans* vem apresentando, com o passar dos anos, cada vez maior farmacorresistência aos antifúngicos utilizados no tratamento de suas infecções. Esse fator é agravado pelo uso incorreto e excessivo de agentes antifúngicos que são utilizados, muitas vezes, de forma desnecessária. Como resultado, o tratamento por meio de medicamentos tradicionais se torna um desafio cada vez maior.

Os principais medicamentos utilizados atualmente nos tratamentos de infecções fúngicas pertencem às classes dos azóis e polienos. Cada classe apresenta diferentes sítios de ação, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Os diferentes sítios de ação de medicações antifúngicas



Fonte: Mishra, N., *et al.*, 2007 – adaptada.

A classe dos azóis, da qual o fluconazol é o medicamento mais utilizado, atua na membrana celular do fungo, sendo capaz de inibir a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol, principal componente da membrana fúngica. Os azóis são o principal tratamento utilizado em casos de infecção causada por *C. albicans*, tanto tópicos como sistêmicos.

Os polienos, por outro lado, atuam ligando-se diretamente ao ergosterol, causando a formação de poros aquosos na membrana, de forma que haja vazamento do conteúdo extracelular e, portanto, a morte da célula. A nistatina e a anfotericina B são os principais representantes da classe dos polienos, sendo a primeira utilizada principalmente em casos de infecção tópica enquanto a segunda é aplicada à casos de infecção sistêmica.

1.3.1 Resistência antifúngica

A resistência microbiológica é resultado de mecanismos moleculares que são provenientes de resistência intrínseca ou adquirida. A primeira refere-se a uma característica genotípica da espécie, resultando assim em uma resistência anterior à exposição do agente antimicrobiano. A segunda, no entanto, é resultado de mutações após a exposição ao antimicrobiano (Vieira, 2016).

Referindo-se à *C. albicans*, sua resistência à antifúngicos é desenvolvida a partir de fatores de transcrição mutantes. Por não haver recombinação sexual, a levedura perpetua sua resistência a partir de descendência clonal, proveniente de plasticidade do genoma e do aumento de recombinações mitóticas, além das taxas de mutações (Vieira, 2016).

Tratando-se da classe dos polienos, é baixa a ocorrência de casos referente a sua resistência antifúngica. As mutações que resultam em resistência geram consequências à sobrevivência da *C. albicans*, diminuindo assim sua tolerância à estresses externos e aumentando defeitos em suas estruturas membranosas (Vieira, 2016).

Por sua vez, os azóis são fungistáticos, proporcionando a possibilidade de desenvolvimento de resistência adquirida (Pfaller *et al.*, 2015). A prevalência de resistência ao fluconazol em *C. albicans* é baixa, mas taxas mais altas são observadas para *C. glabrata*, com taxas de até 13%; e *C. auris*, que pode apresentar cerca de 93%; além da resistência inata observada para *C. krusei* (Cleveland *et al.*, 2012; Lockhart *et al.*, 2017).

1.4 Peptídeos antimicrobianos

Devido à resistência aos medicamentos apresentados pela *C. albicans*, torna-se cada vez mais necessária a busca por novas formas de combate às suas infecções. Considerando então a existência de peptídeos que, nas plantas, animais e insetos, são utilizados como defesas naturais, viu-se a possibilidade de utilizá-los como possíveis agentes antimicrobianos, exercendo sua ação por mecanismos distintos aos fármacos comerciais.

Os peptídeos antimicrobianos participam ativamente da resposta imune de organismos vivos, inclusive no sistema humano, prevenindo infecções de diferentes parasitas. Dessa forma, protegem continuamente os ataques de micro-organismos variados, exercendo assim um potencial terapêutico como antibiótico (Zasloff, 2002).

Ao comparar os peptídeos com antibióticos convencionais, a vantagem primordial é a raridade em adquirir resistência. Os peptídeos apresentam mais de um mecanismo de ação que atuam de forma conjunta para eliminar o parasita, além de ter ação imediata após entrar em contato com o alvo. Sua dosagem administrada é baixa, apresenta amplo espectro de ação e pode ser utilizado contra micro-organismos que já apresentam resistência à medicamentos convencionais (Seo *et al.*, 2012).

As histatinas, principal classe de peptídeos encontrados naturalmente na saliva humana, apresentam multifunções na mucosa oral, como ação antibacteriana e antifúngica, além de auxiliar na cicatrização de ferimentos (Helmerhorst, 2006). Esta classe de peptídeos leva esse nome devido à grande presença de resíduos de histidina em sua sequência de aminoácidos.

1.5 Histatina-5

São três as histatinas produzidas de forma majoritária pelas glândulas parótidas que apresentam atividade antimicrobianas, sendo elas a Histatina-1, Histatina-3 e Histatina-5. A Histatina-1 e Histatina-3 são moléculas precursoras que produzem Histatinas menores a partir da clivagem enzimática. Já a Histatina-5 (Hst-5), dentre todas as outras, apresenta o maior potencial de matar o patógeno das espécies *Candida in vivo* (Edgerton *et al.*, 1998).

A Hst-5, depois de permear a membrana celular da *C. albicans*, é atraída à mitocôndria de tal forma que a permeabilize, prejudicando assim a respiração celular, levando à morte da célula (Helmerhorst *et al.*, 1999).

Estudos mostraram, entretanto, que a morte celular é o efeito secundário da interação peptídeo-levedura. O primeiro efeito é formação de poros na membrana devido a rede de carga positiva do peptídeo, além de sua natureza anfifílica, demonstrando assim que a atividade antifúngica da Hst-5 é seletiva e interage com um componente específico da célula de *C. albicans* (Edgerton *et al.*, 1998; Ruissen *et al.*, 2001).

1.6 Fragmentos peptídicos de Hst-5

Conhecendo então a atividade antifúngica da Hst-5, os estudos começaram a envolver seus derivados e fragmentos de tal forma que fosse possível obter resultados aprimorados e mais promissores. Pensando nisso, Ruissen e colaboradores (2001), desenvolveram duas variantes provenientes da Hst-5 a fim de que uma apresentasse maior anfipaticidade e outra tivesse propriedades anfifílicas compatíveis à original.

O resultado obtido por eles foi de aprimoramento na atividade antifúngica em ambas variantes, demonstrando assim que a atividade antimicrobiana não se limita à Hst-5, mas se estende aos seus derivados e fragmentos (Ruissen *et al.*, 2001).

Em outro estudo realizado por Lin e colaboradores (2016), foi proposta a síntese de um peptídeo com a mesma sequência de aminoácidos da Hst-5, porém duplicada e triplicada, com o objetivo de manter a molécula mais estável à degradação e permitir que uma maior quantidade do peptídeo chegasse efetivamente à célula da levedura, podendo exercer sua atividade antifúngica. Nesse estudo foi observado que os fragmentos não se tornaram apenas mais estáveis como também obtiveram suas atividades antifúngicas melhoradas.

Com base no estudo de Lin e colaboradores (2016), surgiu a ideia de melhorar atividade antimicrobiana de fragmentos da Hst-5 que vinham sendo estudados anteriormente no grupo de pesquisa. Um desses fragmentos, denominado 8WHst-5, cuja sequência primária de aminoácidos é WKRHHGYKR, demonstrou atividade contra *C. albicans* com eficácia superior se comparado ao original. Nesse sentido, a fim de aprimorar ainda mais a atividade desse peptídeo, foi proposto duplicar sua sequência de aminoácidos, gerando assim o peptídeo 8WHst-5Duo, o qual possui a sequência de aminoácidos WKRHHGYKRKRHHGYKR, representado na Figura 2.

Dessa forma, pretende-se comparar a atividade do peptídeo 8WHst-5Duo com seu análogo simples e também com a própria Hst-5 original, com o objetivo de verificar se a

2. OBJETIVO

O objetivo central deste trabalho foi projetar e sintetizar o peptídeo 8WHst-5Duo, o qual apresenta a sequência de aminoácidos duplicada do fragmento 8WHst-5 obtido a partir do peptídeo Hst-5, com o intuito de melhorar sua atividade antifúngica contra as cepas de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231.

Para alcançar esse objetivo, faz-se necessário:

- Sintetizar o fragmento 8WHst-5Duo e caracterizá-lo;
- Testar sua atividade antifúngica frente a *C. albicans* e compará-la aos peptídeos Hst-5 e 8WHst-5.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese dos peptídeos

A abordagem utilizada para sintetizar peptídeos que apresentem até 60 resíduos de aminoácidos é a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) no qual se baseia em um crescimento da cadeia peptídica adicionando um L- α -aminoácido por vez.

Tal crescimento se dá a partir de um grupo carboxílico C-terminal que se mantém ligado, de forma covalente, à uma resina (suporte polimérico) que apresenta características inertes às condições usadas, além de ser um polímero insolúvel.

Os suportes poliméricos apresentam um alto grau de solvatação quando em contato com solvente apolar, possibilitando o acesso dos reagentes aos sítios reativos. Para permitir que a formação da ligação peptídica ocorra de maneira orientada, é necessária proteção dos grupos funcionais dos aminoácidos que não fazem parte da ligação peptídica. Essa proteção é realizada com protetores denominados permanentes pois devem ser mantidos até o final da síntese. Como exemplo desses grupos protetores, pode-se citar o terc-butil (tBu), tritil e terc-butiloxicarbonil, entre outros.

Já os grupamentos α -amínicos são protegidos temporariamente, removidos a cada passo de acoplamento. O grupamento protetor do grupo α -amino utilizado foi o grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc), o qual é base-lábil, ou seja, a sua remoção do grupo α -amino, processo denominado desproteção, é realizada em um meio básico com solução de 20% piperidina em N, N – Dimetilformamida (DMF).

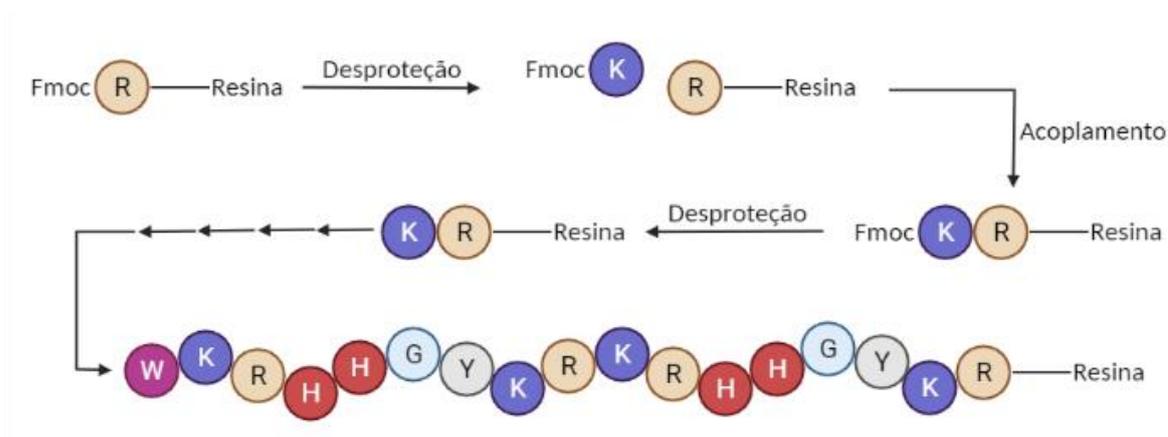
A etapa de acoplamento na síntese em fase sólida, é a base da formação da ligação peptídica, sendo necessário a ativação do grupo α -carboxílico do aminoácido a ser inserido para que ele possa ser atacado pelo grupo α -amino do aminoácido ligado à resina. Para isso, foram utilizados agentes de acoplamento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

Dessa forma, utilizando as informações citadas e seguindo o esquema da Figura 3, foram sintetizados os peptídeos demonstrados na Tabela 1 em sua respectiva sequência de aminoácidos. É possível conferir a estrutura de cada resíduo de aminoácido no Anexo 3.

Tabela 1: Sequência estrutural da Histatina-5, análoga e fragmentos

Nome	Sequência de aminoácidos
Hst-5	D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y
0WHst-5	W D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y
8WHst-5	W K R H H G Y K R
8WHst-5Duo	W K R H H G Y K R K R H H G Y K R

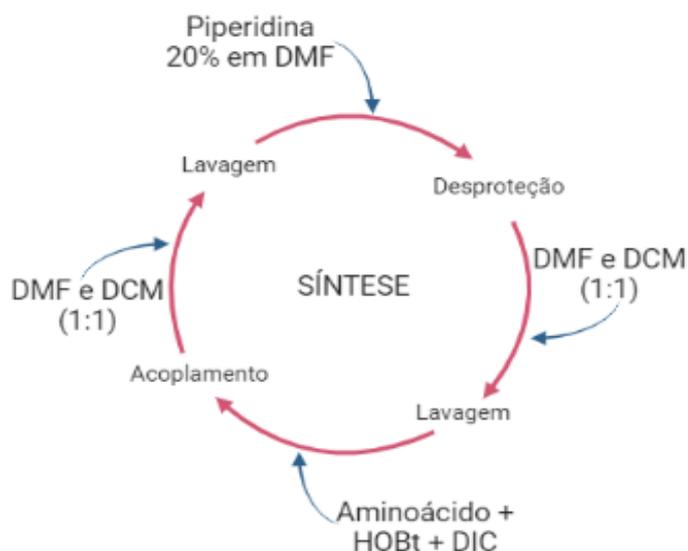
Figura 3: Esquema de desproteção e acoplamento dos aminoácidos para a síntese em fase sólida do peptídeo 8WHst-5Duo.



Fonte: Zolin, 2020 - adaptada

A síntese é composta por 3 fases a seguir: o acoplamento, a desproteção e as lavagens. Após o acoplamento, é necessário realizar lavagens antes de iniciar a desproteção do grupo protetor Fmoc. As lavagens são feitas com os reagentes DCM e DMF, alternando-os entre si e utilizando-os na relação de 1:1. Dessa forma, é possível imaginar a síntese como um processo cíclico, como representado na Figura 4.

Figura 4: Esquema das etapas do processo de síntese de peptídeos em fase sólida.



Fonte: Próprio autor.

Ao final da SPFS, faz-se necessária a etapa de clivagem entre o peptídeo e a resina, assim como a desproteção dos grupos protetores permanentes das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Para isso foi utilizada uma solução de clivagem contendo 95% de ácido trifluoracético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água destilada. Essa mistura foi deixada em agitação branda no período de 3h à temperatura ambiente.

Após esse período, foi realizada a precipitação dos peptídeos com éter etílico gelado e observou-se um precipitado branco. A mistura foi vertida em tubos do tipo “falcon” de 50 mL, agitada no vortex por 1 minuto e centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm, repetindo esses passos por mais duas vezes.

Realizadas as lavagens, as misturas permaneceram em descanso por 12 horas na capela a fim de evaporar o éter, obtendo assim apenas os sólidos. Em seguida, os peptídeos foram extraídos utilizando uma solução 10% de ácido acético (v/v), centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm e filtrados, repetindo mais duas vezes essas etapas. Após esse processo, as soluções ácidas resultantes foram concentradas em rotaevaporador e, em seguida, liofilizadas, tendo como resultado um sólido branco correspondente ao peptídeo no estado bruto.

3.2 Purificação e caracterização dos peptídeos

Terminado o processo de síntese, faz-se necessário então purificar os peptídeos a fim de retirar qualquer contaminante possivelmente gerado nas etapas sintéticas. Para isso é utilizado técnicas cromatográficas de purificação, em específico a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, em inglês), seguindo as condições cromatográficas abaixo:

Modo Semi-preparativo (sistema Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu LC-10A/C-47A):

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . ACN
- Coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 µm).
- Gradiente: 0,33% de solvente B por minuto em 90 minutos.
- Fluxo: 5 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Modo Analítico (sistema Shimadzu UFLC-SPD20A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu SPD-20A):

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . ACN
- Coluna Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm e 5µm).
- Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos.
- Fluxo: 0,6 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Após o procedimento de purificação do peptídeo, a caracterização foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo de “eletrospray” positivo por injeção direta da amostra do peptídeo puro em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, Bruker®, e por HPLC acoplada à espectrometria de massas com ionização por

eletrospray (LC/ESI-MS), permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente. Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para o peptídeo de acordo com seus resíduos de aminoácidos.

3.3 Preparo de inóculo de *Candida albicans*

Os inóculos das três cepas de *C. albicans* foram preparados a partir do micro-organismo liofilizado e reativados em caldo SDB (Kasvi®) sendo então incubados em estufa a 37°C por 24 horas.

Após as 24 horas, uma alçada de leveduras foi semeada em SDA (Kasvi®) e incubada em estufa a 37°C por 48 horas. Passadas as horas de crescimento, a cultura de estoque foi armazenada em geladeira, a 4°C.

Para preparar as suspensões padronizadas, as colônias provenientes da cultura-estoque foram semeadas em SDB com uma incubação de 24 horas a 37°C. Em sequência, uma pequena alíquota do inóculo foi transferida à SDB estéril de modo que se obtivesse uma suspensão de micro-organismo com densidade ótica (DO) no intervalo de 0,100 a 0,150 a 530 nm no espectrofotômetro, o que representa aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada para que a solução final fosse de 1×10^3 células.

3.4 Curvas Analíticas

A fim de facilitar a preparação das microplacas utilizadas para a realização da determinação da concentração inibitória mínima dos peptídeos utilizados neste trabalho, foi utilizada a metodologia da curva analítica devido à dificuldade em aferir com precisão a massa de um peptídeo a partir de balança analítica por conta de suas propriedades eletrostáticas e por se tratar de um material flocoento.

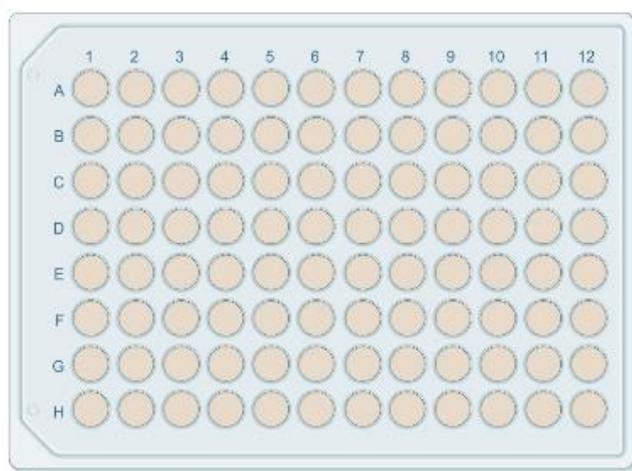
Por isso foi realizado a pesagem de uma massa inicial de peptídeo e, a partir dela, diluída em H₂O para uma concentração inicial. A partir dessa solução inicial, foram preparadas outras 10 soluções diluídas de concentrações: 100; 75; 50; 25; 15; 10; 7,5; 5,0; 2,5 e 1 µmol/L e realizadas as medidas de absorbância a 280 nm em triplicata no espectrofotômetro UV-vis Varian® modelo Cary Eclipse.

3.5 Concentração Inibitória Mínima

Para os testes de atividade antifúngica dos peptídeos frente a *C. albicans*, foi utilizado o método de microdiluição em microplaca, de acordo com o protocolo adaptado do manual M27-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Em uma microplaca de 96 poços (Figura 5), foi adicionado, inicialmente, 100 μ L de SDB estéril. Na coluna 1 foi adicionado então 100 μ L de cada solução-padrão a ser estudada em forma de duplicata, sendo as linhas A e B o peptídeo 0WHst-5, C e D o peptídeo 8WHst-5, E e F o peptídeo 8WHst-5Duo e G e H o fluconazol.

Figura 5: Microplaca de 96 poços



A partir então da coluna 1, foi realizada uma diluição seriada até a coluna 10 e, após a diluição, foi adicionada 100 μ L de suspensão padronizada do inóculo de *C. albicans* da coluna 1 a 11. A coluna 12, por sua vez, teve a adição de 100 μ L de SDB a fim de ser o controle de esterilidade enquanto a coluna 11 seria o controle positivo de crescimento.

A microplaca, então, foi incubada por 48 horas a 37°C e, ao final do período, a inibição de crescimento foi avaliada pela leitura de DO de cada poço através de um espectrofotômetro de microplacas (Biotek® modelo Epoch) a 595 nm.

O teste foi realizado em quintuplicata e a partir das médias das DOs, a inibição de crescimento da levedura foi calculada nas diferentes concentrações de solução-padrão por meio da equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \left(\frac{DO_{\text{poço}} - DO_{\text{meio de cultura}}}{DO_{\text{controle positivo}} - DO_{\text{meio de cultura}}} \right) \right) \cdot 100\%$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 8WHst-5Duo

Para a síntese do peptídeo 8WHst-5Duo foi utilizada a resina Wang na qual o primeiro aminoácido da sequência, arginina (R), já vem acoplado, partindo do C-terminal em direção ao N-terminal, como mostrado na Tabela 1. As informações utilizadas para a realização da síntese foi o grau de substituição da resina utilizada de 0,32 mmol/g e massa de partida da resina pesada sendo 598 mg.

A SPFS foi realizada manualmente, adicionando os aminoácidos e agentes acopladores em excesso de 3 equivalentes molares para garantir o acoplamento eficiente. O último aminoácido adicionado foi o triptofano (W) a fim de proporcionar características fluorescentes ao peptídeo.

Após o procedimento citado no item 3.1, foi realizado a purificação em HPLC sendo comprovada a partir da comparação entre os cromatogramas representados nas Figuras 6 e 7.

Figura 6: Cromatograma peptídeo 8WHst-5Duo bruto.

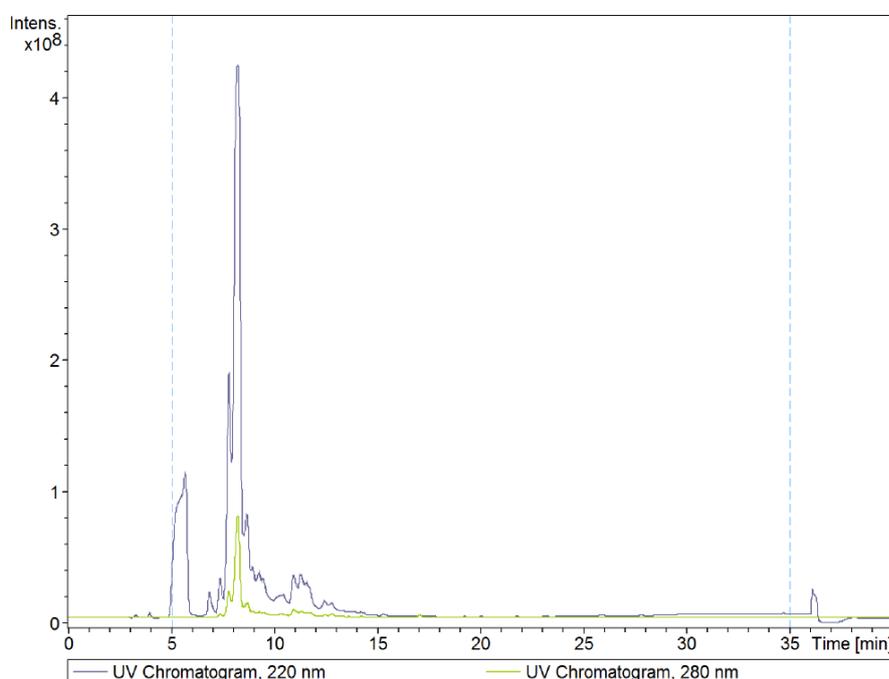
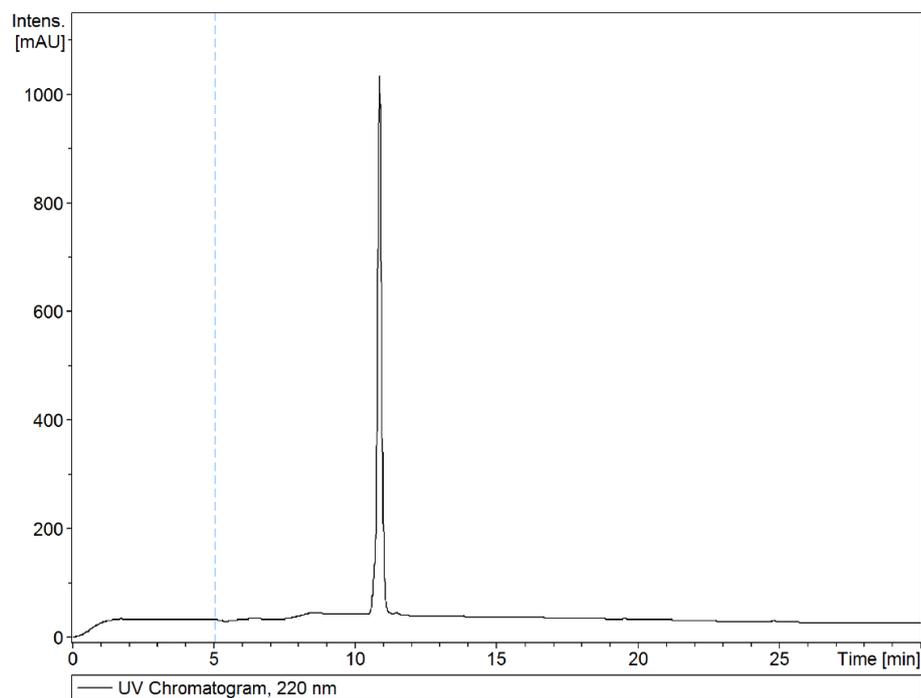
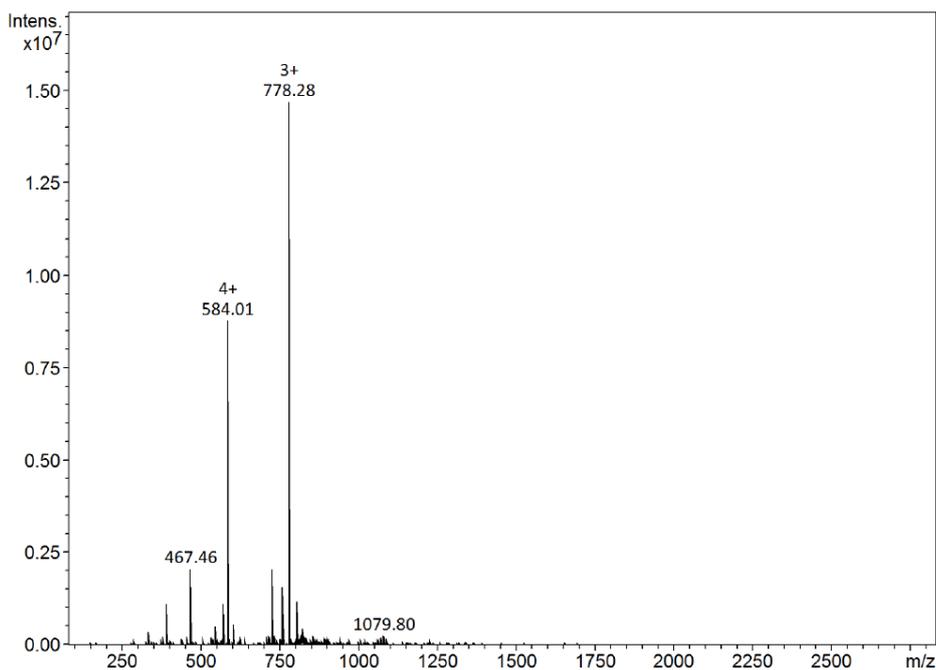


Figura 7: Cromatograma peptídeo 8WHst-5Duo puro.



Foi possível observar então que a purificação foi efetiva, com uma pureza maior que 90%, a qual pode ser comprovada devido o único pico observado no cromatograma da Figura 7. O peptídeo puro foi então caracterizado por determinação da massa molecular, empregando-se espectrometria de massas (ES-MS positivo) por injeção direta da amostra. O objetivo dessa etapa consiste em verificar se cada fração isolada no processo de purificação corresponde de fato ao peptídeo de interesse. O espectro de massas para o peptídeo 8WHst-5Duo está representado na Figura 8.

Figura 8: Espectro de massas do peptídeo 8WHst-5Du puro.



O peptídeo 8WHst-5Duo possui massa molecular teórica igual a 2330,66 g.mol⁻¹. Sendo assim é possível calcular os sinais referentes às razões massa/carga que se espera observar no espectro de massas do peptídeo. Uma comparação entre as razões m/Z teóricas e os sinais confirma que o peptídeo obtido através da síntese química foi de fato o 8WHst-5Duo. Os sinais observados no espectro de massas são referentes aos níveis de ionização entre +3 (m/Z=778,28) e +4 (m/Z=584,01). Na Tabela 2 estão representadas as razões massa/carga esperadas para o peptídeo 8WHst-5Duo para cargas entre +3 e +4.

Tabela 2: Relação m/Z do espectro de massas

8WHst-5Duo					
W K R H H G Y K R K R H H G Y K R					
Teórico			Experimental		
massa	Z	m/Z	massa	Z	m/Z
2330,66	3	777,89	2331,84	3	778,28
	4	583,67		4	584,01

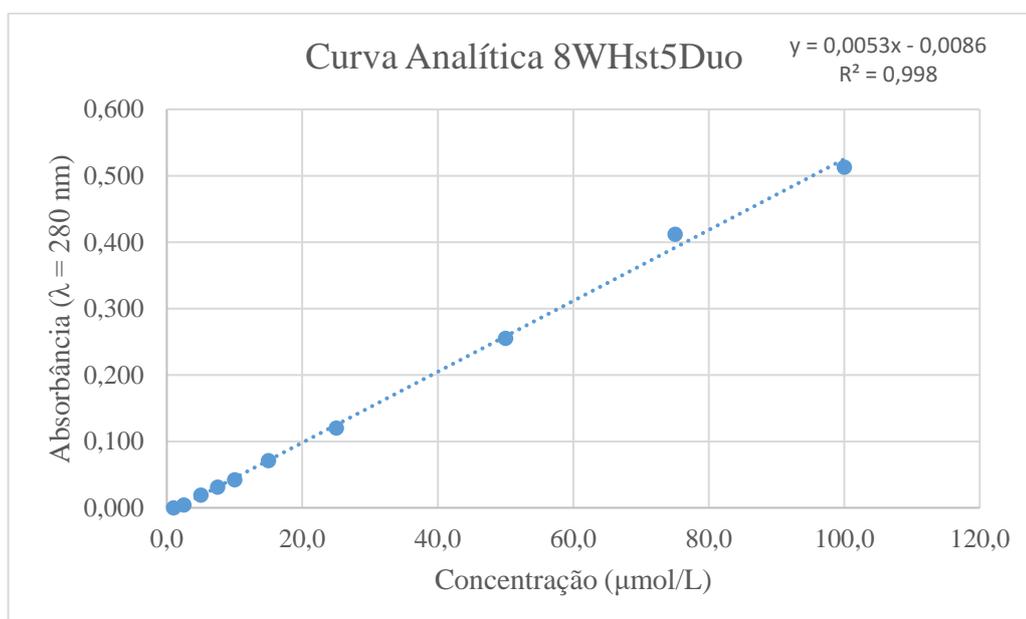
4.2 Curva analítica

Utilizando, então, a estratégia explicada no item 3.4, foram realizadas 3 curvas analíticas, das quais duas são resultado do grupo e encontradas no Anexo 1 e Anexo 2.

Referente a curva do peptídeo 8WHst-5Duo, foi pesado 0,0082 g dele e diluído em 500 μL de H_2O , resultando em uma concentração de 7.036,63 $\mu\text{mol/L}$.

A partir da solução inicial, foi então diluída às concentrações de 100; 75; 50; 25; 15; 10; 7,5; 5,0; 2,5 e 1 $\mu\text{mol/L}$, plotando o gráfico com a média da triplicata dos valores das absorvâncias, obtendo a curva da Figura 9.

Figura 9: Gráfico da Curva Analítica



Com a curva é possível, então, calcular a concentração da solução para preparo da microplaca, que deve ser 640 $\mu\text{mol/L}$, utilizando a equação da reta $[pep] = \frac{Abs+0,0086}{0,0053}$. Sabendo a absorvância obtida pelo UV-vis, é possível interpolar seu valor para o cálculo da concentração, de tal forma que não extrapole a curva analítica.

4.3 Inibição do crescimento do micro-organismo

Considerando a equação demonstrada no item 3.5, é possível observar a porcentagem de inibição referente a cada método de combate frente a *C. albicans*. Com o intuito de comparar

então a efetividade dos peptídeos previamente estudados pelo grupo em comparação ao peptídeo 8WHst-5Duo, foi idealizado os gráficos em barra encontrados na Figura 10, Figura 11 e Figura 12, divididos por concentração.

Figura 10: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 160 $\mu\text{mol/L}$

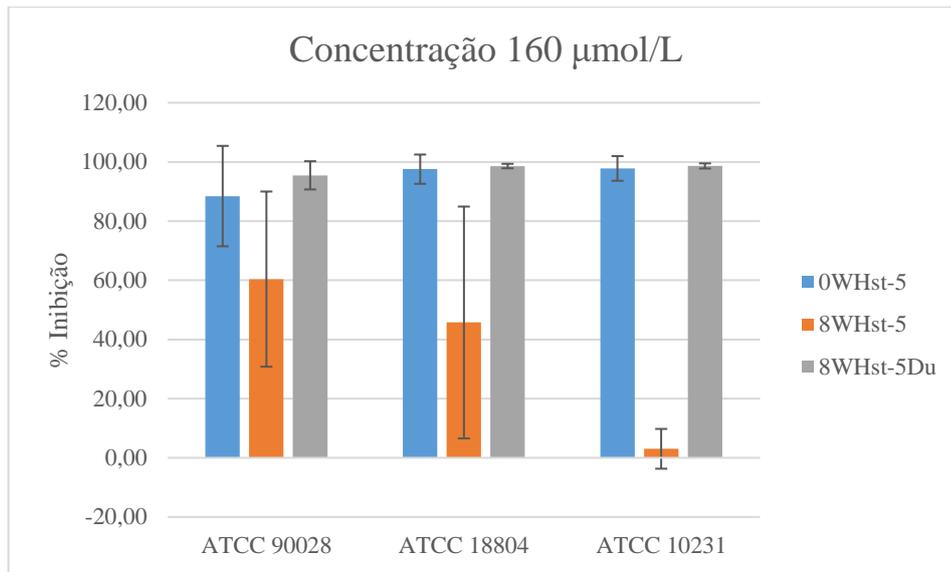


Figura 11: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 80 $\mu\text{mol/L}$

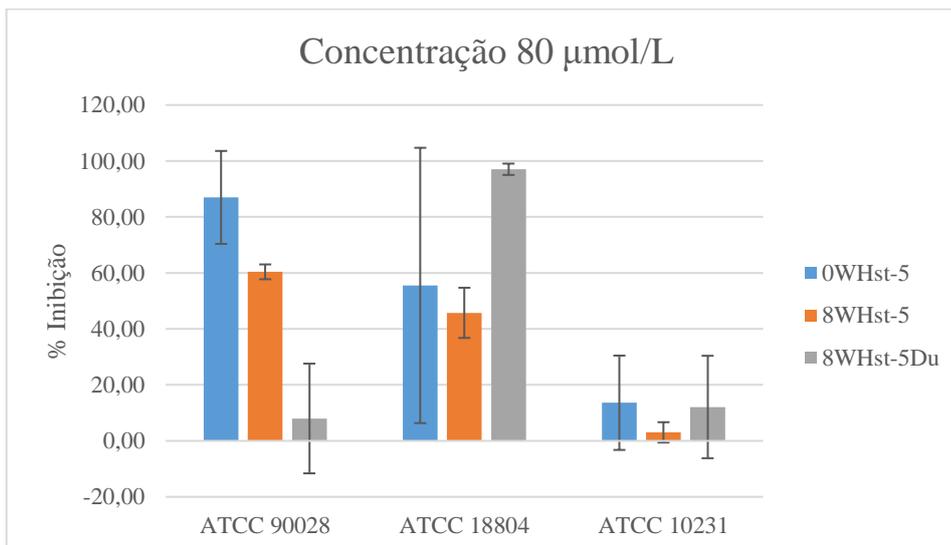
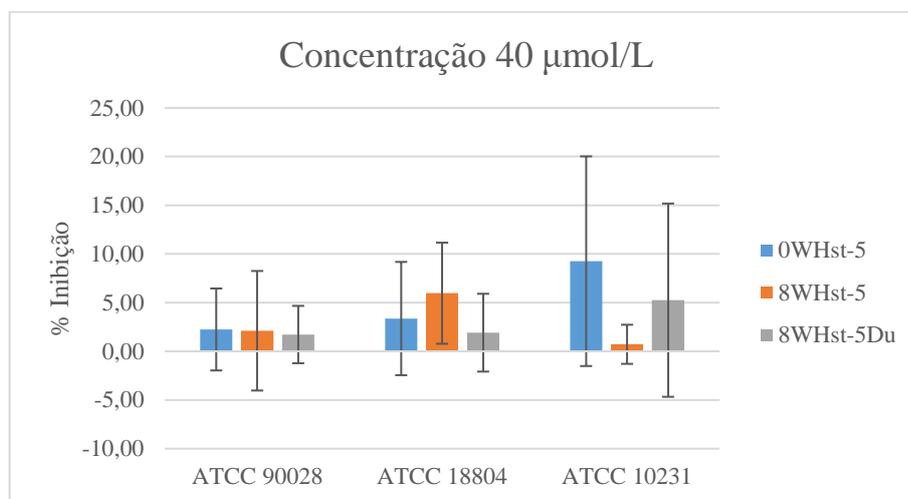


Figura 12: Comparação dos peptídeos para cada cepa em 40 $\mu\text{mol/L}$ 

É possível observar que em concentrações menores que 80 $\mu\text{mol/L}$, a porcentagem de inibição deixa de ser significativa para todos os peptídeos comparados frente às três cepas utilizadas neste estudo. Na concentração de 160 $\mu\text{mol/L}$, o peptídeo 8WHst-5Duo, demonstrou uma inibição de 100% para todas as cepas, inclusive as de ATCC 10231 e 18804 que são resistentes ao fluconazol.

Destaca-se ainda um resultado mais efetivo de inibição dos micro-organismos pelo peptídeo 8WHst-5Duo com relação ao seu precursor 8WHst-5, demonstrando que a estratégia de duplicação da sequência de aminoácidos gerou uma maior efetividade na atividade antifúngica do análogo de Histatina-5 estudado.

4.4 Concentração Inibitória Mínima

Ao considerar uma CIM de 90%, obtêm-se os resultados da Tabela 3 na comparação de todos os agentes utilizados contra *C. albicans*.

Tabela 3: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{mol/L}$

	ATCC 90028	ATCC 18804	ATCC 10231
0WHst-5	>160	160	160
8WHst-5	>160	>160	>160
8WHst-5Du	160	80	160
Flu	10	>160	>160

As cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 são resistentes ao fluconazol, tendo esse fármaco efetivo apenas na cepa ATCC 90028, mesmo com concentrações bem baixas como 10 μmol . Já o fragmento 8WHst-5 não apresenta, nas concentrações estudadas, um resultado de inibição $\geq 90\%$ para nenhuma das cepas, diferentemente do fragmento 8WHst-5Duo.

Para o peptídeo 8WHst-5Duo, a hipótese levantada para CIM $\geq 90\%$ ter sido alcançada em uma concentração menor na cepa ATCC 18804 é de que, por se tratar de uma molécula duplicada, espera-se que a região bioativa desse peptídeo se apresente em concentração duas vezes maior, o que a tornaria mais efetiva no combate ao micro-organismo. Esse comportamento pode estar relacionado com o resultado alcançado, já que para a cepa ATCC 18804, em específico, a CIM foi metade, se comparado com o fragmento 8WHst-5. Além disso, para as demais cepas estudadas, foi observado uma atividade mais efetivas para o peptídeo 8WHst-5Duo em concentrações inferiores em comparação ao seu precursor 8WHst-5.

5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi possível observar que a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) permite a obtenção de análogos estruturais de peptídeos com atividade biológica otimizada. No caso específico desse trabalho, a estratégia de duplicação da sequência de aminoácidos do fragmento de Histatina-5 denominado 8WHst-5, permitiu a obtenção do peptídeo 8WHst-5Duo, que foi mais eficiente no combate a três diferentes cepas de *C. albicans*. A SPFS permitiu a obtenção de maneira eficiente do peptídeo em questão, mesmo apresentando muitos resíduos de aminoácidos de cargas positivas. As etapas de purificação e caracterização puderam comprovar um alto grau de pureza do peptídeo proposto.

A atividade de inibição do peptídeo 8WHst-5Duo frente às cepas de *C. albicans* foi possível em concentrações menores se comparado com o 8WHst-5. Em comparação com a própria Hst-5, os resultados do peptídeo 8WHst-5Duo também se mostraram ligeiramente melhor, com a vantagem de se tratar de um peptídeo contendo um número menor de aminoácidos em sua sequência primária. Analisando a resistência ao fluconazol, a cepa ATCC 90028 é pouco resistente ao fármaco, enquanto as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 apresentam resistência ao medicamento. No entanto, para o peptídeo 8WHst-5Duo, ambas as cepas resistentes a fluconazol, foram inibidas nas concentrações de 80 $\mu\text{mol/L}$ e 160 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Esse resultado demonstra a importância pela busca de novas moléculas que possam servir como alternativa de combate aos micro-organismos resistentes.

Por fim, este trabalho demonstrou que o peptídeo 8WHst-5Duo é um composto promissor como antifúngico para conter infecções por micro-organismos resistentes ao fluconazol, possibilitando assim explorar um novo campo de estudo no combate a *C. albicans*.

6. REFERÊNCIAS

- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. Candidiases. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010. Disponível em: <https://www.bjstd.org/revista/article/view/1070>. Acesso em: 10 aug. 2022.
- CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; LOCKHART, S. R.; MAGILL, S. S.; DERADO, G.; PARK, B. J.; CHILLER, T. M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 10, p. 1352–1361, Nov. 2012.
- EDGERTON, M.; KOSHLUKOVA, S. E.; LO, T. E.; CHRZAN, B. G.; STRAUBINGER, R. M.; RAJ, P. A.. Candidacidal Activity of Salivary Histatins. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 273, n. 32, p. 20438-20447, ago. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.32.20438>.
- HELMERHORST, E. J.; ALAGL, A. S.; SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061–1070, Dec. 2006.
- HELMERHORST, E. J.; BREEUWER, P.; HOF, W. V.; WALGREEN-WETERINGS, E.; OOMEN, L. C. J. M.; VEERMAN, E. C. I.; AMERONGEN, A. V. N.; ABEE, T. The Cellular Target of Histatin 5 on *Candida albicans* Is the Energized Mitochondrion. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 11, p. 7286-7291, mar. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.11.7286>.
- LIN G-Y.; CHEN H-F.; XUE Y-P.; YEH Y-C.; CHEN C-L.; LIU M-S.; CHENG W-C.; LAN C-Y.. 2016. The antimicrobial peptides P-113Du and P-113Tri function against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6369 –6373. doi:10.1128/AAC.00699-16.
- LOCKHART, S. R.; ETIENNE, K. A.; VALLABHANENI, S.; FAROOQI, J.; CHOWDHARY, A.; GOVENDER, N. P.; COLOMBO, A. L.; CALVO, B.; CUOMO, C. A.; DESJARDINS, C. A.; BERKOW, E. L.; CASTANHEIRA, M.; MAGOBO, R. E.; JABEEN, K.; ASGHAR, R. J.; MEIS, J. F.; JACKSON, B.; CHILLER, T.; LITVINTSEVA, A. P. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by

whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 134–140, Jan. 2017.

MISHRA, N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, p. 201–235, 2007. doi: 10.1556/amicr.54.2007.3.1

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J.. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-20, 11 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>.

PFALLER, M. A.; RHOMBERG, P. R.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: Temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and prop. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 303–313, Aug. 2015.

ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-14, 17 abr. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14283>.

ROSSI, T.; LOZOVVOY, M. A. B.; SILVA, V.; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 15-28, 30 jul. 2011. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n1p15>.

RUISSSEN, A. L. A.; GROENINK, J.; HELMERHORST, E. J.; WALGREEN-WETERINGS, E.; HOF, W. V.; VEERMAN, E. C. I.; AMERONGEN, A. V. N.. Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 356, n. 2, p. 361-368, 24 maio 2001. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3560361>.

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

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J.. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 288-305, mar. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>.

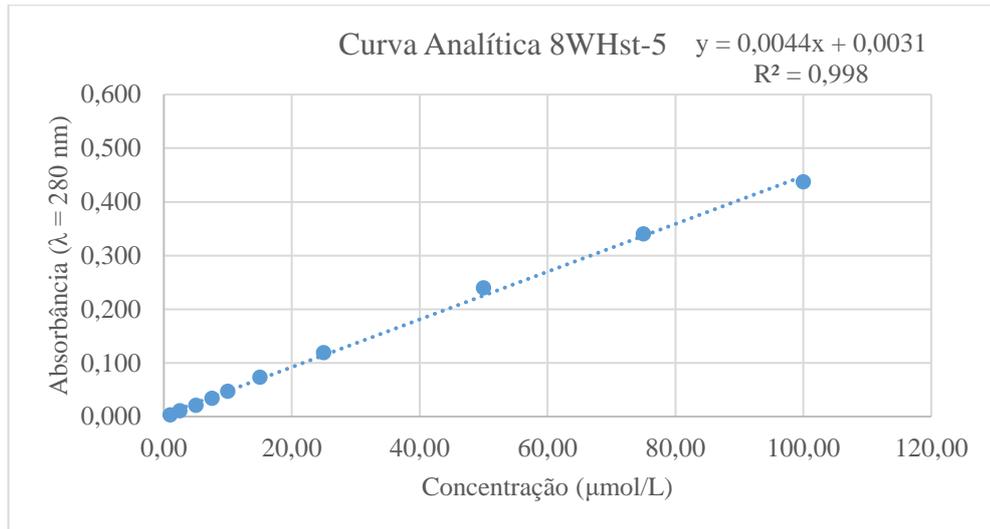
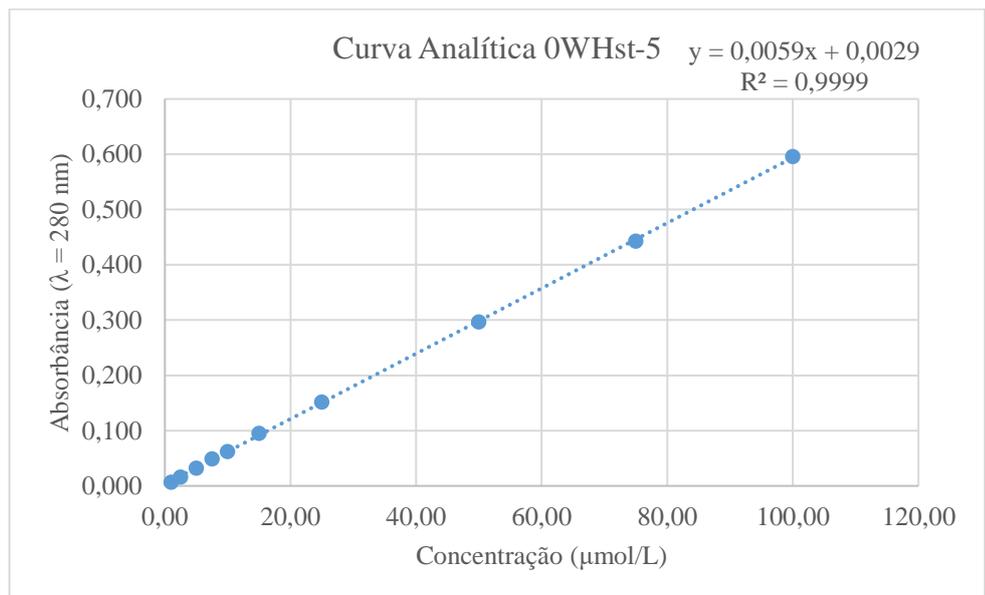
VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina: mecanismos de resistência em *C. albicans*. Santa Catarina, p. 1-2. fev. 2016. Disponível em: http://www.sgponline.com.br/rbac/sgp/doi/article.asp?cod_fluxo=407&cod_versao=440&Obj_Submissao=1. Acesso em: 18 nov. 2022.

ZAMBOM, C. R.. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas com diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico 0WHistatina. Araraquara: [s.n.], 2018.

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

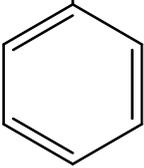
ZOLIN, G. V. S.; FONSECA, F. H.; GARRIDO, S. S.. Complexos metálicos de Histatina 5 como alternativa para o controle de crescimento de *C. albicans*. In: XXXII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2020, Araraquara. **Painel**. Araraquara: Unesp, 2020. p. 1-1.

ANEXOS

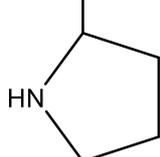
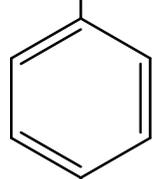
Anexo 1: Curva analítica do peptídeo 8WHst-5**Anexo 2:** Curva analítica do peptídeo 0WHst-5

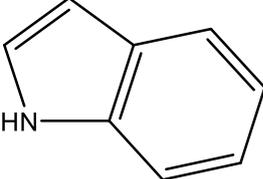
Anexo 3: Aminoácidos e suas respectivas estruturas

Nome	Sigla	Três Letras	Estrutura
Ácido Aspártico	D	Asp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Ácido Glutâmico	E	Glu	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Alanina	A	Ala	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Arginina	R	Arg	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

Asparagina	N	Asp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Cisteína	C	Cys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $
Fenilalanina	F	Phe	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $ 
Glicina	G	Gly	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
Glutamina	Q	Gln	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

Histidina	H	His	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N} \end{array} $
Isoleucina	I	Ile	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucina	L	Leu	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Lisina	K	Lys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

Metionina	M	Met	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Prolina	P	Pro	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \end{array}$ 
Serina	S	Ser	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Tirosina	Y	Tyr	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ 

Treonina	T	Thr	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Triptofano	W	Trp	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N} \end{array}$ 
Valina	V	Val	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$