

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

GABRIELA VIEIRA SILVA ZOLIN

**ANÁLOGOS DE HISTATINA 5 COMPLEXADOS COM ÍONS
METÁLICOS DE PRATA COMO ALTERNATIVA PARA O
COMBATE A *Candida albicans***

Araraquara

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

Gabriela Vieira Silva Zolin

**Análogos de Histatina 5 complexados com íons metálicos de prata como
alternativa para o combate a *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Coorientador: Prof. Dr. Renan Lira de Farias

Araraquara

2023

Z86a

Zolin, Gabriela Vieira Silva

Análogos de Histatina 5 complexados com íons metálicos de prata como alternativa para o combate de *Candida albicans* / Gabriela Vieira Silva Zolin. -- Araraquara, 2023

92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Saulo Santesso Garrido

Coorientador: Renan Lira de Farias

1. Peptídeos - Síntese. 2. Compostos de coordenação. 3. *Candida albicans*. 4. Prata. 5. Relação estrutura-atividade (Bioquímica). I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análogos de Histatina 5 complexados com íons metálicos de prata como alternativa para o combate a *Candida albicans*"

AUTORA: GABRIELA VIEIRA SILVA ZOLIN

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

COORIENTADOR: RENAN LIRA DE FARIAS

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

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

Saulo Santesso
Garrido:2695466080
9
Assinado de forma digital por
Saulo Santesso
Garrido:26954660809
Dados: 2023.03.07 14:14:38 -03'00'

Prof. Dr. FILLIPE VIEIRA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Prof. Dr. RICARDO AUCÉLIO QUEIROZ (Participação Virtual)
Departamento de Química / Centro Técnico-Científico - PUC - Rio de Janeiro

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Gabriela Vieira Silva Zolin

Registro Acadêmico (RA): BIO210031

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP

Estado Civil: Solteira

Filiação: Regina da Silva Santos Zolin Vieira e Paulo Zolin Vieira

Nome em citações bibliográficas: ZOLIN, G. V. S; Gabriela Vieira Silva Zolin

ENDEREÇO PROFISSIONAL

UNESP - Instituto de Química (IQ - UNESP)

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2021-

Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Co-orientador: Prof. Dr. Renan Lira de Farias

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Projeto de Pesquisa: Análogos de Histatina 5 complexados com íons metálicos de prata como alternativa para o combate a *Candida albicans*

2016-2021

Graduação em Química

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

2019-2021

Iniciação Científica (Sem bolsa)

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Projeto de Pesquisa: Complexos Metálicos de Histatina 5 como Alternativa para o Controle de Crescimento de *C. albicans*

2017-2018

Iniciação Científica (Sem bolsa)

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Profa. Dra. Edilene Cristina Ferreira

Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento de método analítico utilizando espectrometria de absorção atômica com fonte contínua para determinação de P em biocarvão

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021-2021

Curso: Comunicação e Escrita Científica

Carga Horária: 4h30

American Chemical Society

2021-2021

Curso: Introdução – Nanotecnologia e Nanotoxicologia

Carga Horária: 8h45

Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

2021-2021

Curso: Ancoragem Molecular de Complexos Metálicos

Carga Horária: 6h

3ª Escola de Modelagem Molecular

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Dia do Químico (Organização)

Carga Horária: 15h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Roda de Conversa: TCC no ensino de química - adaptações para a pesquisa em tempos de distanciamento social

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Palestra: Aplicações da Química na Guerra

Carga Horária: 1h30

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Palestra: Fogo à Nanotecnologia: A Evolução da Emissão de Luz

Carga Horária: 1h30

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Palestra: Novas Matrizes Energéticas

Carga Horária: 1h30

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Palestra: Mulheres na Ciência

Carga Horária: 1h30

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2020-2020

Palestra: Pesquisa x Indústria x Educação

Carga Horária: 1h30

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2019-2019

Curso: Química Medicinal

Carga Horária: 6h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2019-2019

Palestra: Formação de Pesquisadores e Escrita Científica de Alto Nível

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2019-2019

Palestra: Conselho Regional de Química

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2019-2019

Palestra: Afinal, o que fazem os químicos?

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2019-2019

Workshop: Gestão de Qualidade em Laboratórios de Análises Químicas

Carga Horária: 4h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2017-2017

Curso: Química Forense

Carga Horária: 8h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2017-2017

Palestra: O Fazer Ciência em 10 Palavras ou, de Onde Vem, mesmo, o Conhecimento?

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2017-2017

Workshop: AIESEC

Carga Horária: 2h

Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFIA

Artigos completos publicados em periódicos

Zolin, G.V.S.; Fonseca, F.H.d.; Zambom, C.R.; Garrido, S.S. Histatin 5 Metallopeptides and Their Potential against *Candida albicans* Pathogenicity and Drug Resistance. *Biomolecules* 2021, 11, 1209.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Apresentação do trabalho intitulado "Complexos Metálicos de Histatina 5 como Alternativa para o Controle de Crescimento de *C. albicans*" na primeira fase do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (2020).

Apresentação do trabalho intitulado “Histatina 5 e Novas Estratégias no Combate a *C. albicans*” na Semana da Engenharia Química (SEQ) da UNESP de Araraquara (2021).

*Este trabalho é dedicado à minha irmã,
Júlia (Deary).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, Paulo e minha irmã, Júlia, por todo amor incondicional, companheirismo, ensinamentos e apoio, sempre me motivando a buscar o melhor para mim. Ao meu pai, por sempre ler e me ajudar com todos os meus textos e trabalhos, e à minha irmã, por me ouvir falar constantemente sobre fungos e peptídeos, mesmo sem entender nada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Saulo por ter me aceitado como orientanda de Mestrado, por sempre apoiar e confiar no meu trabalho, me deixando descobrir meu próprio caminho, estando presente não apenas na minha formação acadêmica, mas na formação pessoal.

Ao meu querido coorientador, Prof. Renan, agradeço imensamente por ter aceitado a coorientação, não há como mensurar toda a ajuda, paciência e ensinamentos, sempre com leveza e alegria. Obrigada por trazer um pouco de luz para a complexidade da inorgânica. Esse trabalho não existiria sem você.

Agradeço profundamente aos meus maiores companheiros de laboratório, Fauller e Naiara (minha metadinha), por serem sempre meu apoio emocional, por todas as ideias geniais de como executar experimentos, pelo companheirismo nas horas de sufoco e de felicidade, por dividirem o mesmo neurônio que eu, pelas gambiarras e pelas inúmeras horas do café. Amo vocês mais do que posso expressar.

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório de Síntese, Estrutura e Aplicação de Peptídeos e Proteínas: Beatriz, Giovanna, Carol, Jéssica, Gregório, Isadora e Mariana, por tornarem o ambiente do laboratório sempre leve e agradável, pelos momentos de descontração e por toda a troca e ajuda sempre.

Aos meus amigos da UNESP: Ana Carolina, Giovana, Rebecca, Gabriela, João Pedro, Roberto, William, Beatriz Campanhol, Jonatas e David, pela amizade ao longo de todos esses anos e por todos os momentos que tornaram minha trajetória pela UNESP tão especial.

À Prof. Patrícia Santiago e ao Prof. Adelino Vieira, agradeço a presença na banca do exame de qualificação, por todas as ideias e sugestões extremamente significativas, que abriram diversos caminhos para a finalização desse trabalho. Agradeço ao Prof. Adelino pelos experimentos realizados no departamento de inorgânica, e toda a ajuda prestada para o uso de serviços externos.

Agradeço imensamente à Prof. Ana Marisa e ao doutorando William, do laboratório de Proteômica das Ciências Farmacêuticas, por abrirem o laboratório para mim e por toda a ajuda com os testes de toxicidade.

Ao Crusca, agradeço por toda a ajuda com a parte de purificação e caracterização dos peptídeos, e por sempre me ensinar um pouco mais sobre as técnicas.

Agradeço ao técnico Alberto Alécio, por todo o auxílio prestado para a realização dos experimentos de dicroísmo circular.

Aos professores Paulo Zolin e Alessandro Trovato, agradeço por terem desenvolvido a planilha de tratamento de dados de fluorescência, que permitiu extensos ajustes em apenas poucos minutos.

Ao professor Reinaldo Marchetto, agradeço a presença e a disposição para ajudar em todos os momentos necessários, sempre de forma muito didática.

À professora Fernanda Zanolli, agradeço a orientação durante o estágio docência, e por todo o apoio, incentivo e momentos de descontração.

Agradeço a todos os funcionários e servidores do Instituto de Química, pela manutenção e conservação do Instituto, e pelo trabalho constante, visando sempre a melhoria.

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

“Nem todos que vagueiam estão perdidos”

J.R.R. Tolkien

Mas eu com certeza estou.

Resumo

A *Candida albicans* é principal causadora de infecções fúngicas. As limitadas classes de medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções, assim como seu uso excessivo, potencializam o surgimento de resistência aos medicamentos. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) foram identificados em diversos organismos e possuem diversas estruturas e funções, como atividades antimicrobianas e imunomoduladoras, e são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos. A histatina 5 é um AMP encontrado na cavidade oral, que possui a mais alta atividade antifúngica contra *C. albicans*, incluindo cepas resistentes aos agentes antifúngicos mais comumente usados. A atividade do peptídeo, porém, pode sofrer interferências na cavidade oral, bem proteólise mediada ou não pela *C. albicans*. Adaptações na estrutura do peptídeo, como o uso de fragmentos proteolíticos e a troca de resíduos de aminoácidos, foram empregados visando uma maior eficiência da ação antimicrobiana do peptídeo, bem como a redução da proteólise. O trabalho também propôs a coordenação dos peptídeos com íons metálicos de prata, como uma alternativa para o desenvolvimento de agentes antifúngicos. O uso de fragmentos bioativos contendo a porção C-terminal da Hst5 demonstraram atividade antifúngica otimizada em relação ao peptídeo original, e a troca de fragmentos de lisina por arginina foi capaz de aumentar a eficiência dos fragmentos proteolíticos. Os compostos de coordenação foram formados entre os peptídeos e Ag(I) na proporção molar 1:1, como comprovado pelos estudos de supressão de fluorescência e espectrometria de massas. Além disso, foi possível observar uma mudança na conformação dos peptídeos quando coordenados com Ag(I), perdendo a tendência de α -hélice, indicando uma associação na parte central das moléculas, pelas cadeias laterais dos resíduos de histidina. Os compostos de coordenação apresentaram forte ação antifúngica quando comparados aos peptídeos isolados, chegando a concentrações inibitórias mínimas de 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes cepas de *C. albicans*. Os peptídeos e compostos de coordenação foram avaliados quanto sua toxicidade, e apresentaram margem de segurança para uso como tratamentos antifúngicos em suas concentrações inibitórias mínimas.

Palavras-chave: Agentes antifúngicos. Histatina 5. *Candida albicans*.

Abstract

Candida albicans is the main cause of fungal infections. The limited classes of drugs available for the infection's treatment, as well as their excessive use, potentiate the emergence of drug resistance. Antimicrobial peptides (AMPs) have been identified in several organisms and have different structures and functions, such as antimicrobial and immunomodulatory activities, and are promising candidates for the development of new antifungal drugs. Histatin 5 is an AMP found in the oral cavity that has the highest antifungal activity against *C. albicans*, including strains resistant to the most used antifungal agents. The activity of the peptide, however, may suffer interference in the oral cavity, as well as proteolysis mediated or not by *C. albicans*. Adaptations in the peptide's structure, such as the use of proteolytic fragments and the exchange of amino acid residues, were employed aiming at a greater efficiency of the antimicrobial action of the peptide, as well as the reduction of proteolysis. The work also proposed the coordination of peptides with metallic silver ions, as an alternative for the development of antifungal agents. The use of bioactive fragments containing the C-terminal portion of Hst5 demonstrated optimized antifungal activity compared to the original peptide, and the exchange of lysine fragments for arginine was able to increase the efficiency of the proteolytic fragments. Coordination compounds were formed between peptides and Ag(I) in a 1:1 molar ratio, as confirmed by fluorescence suppression and mass spectrometry studies. Furthermore, it was possible to observe a change in the conformation of the peptides when coordinated with Ag(I), losing the α -helix tendency, indicating an association in the central part of the molecules, by the side chains of histidine residues. Coordination compounds showed strong antifungal action when compared to isolated peptides, reaching minimum inhibitory concentrations of 10 and 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in different strains of *C. albicans*. Peptides and coordination compounds were evaluated for their toxicity and showed a margin of safety for use as antifungal treatments at their minimum inhibitory concentrations.

Keywords: Antifungal agents. Histatin 5. *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura da <i>Candida albicans</i>	25
Figura 02. Mecanismos de ação de medicamentos azólicos e poliênicos na membrana celular fúngica.	28
Figura 03. Mecanismos de entrada e ação antifúngica da Hst5 na célula de <i>C. albicans</i>	32
Figura 04. Representação da estrutura 3D dos peptídeos (A) 14 Hst5 e (B) 14 Hst5 K11,17R.	34
Figura 05. Representação da estrutura 3D dos peptídeos (A) 15 Hst5 e (B) 15 Hst5 K11R.	35
Figura 06. Estrutura da histatina 5, com destaque para os motivos de coordenação metálica ATCUN e HEXXH.	37
Figura 07. Esquema das etapas da Síntese em Fase Sólida, que ocorrem de forma cíclica até a obtenção do peptídeo desejado.	41
Figura 08. Reação colorimétrica de redução do cloreto de trifênil tetrazólico (incolor) para trifênilfornazam (vermelho), indicando viabilidade celular.	46
Figura 09. Perfil cromatográfico do peptídeo 14 Hst5; (A) peptídeo bruto; (B) peptídeo purificado.	49
Figura 10. Perfil cromatográfico do peptídeo 14 Hst5 K11,17R; (A) peptídeo bruto; (B) peptídeo purificado.	50
Figura 11. Perfil cromatográfico do peptídeo 15 Hst5; (A) peptídeo bruto; (B) peptídeo purificado.	51
Figura 12. Perfil cromatográfico do peptídeo 15 Hst5 K11R; (A) peptídeo bruto; (B) peptídeo purificado.	52
Figura 13. Espectro de massas obtido para os peptídeos (A) 14 Hst5; (B) 14 Hst5 K11,17R; (C) 15 Hst5 e (D) 15 Hst5 K11R, após purificação, indicando a obtenção dos peptídeos puros e confirmando suas massas moleculares.	53
Figura 14. Perfis de fluorescência da intensidade de emissão nos comprimentos de onda de 300 a 450 nm, para diferentes equivalentes de complexação entre Ag(I) e (A) 14 Hst5 e (B) 14 Hst5 K11,17R, ambos os peptídeos na concentração fixa de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	56
Figura 15. Perfis de fluorescência da intensidade de emissão nos comprimentos de onda de 300 a 450 nm, para diferentes equivalentes de complexação entre Ag(I) e (A) 15 Hst5 e (B) 15 Hst5 K11R, ambos os peptídeos na concentração fixa de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	58
Figura 16. Perfis de fluorescência da complexação 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag, 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag, a partir da área de emissão de fluorescência.	59
Figura 17. Efeito da temperatura na interação dos peptídeos (A) 14 Hst5 e (B) 14 Hst5 K11,17R com Ag(I). Ag(I) (0,25 a 16 equivalentes molares) foi	

adicionado, por titulação, a uma solução de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeo, e a fluorescência medida com excitação a 280 nm, a 25° e 45°C.....	60
Figura 18. Efeito da temperatura na interação dos peptídeos (A) 15 Hst5 e (B) 15 Hst5 K11R com Ag(I). Ag(I) (0,25 a 16 equivalentes molares) foi adicionado, por titulação, a uma solução de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeo, e a fluorescência medida com excitação a 280 nm, a 25° e 45°C.....	62
Figura 19. Dicroísmo circular, de 200 a 250 nm, dos peptídeos Hst5; 14 Hst5; 14 Hst5 K11,17R; 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, e complexos 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag; 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag, em água, a temperatura ambiente, suavizados em 50 pontos.	64
Figura 20. Espectros de infravermelho, de 4000 a 400 cm^{-1} , obtidos em KBr, para os peptídeos e complexos (A) 14 Hst5 e 14 Hst5 – Ag e (B) 14 Hst5 K11,17R e 14 Hst5 K11,17R – Ag;.....	67
Figura 21. Espectros de infravermelho, de 4000 a 400 cm^{-1} , obtidos em KBr, para os peptídeos e complexos (A) 15 Hst5 e 15 Hst5 – Ag; e (B) 15 Hst5 K11R e 15 Hst5 K11R – Ag.....	68
Figura 22. Formas tautoméricas da histidina.....	70
Figura 23. Representação da estrutura 3D do composto de coordenação formado entre o peptídeo 14 Hst5 e Ag(I).	71
Figura 24. Espectro de massas por MALDI-TOF dos compostos de coordenação (A) 14 Hst5 – Ag e (B) 14 Hst5 K11,17R – Ag.	72
Figura 25. Espectro de massas por MALDI-TOF dos compostos de coordenação (A) 15 Hst5 – Ag e (B) 15 Hst5 K11R – Ag.	73
Figura 26. Inibição do crescimento de células planctônicas de <i>C. albicans</i> pelos peptídeos Hst5, 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5, 15 Hst5 K11R, seus respectivos complexos nas cepas (A) ATCC 90028 (B) ATCC 18804 (C) ATCC 10231.	76
Figura 27. Viabilidade de células OSCC após incubação com diferentes concentrações dos peptídeos 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R. O traço pontilhado indica 50% de viabilidade celular.	82
Figura 28. Viabilidade de células OSCC após incubação com diferentes concentrações dos compostos de coordenação 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag, 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag. O traço pontilhado indica 50% de viabilidade celular.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Estrutura primária dos peptídeos histatina 1, histatina 3 e histatina 5.....	31
Tabela 02. Estrutura primária dos fragmentos de Hst5, 14 Hst5 e 15 Hst5, e seus respectivos análogos com a modificação dos resíduos de lisina 11 e 17 para arginina.	33
Tabela 03. Estrutura primária dos quatro peptídeos sintetizados, com adição de um resíduo de triptofano (W) ao N-terminal de cada cadeia.	40
Tabela 04. Concentrações das soluções de peptídeo e das soluções de metal, e sua respectiva razão molar.	43
Tabela 05. Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas para os peptídeos sintetizados.	55
Tabela 06. Constante de supressão de luminosidade (K), em 25° e 45 °C.	63
Tabela 07. Comprimentos de onda característicos para análise da estrutura secundária da Hst5 e derivados, e seus respectivos valores de $[\theta]_M$ obtidos para os peptídeos e compostos de coordenação.	65
Tabela 08. Números de onda correspondentes às bandas teóricas de amida I e amida II, bem como ao estiramento CH ₂ da molécula de histidina, e os valores obtidos pela espectroscopia de infravermelho para os peptídeos e complexos estudados.....	69
Tabela 09. Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas por MALDI-TOF para os compostos de coordenação.....	74
Tabela 10. Concentração inibitória mínima dos peptídeos e complexos estudados nas cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231.....	79
Tabela 11. Porcentagem de atividade hemolítica dos complexos estudados em sua concentração inibitória mínima de atividade antifúngica contra <i>C. albicans</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	Adenosina monofosfato
AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCUN	<i>Amino-terminal copper and nickel binding unit</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CIM	Concentração inibitória mínima
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI-MS	<i>Eletron Spray ionization-Mass spectrometry</i>
Flu	Fluconazol
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonila
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanossulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOBt	<i>N</i> -Hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High performace liquid chromatography</i>
Hsp70	Proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons
Hst1	Histatina 1
Hst3	Histatina 3
Hst5	Histatina 5
kDa	Quilodalton
Nys	Nistatina
OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

RNA	Ácido ribonucleico
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
<i>spp.</i>	Espécies
TFA	Ácido Trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
célula.mL ⁻¹	Número de células por mililitro
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
θ	Teta
λ	Lambda
ν	Nu
π	Pi
τ	Tau
μmol L ⁻¹	Micromol por litro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ala	(A)	Alanina
Arg	(R)	Arginina
Asn	(N)	Asparagina
Asp	(D)	Ácido aspártico
Glu	(E)	Ácido glutâmico
Cis/Cys	(C)	Cisteína
Gli/Gly	(G)	Glicina
Gln	(Q)	Glutamina
His	(H)	Histidina
Ile	(I)	Isoleucina
Leu	(L)	Leucina
Lis/Lys	(K)	Lisina
Met	(M)	Metionina
Fen/Phe	(F)	Fenilalanina
Pro	(P)	Prolina
Ser	(S)	Serina
Tir/Tyr	(Y)	Tirosina
The/Thr	(T)	Treonina
Trp	(W)	Triptofano
Val	(V)	Valina

SUMÁRIO

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	24
a. <i>Candida albicans</i> : morfologia, virulência e resposta imune	24
b. Tratamentos antifúngicos contra <i>C. albicans</i>	26
c. Peptídeos antimicrobianos como alternativas de tratamento	29
d. Histatina 5: ação antifúngica e novas estratégias de uso	30
e. Compostos de coordenação metalopeptídicos para otimização da atividade	36
2. Objetivos	39
3. Materiais e Métodos	40
a. Síntese em fase sólida e clivagem dos peptídeos propostos	40
b. Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos	42
c. Formação e caracterização dos compostos de coordenação	42
i. Formação dos compostos metalopeptídicos	42
ii. Supressão de fluorescência	43
iii. Análise de dicroísmo circular	43
iv. Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	44
v. Análises de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF	44
d. Ensaio microbiológicos	44
i. Preparo dos inóculos de <i>C. albicans</i>	44
ii. Determinação da concentração inibitória mínima	45
iii. Avaliação da atividade hemolítica	46
iv. Determinação da toxicidade celular	47
4. Resultados e discussão	48
a. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos	48
b. Formação e caracterização dos compostos de coordenação	55
i. Formação dos compostos metalopeptídicos	55
ii. Supressão de fluorescência	59
iii. Análise de dicroísmo circular	63
iv. Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	66
v. Análises de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF	71
c. Ensaio Microbiológicos	75

i.	Inibição do crescimento da <i>C. albicans</i>	75
ii.	Concentração inibitória mínima	78
iii.	Avaliação da atividade hemolítica	81
iv.	Determinação da toxicidade celular	82
5.	Conclusão	85
6.	Referências	86

1. Introdução

a. *Candida albicans*: morfologia, virulência e resposta imune

O desenvolvimento de tratamentos antibióticos, somados à crescente incidência em casos de AIDS, câncer e outras doenças imunossupressoras no século XX potencializaram a ameaça das infecções fúngicas, que hoje estão entre os principais problemas de saúde no mundo (VANDERPUTTE, 2012; BONGOMIN, 2017). Dois tipos de microrganismos são mais comuns em infecções fúngicas: fungos filamentosos, usualmente patógenos primários, que são naturalmente capazes de estabelecer uma infecção em populações saudáveis, e leveduras, que se caracterizam como patógenos oportunistas, capazes de estabelecer infecções no hospedeiro apenas quando certas condições são atendidas (VANDEPUTTE, 2012).

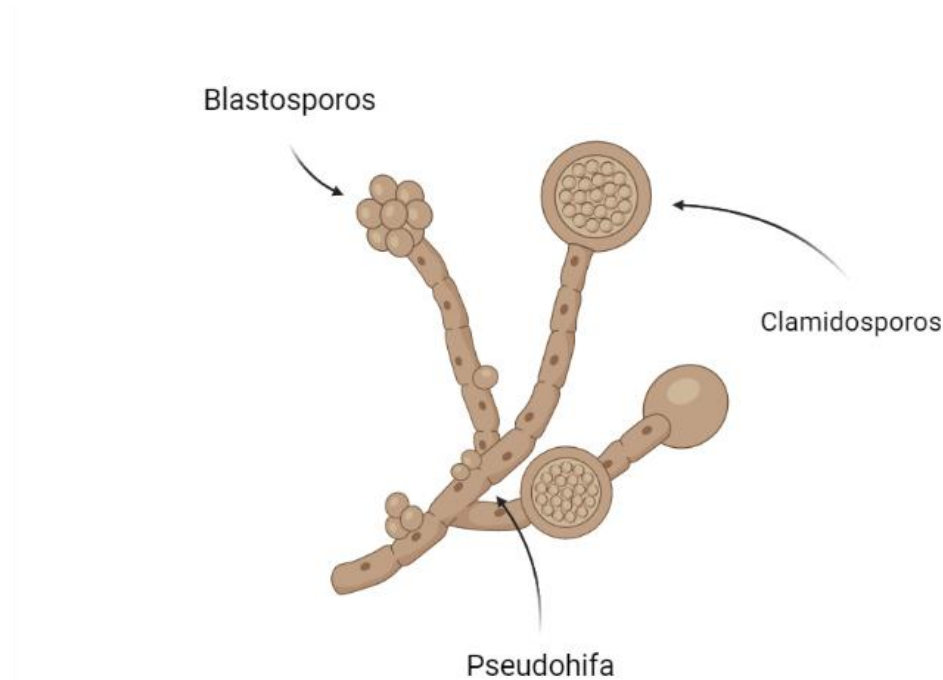
Dentre as diversas infecções fúngicas, a candidíase se destaca por maior incidência, afetando mais de 3,5 milhões de pessoas, especialmente pacientes imunossuprimidos devido a doenças como leucemia, HIV e diabetes melito, além daqueles que fazem uso de próteses dentárias, bem como crianças de 0 a 18 meses. O uso de anticoncepcionais, corticoides e antibióticos de amplo espectro, bem como tratamentos de hemodiálise, quimioterapia e cateteres venosos centrais também podem favorecer a infecção (AKPAN, 2002; LYNCH, 1994; SPAMPINATO, 2013). A candidíase pode ocorrer de forma tópica (superficial), como infecções na pele e em mucosas, ou de forma sistêmica (invasiva), onde pode infectar órgãos e se espalhar através do sangue (candidemia), possuindo uma alta taxa de morbidade e mortalidade (SANTOS, 2018; SARDI, 2013).

O gênero *Candida*, responsável pelas infecções do tipo candidíase, é composto por mais de 200 espécies com características culturais macro e microscópicas semelhantes, sendo células eucarióticas não-fotossintéticas, capazes de metabolizar glicose em condições aeróbias e anaeróbias, e com temperatura de crescimento ideal em torno de 37°C, temperatura natural de seu hospedeiro, uma vez que os fungos do gênero *Candida* são parte da microbiota de seres humanos, onde habitam os tratos oral, gastrointestinal e geniturinário como comensais (AKPAN, 2002). Espécies como *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, além da espécie super-resistente *C. auris*, já relatada em diversos casos no Brasil, estão se tornando cada vez mais comuns em casos de infecção, entretanto, a espécie predominante continua a ser *C. albicans* (LYNCH, 1994; DADAR, 2018; ANVISA, 2022).

C. albicans, maior representante do gênero *Candida*, é encontrada naturalmente na microbiota humana na forma de comensal, associada a morfologia de levedura. Sendo um microrganismo polimórfico diploide, é capaz de transitar entre a morfologia de levedura, inofensiva, e a forma hifal, apresentada na figura 01, associada à patologia, sendo a transição morfológica, portanto, fator determinante no desencadeamento da infecção (WILSON, 2016).

A forma comensal é mantida por uma interação tripartida entre a microbiota, o organismo e a imunidade do hospedeiro (DADAR, 2018). De forma a garantir sua sobrevivência, a *C. albicans* desenvolveu uma série de mecanismos de adaptação, que possibilitam ao fungo resistir a variações de pH e à escassez de nutrientes. Privada de nutrientes, a *C. albicans* é capaz de metabolizar aminoácidos pela fonte de carbono, e o nitrogênio, excretado na forma de amônia, pode modular o pH extracelular na região circundante, e dessa forma, induzir a formação de hifas no microrganismo (VYLKOVA, 2017).

Figura 01. Estrutura da *Candida albicans*.



Criado com BioRender.com. Elaborado pela autora, 2022.

A virulência da *C. albicans* se inicia a partir da transição morfológica do fungo. O crescimento hifal pode ocorrer de forma direcionada, conhecido como tigmotropismo, que auxilia na penetração do fungo em células epiteliais. A expressão de adesinas e invasinas, além de outras enzimas hidrolíticas, são essenciais para os processos de invasão celular, que podem se dar por penetração ativa, onde enzimas líticas, tais como proteases aspárticas segregadas (Saps), digerem compostos da superfície celular epitelial, com auxílio da força física das hifas; ou por endocitose induzida, onde o fungo adere à superfície celular epitelial através de adesinas, o que estimula a célula a produzir estruturas semelhantes à pseudópodes, cercando e atraindo a *C. albicans* para dentro da célula (NAGLIK, 2011; DALLE, 2010). O fim do processo se dá pela indução de danos, que pode ocorrer por apoptose, com uma quebra bioquímica da célula em corpos apoptóticos ligados à membrana, ou por necrose, caracterizada por edema mitocondrial e aumento da permeabilidade da

membrana plasmática, podendo ser induzida por agentes externos, associados ou secretados pela *C. albicans* (JACOBSEN, 2012).

A formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas também é um importante fator de virulência da *C. albicans*. As células fúngicas são capazes de se identificar pela detecção de um quórum. Uma vez detectado, as células fúngicas são capazes de aderir umas às outras, formando uma matriz extracelular, que permite um acúmulo e compartilhamento de nutrientes, o que leva à proliferação, e consequente dispersão das células (MAYER, 2013). A formação de biofilmes é de grande preocupação durante a virulência devido à alta resistência que apresenta, que inclui a plasticidade metabólica, a arquitetura complexa e matriz do biofilme, e o aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas (FANNING, 2012).

O reconhecimento do estado infeccioso se dá pelas próprias células epiteliais, que são capazes de distinguir os estados de levedura e hifas, iniciando assim o recrutamento, diferenciação e ativação de diversas células imunes, como neutrófilos, células dendríticas e células T, que são essenciais para mediar respostas inatas e adaptativas que resultarão em imunidade protetora (NAGLIK, 2011). Tal discriminação entre as células patógenas e comensais é relevante em casos como a da *C. albicans* pois evita uma resposta inflamatória mais intensa que o necessário, o que poderia levar a danos no tecido hospedeiro, favorecendo a prevalência da infecção (JACOBSEN, 2012). O sistema imunológico atua através da produção de espécies reativas de oxigênio e substâncias antimicrobianas, de armadilhas extracelulares, como redes de fibras de cromatina revestidas com moléculas capazes de capturar e matar *C. albicans*, e pela fagocitose das células fúngicas, que sofrem com alterações de pH, proteases e fluxos de potássio dentro do fagossomo (BROWN, 2014). Entretanto, o fungo é capaz de superar as tentativas de inibição da infecção pelo sistema imune, através da liberação de proteínas bloqueadoras e enzimas hidrolíticas, bem como pela adaptação ao estresse gerado (ZHU, 2010; ZIPFEL, 2009).

b. Tratamentos antifúngicos contra *C. albicans*

O uso de medicamentos antifúngicos é utilizado em casos em que o sistema imune não é capaz de, sozinho, combater as infecções. Em infecções superficiais, como micoses ou candidíase em mucosas, a terapia tópica é utilizada como tratamento de primeira linha. Esta também é aplicada em casos de infecções sistêmicas, reduzindo a dose e o tempo de tratamento. A terapia sistêmica é utilizada principalmente em casos graves da doença, mas também em pacientes intolerantes ou refratários ao tratamento tópico. (AKPAN, 2002; EPSTEIN, 1998; SPAMPINATO, 2013).

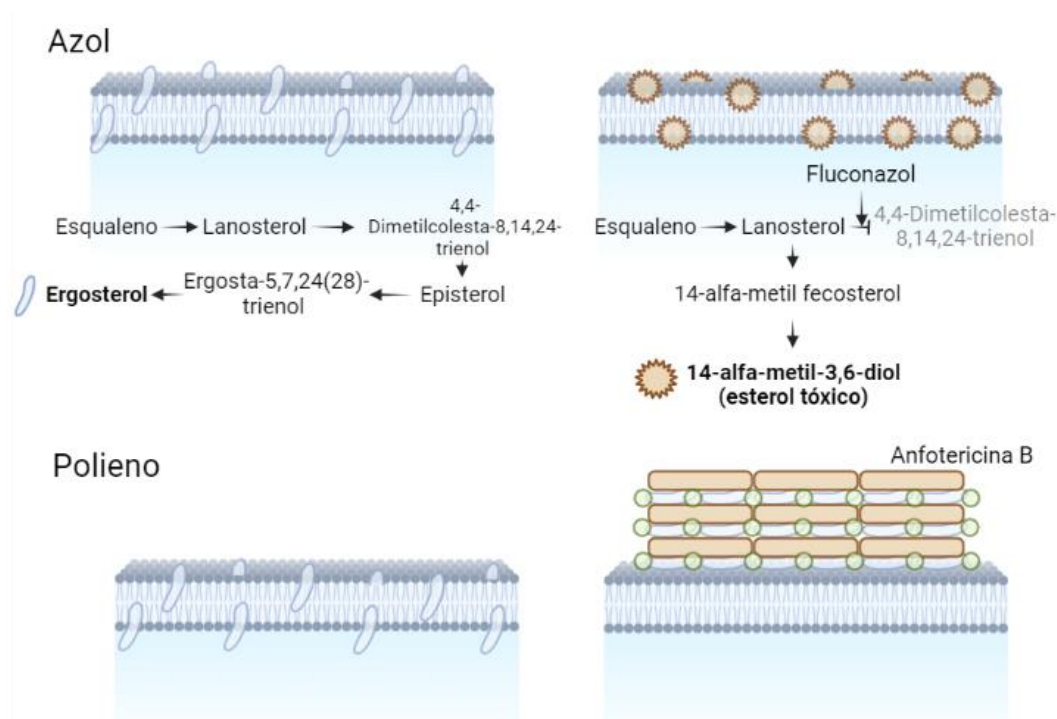
As principais classes de medicamentos utilizadas no tratamento de infecções causadas por *C. albicans* incluem azóis, que são capazes de interferir na membrana celular, inibindo as atividades de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol, sendo a principal classe utilizada; e polienos, capazes

de se ligar ao ergosterol, resultando na formação de poros aquosos intercalados na membrana, que possibilitam o vazamento do conteúdo intracelular, e, portanto, na morte da célula. Os mecanismos de ambas as classes estão exemplificados na figura 02. Outra classe de medicamento que tem ganhado destaque no mercado é a das equinocandinas, lipopeptídeos capazes de inibir, por meio do bloqueio não competitivo da sintase, a síntese da parede fúngica, levando a estruturas com a integridade prejudicada, e assim, a uma maior vulnerabilidade celular à lise osmótica (SPAMPINATO, 2013; COWEN, 2008; PERLIN, 2017). Flucitosina, alilaminas e tiocarbamatos são outros exemplos de classes de agentes antifúngicos, com menos representantes comerciais para o tratamento de *C. albicans*.

Fluconazol (azol), nistatina e anfotericina B (polienos) são os principais medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas, sendo o primeiro o mais comercializado, tanto para casos tópicos como sistêmicos. A nistatina é utilizada principalmente para casos tópicos, como candidíase oral, enquanto a anfotericina B é aplicada em tratamentos sistêmicos, e embora tenha formulações atuais menos tóxicas do que as primeiras desenvolvidas, tem uso de forma mais ampla impedido pelo elevado custo na produção (AKPAN, 2002; PERLIN, 2017; SPAMPINATO, 2013).

A toxicidade dos polienos está principalmente relacionada à nefrotoxicidade, decorrente da necrose dos túbulos renais (LARSON, 1999). Os medicamentos ainda apresentam efeitos de lesão de células mamíferas por interferência nos processos intracelulares endocíticos e pós-endocíticos e de indução da permeabilidade da membrana a cátions monovalentes (SEMIS, 2013; JOLY, 1992). Efeitos hepatotóxicos também são associados aos polienos, de forma que seu uso deve ser restrito, o que leva as pequenas concentrações de anfotericina B utilizadas em tratamentos sistêmicos. A nistatina, por outro lado, não é absorvida pela pele ou trato gastrointestinal, sendo utilizada apenas como tratamento tópico, sem toxicidade significativa, embora ainda apresente efeitos colaterais (LYU, 2016).

Figura 02. Mecanismos de ação de medicamentos azólicos e poliênicos na membrana celular fúngica.



Criado com BioRender.com. Elaborado pela autora, 2022.

O desenvolvimento de formulações menos tóxicas ao longo das últimas décadas, aumentou a segurança no uso de medicamentos como anfotericina B e fluconazol, o que, conseqüentemente, ampliou significativamente o seu uso, muitas vezes de forma inadequada e desnecessária (PERLIN, 2017). Dessa forma, tornou-se cada vez mais comum o aparecimento de resistência por parte dos fungos aos tratamentos, fator de extrema preocupação, já que limita as possibilidades de terapia dentre as poucas classes de medicamentos disponíveis (SPAMPINATO, 2013). As formas de resistência podem se dar pela tentativa em contornar os efeitos do agente microbiano na célula, como alterações no alvo da droga e aumento da produção de transportadores de múltiplas drogas que removem o agente da célula, ou através de mecanismos que permitem à célula lidar com o estresse induzido pelos agentes antifúngicos, o que inclui alterações metabólicas que minimizam a toxicidade do fármaco, desde adaptações fisiológicas até alterações genéticas (COWEN, 2008; CANNON, 2007).

A aquisição de resistência a medicamentos da classe dos azóis, como fluconazol, é mais fácil quando comparada à aquisição na classe dos polienos. Os azóis, agindo em enzimas da síntese do ergosterol da membrana fúngica, podem ter sua atividade prejudicada por mutações pontuais que irão alterar os componentes da síntese do esterol (NIIMI, 2010; NOËL, 2012). No caso dos polienos, a aquisição de resistência depende da alteração ou diminuição do esterol da membrana, uma vez que se ligam diretamente ao ergosterol, sendo necessária, portanto, uma mutação nos genes que codificam enzimas envolvidas

na biossíntese de ergosterol (SPAMPINATO, 2013). Ambas as classes também sofrem com bombas de efluxo, que são capazes de diminuir sua concentração intracelular dos fármacos, sendo reguladas positivamente quando detectada a presença desses.

O desenvolvimento de novos agentes de terapia sintéticos é prejudicado principalmente pelas similaridades entre a célula fúngica e a humana, ambas eucarióticas, de modo que o número de alvos para os medicamentos, para que não sejam tóxicos ao organismo humano, é bastante reduzido. A busca por potenciais tratamentos antifúngicos que sejam capazes de superar as barreiras de resistência da *C. albicans* abrange agentes sintéticos, peptídeos e proteínas, fungos endofíticos, organismos marinhos e materiais poliméricos (SAMPINATO, 2013).

c. Peptídeos antimicrobianos como alternativas de tratamento

Peptídeos antimicrobianos estão entre as primeiras linhas de defesa do sistema imunológico, estando presentes em células procariontes e eucariontes nos reinos animal, vegetal, fúngico e bacteriano, sendo capazes de inibir rapidamente um amplo espectro de micróbios infecciosos. Em organismos mais simples, os peptídeos antimicrobianos são a principal forma de combate à patógenos, enquanto exercem papel complementar no sistema imunológico de formas de vida mais complexas (ZASLOFF, 2002). Os peptídeos se caracterizam, de forma geral, por moléculas anfipáticas e catiônicas, com tamanho variável, podendo chegar até 50 resíduos de aminoácidos, com ação antimicrobiana bastante ampla, atuando em mecanismos de ativação das células T, ação fagocitária e ativação de células dendríticas, influenciando inflamações, proliferações, cicatrizações de feridas e preservação do equilíbrio entre proteases e inibidores de protease. O principal mecanismo de ação, entretanto, se dá pela associação e quebra da membrana celular do micróbio, cuja superfície de cargas negativas atrai os peptídeos, com subsequente formação de uma estrutura semelhante a um poro que atravessa a membrana, alterando a permeabilidade e levando à lise celular (HELMERHORST, 2001; DE SMET, 2005; MATEJUK, 2010).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser diferenciados em: peptídeos com propriedades antifúngicas primárias, de ocorrência natural, com atividade antifúngica direcionada; peptídeos antifúngicos com amplo espectro de atividade antimicrobiana, que pode agir contra diversos organismos, incluindo fungos, bactérias e vírus, sem mecanismo de ação específico (inibição da síntese de proteínas específicas da membrana ou proteínas de estresse, interrupção da síntese, interação ou quebra do DNA de fita simples e produção de peróxido de hidrogênio); e peptídeos antimicrobianos que são fragmentos proteolíticos de proteínas, que frequentemente apresentam maior atividade antifúngica do que as proteínas originais, podendo ser essa direcionada ou de amplo-espectro (DE SMET, 2005; MATEJUK, 2010). A estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos também é capaz de influenciar sua atividade, sendo os α -

helicoidais capazes de romper membranas microbianas, pela formação de poros toroidais e de aglomerados na forma de tapete; os folha- β , quando inseridos ou inclinados na bicamada lipídica, podem formar poros toroidais para o rompimento da membrana; e os peptídeos estendidos tendem a ter ação dentro da célula fúngica, pela interação de proteínas (SEO, 2012).

A aquisição de resistência por parte de cepas microbianas, ao contrário do que ocorre com medicamentos convencionais, é pouco provável em peptídeos antimicrobianos. O principal modo de ação dos peptídeos se baseia em suas propriedades catiônicas, que implicam na interação com as cargas negativas das estruturas microbianas, de forma que a ação dos peptídeos é diretamente nas membranas, acarretando um acúmulo na superfície, e, portanto, possibilitando rearranjos na translocação do peptídeo através da membrana e interações com alvos intracelulares, o que permite evitar mecanismos de resistência (TEIXEIRA, 2012; HUANG, 2010). A grande variedade nas sequências estruturais dos peptídeos antimicrobianos também é um fator relevante para dificultar a aquisição de resistência, uma vez que o micróbio infeccioso não consegue identificar um único sítio para ativar mecanismos de destruição. Soma-se a isso o fato que, em organismos multicelulares, mais de um tipo de peptídeo é utilizado pelo sistema imunológico no combate às infecções, de forma que a destruição de um único peptídeo pode não ser significativa (ZASLOFF, 2002).

d. Histatina 5: ação antifúngica e novas estratégias de uso

As histatinas são uma família de peptídeos antimicrobianos de atividade antifúngica primária contra *C. albicans*. São caracterizados por pequenas estruturas básicas e catiônicas, com grande presença de aminoácidos como arginina, histidina e lisina. As histatinas podem ser encontradas naturalmente na saliva humana, em concentrações que variam de 50 a 425 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando conformação aleatória em solventes aquosos, com tendência para formação de α -hélice orientada para a esquerda em solventes não aquosos. São secretadas pelas glândulas parótida, mandibular e sublingual, e podem sofrer modificações proteolíticas antes de chegar à cavidade oral (HELMERHORST, 2001; RAJ, 1990, CALDERONE, 2011).

As histatinas são capazes de interagir com diferentes moléculas salivares, tornando-se parte do revestimento salivar de tecidos duros e moles. Os membros mais relevantes da família são as histatinas 1 e 3 (Hst1 e Hst3), secretadas pelas glândulas da cavidade oral, codificadas pelos genes relacionados HIS1 e HIS2, respectivamente; e a histatina 5 (Hst5), fragmento proteolítico da histatina 3, que é formada antes da chegada dos peptídeos à boca (DE SMET, 2005). A estrutura dos três peptídeos está demonstrada na tabela 01, sendo todos de estrutura linear, com 38, 32 e 24 resíduos de aminoácidos, respectivamente, sendo sete deles histidinas em todos os casos. A histatina 1 tem função voltada principalmente para o revestimento da superfície de dentes, possuindo fraca

atividade antifúngica, sendo inferior a histatina 3, que apresenta atividade moderada (ROTHSTEIN, 2001; CALDERONE, 2011).

Tabela 01. Estrutura primária dos peptídeos histatina 1, histatina 3 e histatina 5.

Peptídeo	Estrutura
<i>Hst1</i>	DSHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
<i>Hst3</i>	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN
<i>Hst5</i>	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY

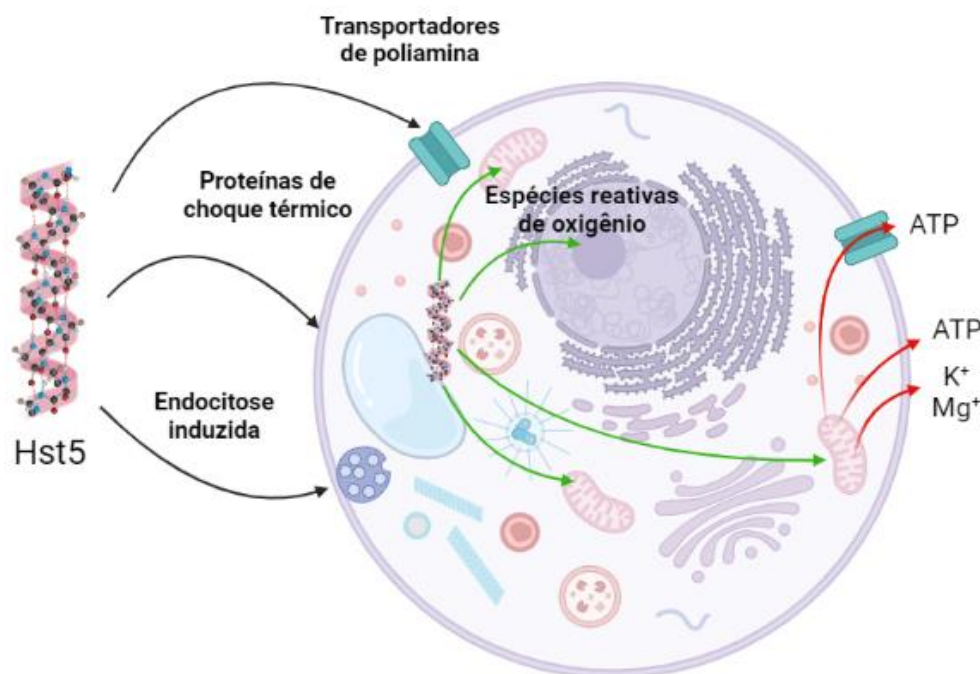
Elaborado pela autora, 2022.

A histatina 5 é o peptídeo da família com maior ação antifúngica, tendo atividade contra fungos patógenos como *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, além de *C. albicans*. A resistência do peptídeo em formar estruturas helicoidais, apresentando apenas conformação levemente anfipática, facilita a entrada do peptídeo na célula patogênica, evitando que seja retida na membrana (HELMERHORST, 2001). O domínio funcional da Hst5, região onde se concentra a atividade antimicrobiana, abrange os aminoácidos de 11 a 24, representando o considerado fragmento mínimo necessário para causar morte efetiva de células fúngicas (KAVANAGH, 2004).

Diferente da maioria dos peptídeos antimicrobianos, que atuam na membrana fúngica, a Hst5 possui ação intracelular, que é iniciada pela entrada na célula fúngica, que pode ocorrer através de transportadores de poliamina fúngica, devido à similaridade de carga entre o peptídeo e a poliamina; por translocação direta através da membrana fúngica, pela associação da Hst5 com proteínas de choque térmico 70 (Hsp70), tendo a proteína Ssa2 pelo menos um local de ligação funcional para o peptídeo; ou mesmo através de endocitose mediada pela própria célula fúngica, onde a Hst5 entra no citosol através do rompimento de endossomos (MOCHON, 2008; KUMAR, 2011; BAEV, 2002; CALDERONE, 2011).

Ao entrar na célula fúngica, um dos primeiros efeitos causados pela Hst5 a ser observado é a indução de um efluxo de ATP, ADP, AMP, NAD⁺, bem como íons citosólicos, como potássio e magnésio. A liberação de K⁺ é um dos principais mecanismos de interferência no metabolismo celular, por causar a perda de volume e, consequentemente, a perda de viabilidade da célula. O estresse osmótico e desequilíbrio iônico resultante do efluxo de íons, são essenciais na atividade fungicida da Hst5 em células de *C. albicans* (BAEV, 2004; PURI, 2014). O peptídeo também age gerando uma interrupção na função mitocondrial, gerando espécies reativas de oxigênio que serão tóxicas para a célula fúngica (HELMERHORST, 1999; CALDERONE, 2011). Supõe-se que a Hst5 seja capaz de adentrar o núcleo da célula e interferir no DNA, embora tal mecanismo ainda não tenha sido completamente elucidado. Tais mecanismos estão exemplificados na figura 03.

Figura 03. Mecanismos de entrada e ação antifúngica da Hst5 na célula de *C. albicans*.



Criado com BioRender.com. Elaborado pela autora, 2022.

Embora apresente ação antifúngica eficiente, a atividade da Hst5 pode ser comprometida por degradações proteolíticas e interações com sais, enzimas, proteínas, metais e outros compostos presentes na cavidade oral (PURI, 2015). Além disso, mecanismos para inibição da atividade antifúngica do peptídeo já foram observados em cepas de *C. albicans*, como efluxo do peptídeo através de bombas de poliamina, quebra proteolítica por proteases aspárticas secretadas (Saps) pelo fungo, e inativação e eliminação de Hst5 pela Msb2, proteína sensora da membrana plasmática de fungos, semelhante à mucina, de alto peso molecular, que além do bloqueio da resposta imune pela desativação de AMPs, também atua estabilizando a parede celular e promovendo o crescimento de filamentos de *C. albicans* (HAMPE, 2017; SZAFRANSKI-SCHNEIDER, 2012).

Estudos conduzidos por Bochenska et al. demonstraram que a clivagem da Hst5 induzida pela *C. albicans* ocorre primeiramente entre os resíduos K17 e H18 do peptídeo, pela maioria das Saps fúngicas (BOCHENSKA, 2016). Ikonomova et al., estudaram substituições de resíduos de aminoácidos na cadeia da Hst5, buscando uma diminuição na degradação proteolítica induzida pelo fungo, bem como uma otimização da atividade antimicrobiana. A troca de resíduos de lisina por histidina e ácido glutâmico, bem como de ácido glutâmico por arginina e leucina não demonstraram melhora significativa na ação e estabilidade da Hst5, tendo apresentado resultados inferiores ao peptídeo

original em alguns casos. Já a troca dos resíduos de lisina 11 e 17 por resíduos de arginina, combinados, apresentou uma melhora significativa na atividade do peptídeo, bem como uma menor tendência à degradação por *C. albicans* (IKONOMOVA, 2019).

Outros estudos demonstram que fragmentos da Hst5 podem reter sua atividade antimicrobiana, por vezes, podendo apresentar ação superior ao peptídeo original. O fragmento P-113, apresentado por Rothstein et al., que compreende os 12 resíduos de aminoácidos do domínio funcional da Hst5, é um dos mais promissores peptídeos nos estudos de fragmentos menores e eficientes (ROTHSTEIN, 2001). Mesmo fragmentos derivados da proteólise da Hst5 na saliva podem reter atividade antifúngica, como demonstrado por Helmerhorst et al., que detectou cerca de 19 fragmentos da proteólise da Hst5, resultados da ação de diversas peptidases, e foi possível observar que fragmentos maiores tem maior probabilidade de apresentarem atividade antifúngica (HELMERHORST, 2006). Entretanto, estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa demonstraram que mesmo fragmentos pequenos, de 6 a 8 resíduos de aminoácidos, são capazes de reter atividade antifúngica (Dados não publicados).

Portanto, o uso de fragmentos ativos da proteólise da Hst5 com a modificação de resíduos de aminoácidos demonstra ser uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de tratamentos antifúngicos eficazes. Dessa forma, o presente trabalho propõe a modificação de resíduos de lisina por arginina em dois fragmentos da Hst5 detectados na saliva de 14 e 15 resíduos de aminoácidos, denominados 14 Hst5 e 15 Hst5, respectivamente, conforme apresentado na tabela 02.

Tabela 02. Estrutura primária dos fragmentos de Hst5, 14 Hst5 e 15 Hst5, e seus respectivos análogos com a modificação dos resíduos de lisina 11 e 17 para arginina.

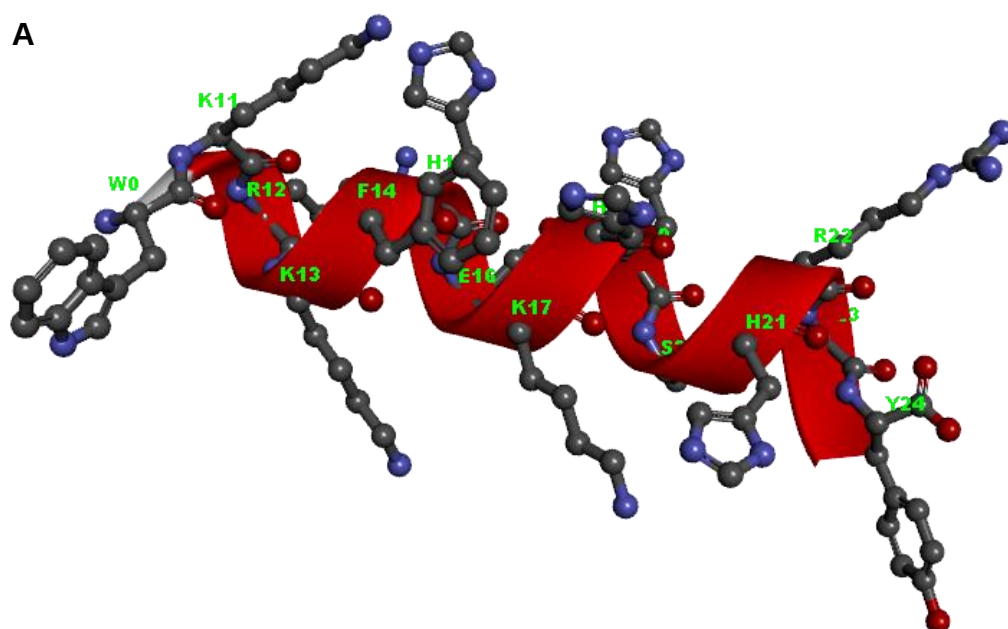
Peptídeo	Estrutura
14 Hst5	KRKFHEKHSHRGY
14 Hst5 K11,17R	RR KFHERHSHRGY
15 Hst5	DSHAKRHHGYKRKFH
15 Hst5 K11R	DSHAKRHHGY RR KFH

Elaborado pela autora, 2022.

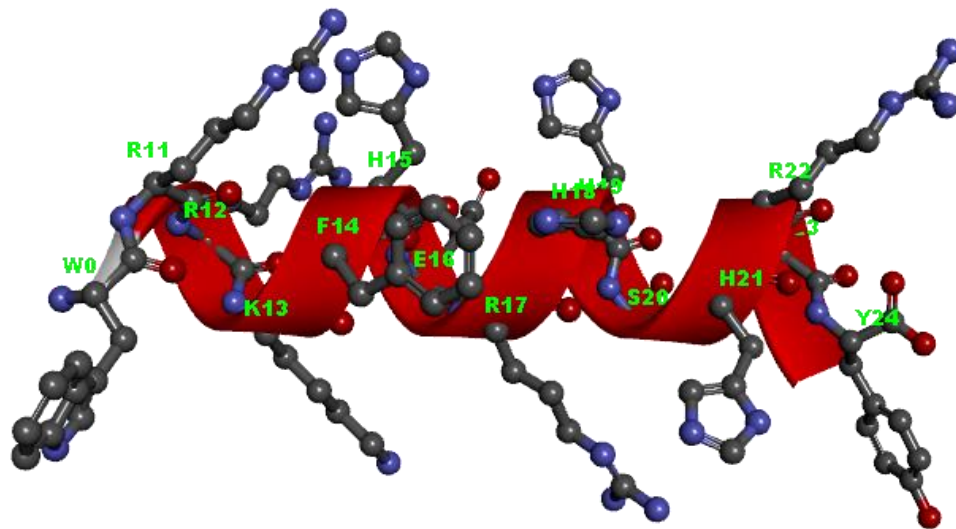
O fragmento 14 Hst5 corresponde aos 14 últimos aminoácidos da sequência da Hst5, abrangendo, dessa forma, o terminal-C do peptídeo, enquanto o 15 Hst5 abrange os primeiros 15 resíduos, abrangendo o terminal-N. Os peptídeos análogos aos fragmentos da Hst5 foram denominados 14 Hst5 K11,17R e 15 Hst5 K11R, tendo, portanto, duas e uma modificações de resíduos de lisina por arginina, respectivamente, como pode ser observado nas figuras 04 e 05. Embora ambos os fragmentos tenham demonstrado possuir atividade

antifúngica (HELMERHORST, 2006), apenas o 14 Hst5 abrange totalmente o chamado domínio funcional da Hst5, enquanto o 15 Hst5 possui apenas três resíduos de aminoácidos de tal sequência. A carga líquida dos peptídeos também pode influenciar em sua atividade, sendo positiva em pH=7, o que favorece a interação dos peptídeos com as cargas negativas presentes na parede celular fúngica. A troca dos resíduos de lisina por arginina pode favorecer ainda mais essa interação, já que aumenta positividade da molécula. Dessa forma, é esperado que o fragmento 14 Hst5, bem como seu análogo 14 Hst5 K11,17R, apresentem atividade antifúngica superior aos peptídeos 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R.

Figura 04. Representação da estrutura 3D dos peptídeos **(A)** 14 Hst5 e **(B)** 14 Hst5 K11,17R.



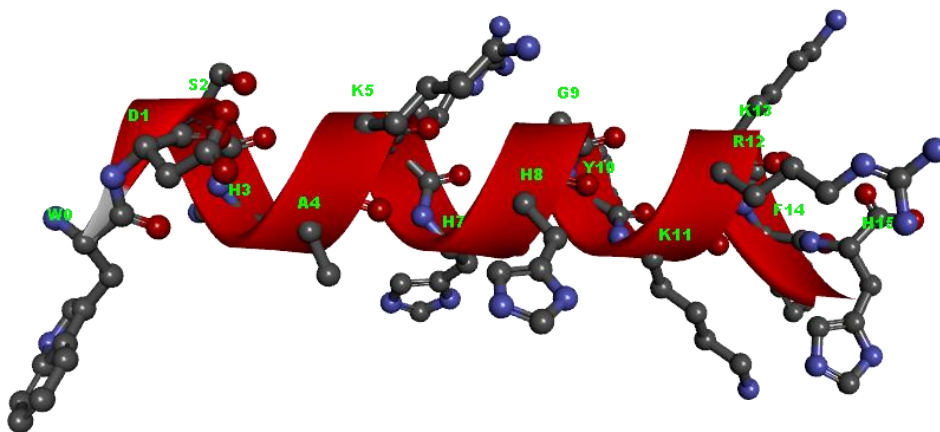
B



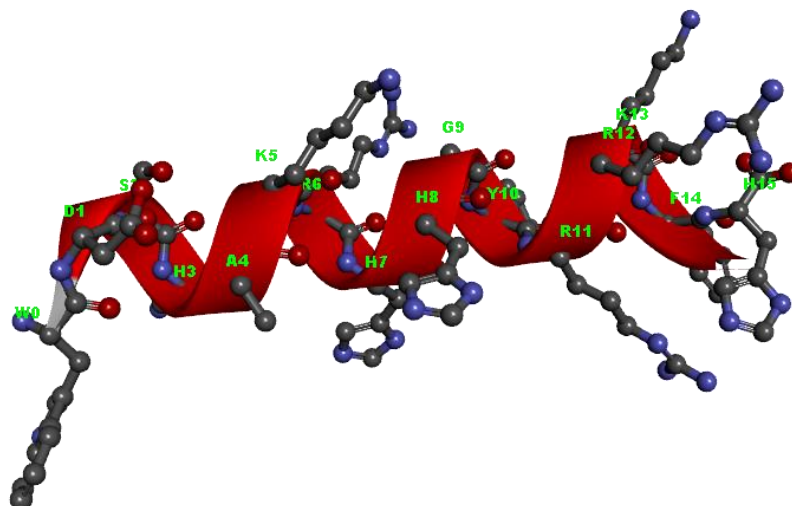
Criado com Discovery Studio. Elaborado pela autora, 2022.

Figura 05. Representação da estrutura 3D dos peptídeos **(A)** 15 Hst5 e **(B)** 15 Hst5 K11R.

A



B



Criado com Discovery Studio. Elaborado pela autora, 2022.

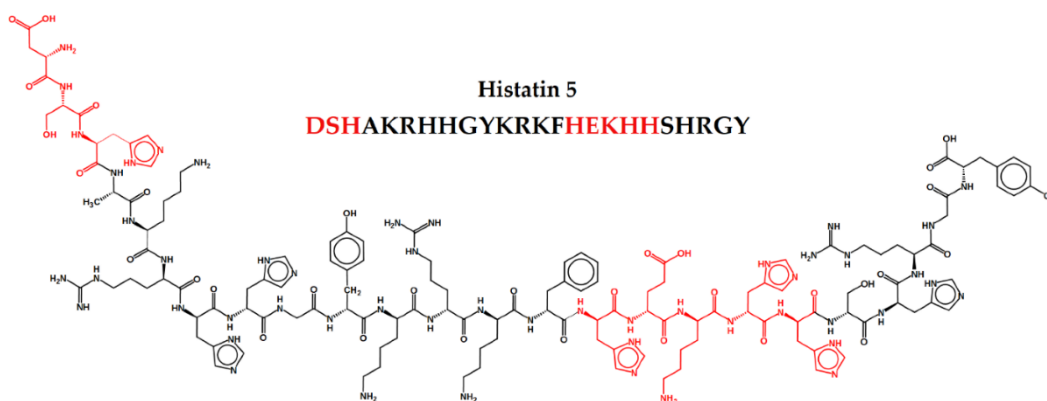
e. Compostos de coordenação metalopeptídicos para otimização da atividade

Alternativas para o uso de Hst5 no desenvolvimento de novos tratamentos de combate às infecções de *C. albicans* também incluem a complexação de íons metálicos pelo peptídeo (MELINO, 2006). Metais de transição, como níquel, zinco, cobre, cobalto e ferro, assim como metais alcalinos e alcalinos terrosos, como cálcio e magnésio, estão presentes na saliva humana em diferentes concentrações, que podem variar de acordo com o indivíduo. Aminoácidos como serina, tirosina, histidina, ácido aspártico e ácido glutâmico são reconhecidos pela capacidade de suas cadeias laterais formarem ligações coordenadas com íons metálicos. Tais aminoácidos correspondem a 13 dos 24 resíduos da cadeia da Hst5, o que sugere uma capacidade de coordenação entre o peptídeo e diferentes íons metálicos (PURI, 2015).

Na literatura é reportado a coordenação da Hst5 com íons metálicos em condições miméticas às fisiológicas (CONKLIN, 2017). Essa característica é associada a estrutura química da Hst5, que apresenta dois importantes motivos de ligação, indicados na figura 06: o motivo amino-terminal conhecido como ATCUN (*amino-terminal copper and nickel binding unit*), que pode estar presente em diferentes proteínas e peptídeos, ligando-se especificamente a Cu(II) e Ni(II) (HARDFORD, 1997); e o motivo de ligação HEXXH que ocorre uma vez na cadeia da Hst5, característico em várias metaloproteases, e exibe afinidade de ligação por íons Zn(II). A coordenação com um íon metálico pode levar a diferenças relevantes na interação do peptídeo com macromoléculas (MELINO, 2006; MELINO, 1999). A ligação a um metal por proteínas da saliva também pode resultar em atuações fisiológicas relacionadas à proteção do esmalte, contra o crescimento bacteriano, sendo inclusive capaz de sequestrar íons necessários para a sobrevivência microbiana, além da formação de espécies reativas de oxigênio, comumente associada a metais com propriedades redox acessíveis em condições fisiológicas. Finalmente, é importante ressaltar que a

coordenação de Zn(II) e Ni(II) pela região C-terminal da Hst5 estabiliza a estrutura secundária em conformação de hélice (GUSMAN, 2001; BREWER, 2000; CONKLIN, 2017).

Figura 06. Estrutura da histatina 5, com destaque para os motivos de coordenação metálica ATCUN e HEXXH.



Zolin, G.V.S, 2021.

A prata (Ag), cujos efeitos antimicrobianos são reconhecidos há séculos, foi utilizada por muitas décadas como um importante agente de combate às infecções, na forma de soluções de nitrato, incorporada a medicamentos, bem como em outros produtos e sistemas, tais como cateteres revestidos, sistemas municipais de água e curativos para feridas (PERCIVAL, 2005). A ação biológica da prata é ampla e se estende por organismos como vírus, bactérias e fungos (NAM, 2011). Em comparação a alguns outros íons metálicos, o íon Ag(I) exibe uma maior toxicidade para microrganismos, que não se estende às células mamíferas, onde o efeito tóxico é pequeno (DASTJERDI, 2010). O efeito da prata está associado às interações com paredes celulares negativas, desativando enzimas e interrompendo a permeabilidade da membrana, podendo levar inclusive à lise da membrana celular (PERCIVAL, 2005). Os íons Ag(I) são capazes de interagir com os grupos sulfidríla da superfície celular de microrganismos substituindo átomos de hidrogênio, gerando assim uma ligação S—Ag, que bloqueia a respiração e a transferência de elétrons na célula, acarretando um colapso da força motriz. O resultado disso é uma desenergização da membrana, conduzindo à morte celular (SARDI, 2013). Os efeitos da Ag(I) ainda incluem a inibição dos citocromos da cadeia transportadora de elétrons e a ligação ao DNA e ao RNA, danificando-os, além de inibir a replicação do DNA (PELGRIFT, 2013; KNETSCH, 2011; RAJ, 2009).

O íon catiônico de Ag(I) pode favorecer ainda mais a interação dos peptídeos positivos com as cargas negativas das paredes e membranas fúngicas, favorecendo tanto os mecanismos de ação da Ag(I) como a entrada na célula fúngica para a ação dos peptídeos, otimizando a inibição do patógeno pelo

sinergismo das moléculas, e acarretando numa atividade maior do que a que teriam de forma isolada.

Dessa forma, como parte do contínuo estudo acerca do desenvolvimento de potenciais agentes de tratamento às infecções fúngicas causadas por *C. albicans*, o presente projeto se propõe investigar o sinergismo associado à coordenação de íons Ag(I) com fragmentos ativos de Hst5, modificando-se resíduos de lisina para arginina, conforme indicado na tabela 02. Para tal, foram propostas a síntese de quatro peptídeos, coordenação com o íon Ag(I) e estudos de caracterização dos metalopeptídeos resultantes. Além disso, foi proposta a determinação da atividade antifúngica e toxicidade dos compostos obtidos.

2. Objetivos

O objetivo central do projeto de pesquisa é o desenvolvimento de compostos de coordenação metalopeptídicos a partir de fragmentos de Hst5, com modificações estruturais que favorecem a atividade antifúngica e que possibilitem a coordenação com íons metálicos de Ag(I).

No período, os objetivos específicos foram:

- Sintetizar e purificar os fragmentos e análogos do peptídeo Hst5;
- Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos na inibição do crescimento de *C. albicans*;
- Verificar a formação de compostos de coordenação entre os peptídeos propostos e íons Ag(I);
- Caracterizar, através de técnicas de fluorescência, espectroscopia de infravermelho, dicroísmo circular e espectrometria de massas, a estrutura dos metalopeptídeos formados;
- Avaliar a atividade hemolítica e a toxicidade dos peptídeos e compostos de coordenação obtidos.

3. Materiais e Métodos

a. Síntese em fase sólida e clivagem dos peptídeos propostos

Os fragmentos de peptídeos 14Hst5 e 15Hst5, e seus respectivos análogos, com substituições da lisina por arginina, tiveram a adição de um resíduo de triptofano (W) à extremidade amino-terminal da estrutura, que, por sua característica fluorescente, com excitação em 280 nm, , permitiu o monitoramento dos peptídeos por fluorescência com maior sensibilidade.

Tabela 03. Estrutura primária dos quatro peptídeos sintetizados, com adição de um resíduo de triptofano (W) ao N-terminal de cada cadeia.

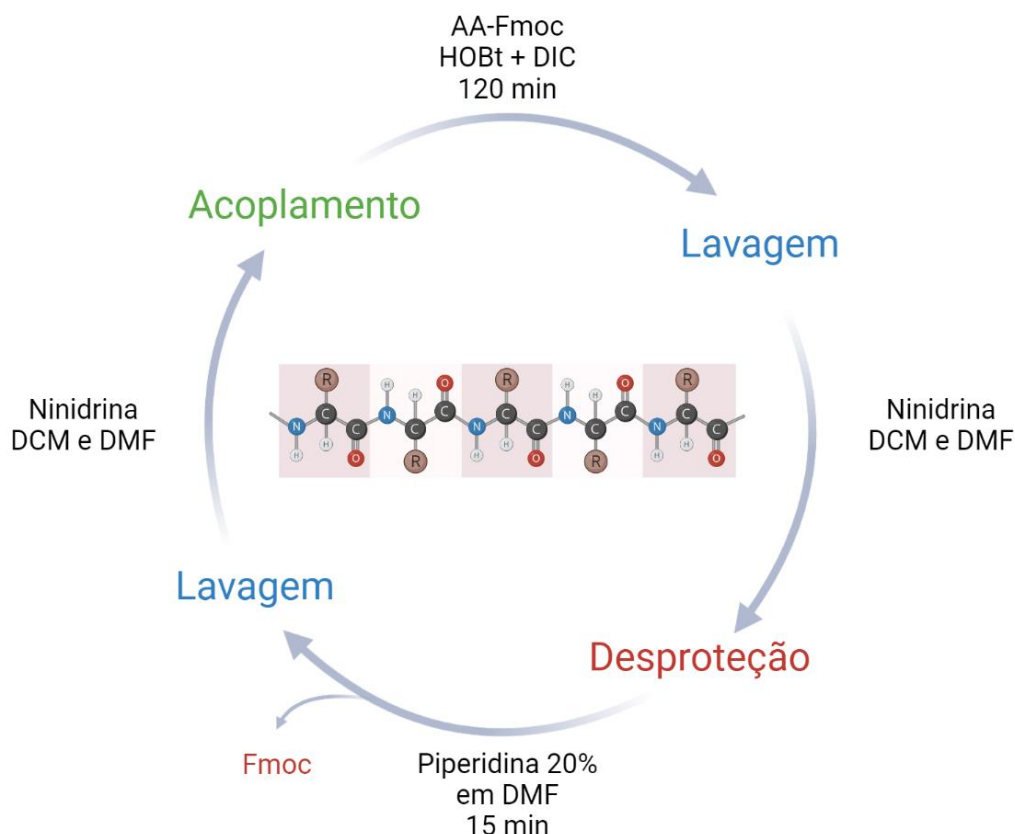
Peptídeo	Estrutura
<i>14 Hst5</i>	WKRKFHEKHSHRGY
<i>14 Hst5 K11,17R</i>	WRRKFHERHSHRGY
<i>15 Hst5</i>	WDSHAKRHHGYKRKFH
<i>15 Hst5 K11R</i>	WDSHAKRHHGYRRKFH

Elaborado pela autora, 2022.

Os fragmentos foram sintetizados em fase sólida, de acordo com o protocolo Fmoc/t-Bu, onde o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) age como grupamento protetor dos grupos α -amino, enquanto derivados terc-butil protegem as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Partindo de uma resina do tipo Wang, com o primeiro aminoácido já acoplado, a síntese foi realizada através do processo contínuo de acoplamento e desproteção dos aminoácidos, até a obtenção da sequência desejada.

Sendo necessária a ativação do grupo carboxila do aminoácido a ser acoplado para a formação da ligação peptídica com o grupo amina do aminoácido já ligado à resina, foram utilizados os agentes de acoplamento N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), com um excesso molar de três vezes em relação ao grupo amina da resina, solubilizados nos solventes dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM) (1:1). A reação ocorreu por duas horas, e, entre cada novo acoplamento de aminoácido, foram realizadas lavagens com os solventes DMF e DCM, para remoção de excesso de reagentes e subprodutos (MARRIFIELD, 1963).

Figura 07. Esquema das etapas da Síntese em Fase Sólida, que ocorrem de forma cíclica até a obtenção do peptídeo desejado.



Criado com Biorender. Elaborado pela autora, 2022.

A verificação de cada acoplamento foi realizada pelo teste de ninidrina, que reage em altas temperaturas com grupos amino livres, adquirindo coloração azulada, e, portanto, indicando a eficiência do acoplamento (KAISER, 1970). A desproteção do aminoácido foi feita em solução de piperidina 20% (v/v) em DMF, por 20 minutos. Nos casos em que o acoplamento não foi efetivo, uma nova tentativa de acoplamento foi realizada, empregando metade da quantidade inicial de reagentes. É exemplificado na figura 07 a repetição das etapas de síntese, até a obtenção do peptídeo de interesse.

Uma vez que a cadeia de aminoácidos foi completamente sintetizada, foi realizada uma clivagem, com o intuito de isolar o peptídeo formado da resina de partida, e desproteger as cadeias laterais dos aminoácidos acoplados. Nessa etapa, foi utilizada uma solução constituída por 95% de ácido trifluoracético (TFA), 2,5% de água deionizada e 2,5% de triisopropilsilano (TIS), que reagiu com o material obtido na síntese, sob leve agitação, por 3 horas, a temperatura ambiente não controlada.

Os peptídeos foram então precipitados com éter etílico gelado, formando um precipitado branco. A mistura foi transferida para tubos tipo "falcon" para separação do precipitado e dos peptídeos não solúveis, que ocorreu através de

centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, o que foi repetido por três vezes, para eliminação completa de contaminantes. Os peptídeos foram então extraídos com ácido acético em solução aquosa 10% (v/v), e finalmente, liofilizados para a obtenção dos peptídeos no estado bruto.

b. Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos

O material bruto obtido após a clivagem foi submetido ao processo de purificação, realizado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, utilizando coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 μ m). Para o modo analítico, foram utilizados os solventes A (0,045% TFA em H₂O) e B (0,036% TFA em ACN); gradiente de 5% a 95% de solvente B em 30 minutos, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e comprimentos de onda de detecção em 220 e 280 nm (correspondendo à ligação peptídica e ao resíduo de triptofano, respectivamente).

A análise qualitativa foi realizada em modo analítico utilizando um sistema de separação Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu LC-10A/C-47A, com uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm e 5 μ m). Os solventes A (0,045% de TFA em H₂O) e B (0,036% de TFA em ACN), com gradiente de 0,33%/min de solvente B durante 90 minutos e fluxo de 5 mL min⁻¹ foram utilizados como condição cromatográfica, com comprimentos de onda de detecção em 220 e 280 nm.

Os peptídeos puros obtidos foram caracterizados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI-MS⁺), em um espectrômetro de massas Bruker Amazon com analisador do tipo íon Trap.

c. Formação e caracterização dos compostos de coordenação

i. Formação dos compostos metalopeptídicos

A complexação dos peptídeos aos íons metálicos de Ag(I) foi realizada pela adição de 250 μ L de solução 40 μ mol L⁻¹ de cada peptídeo, em água destilada, a 250 μ L de solução de nitrato de prata, com concentrações que variaram entre 640 e 0,025 μ mol L⁻¹, em tampão Hepes (pH= 7,25), preparada a partir de uma solução estoque 4,8 mM. Assim, foram obtidas 12 soluções, com diferentes razões metal/peptídeo. A reação ocorreu por cerca de 30 minutos, e foi verificada através de espectros de emissão de fluorescência e absorção na região do UV-Vis do peptídeo, utilizando o espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse, Varian, com comprimento de onda de excitação em 280 nm, e emissão na faixa de comprimentos de onda de 300 a 450 nm, de modo que foi possível estabelecer a proporção molar na qual os peptídeos e os íons metálicos Ag(I) se coordenam.

Tabela 04. Concentrações das soluções de peptídeo e das soluções de metal, e sua respectiva razão molar.

Concentração de Ag(I) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração de Peptídeo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Razão Molar Ag(I)/Peptídeo
600	40	15:1
480	40	12:1
320	40	8:1
160	40	4:1
80	40	2:1
40	40	1:1
20	40	0,5:1
10	40	0,25:1
4	40	0,1:1
2	40	0,05:1
1	40	0,025:1

Elaborado pela autora, 2022.

ii. Supressão de fluorescência

Para investigar a formação dos complexos, estudos de supressão de fluorescência foram realizados, qualitativamente, a fim de se determinar o tipo de supressão que ocorre dada a interação entre os peptídeos e a Ag(I), podendo ser essa dinâmica (ou colisional), estática ou mista.

Os quatro peptídeos estudados, 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, foram preparados a uma concentração de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, aos quais foram adicionadas alíquotas crescentes de solução de metal, a cada qual se seguia um intervalo de 30 minutos para a complexação, e em seguida, foi feita a medição da fluorescência, na faixa de comprimentos de onda de 300 a 450 nm, utilizando 280 nm como comprimento de onda de excitação, a temperatura de 25° e 45°C utilizando um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse, Varian, acoplado a um Peltier.

iii. Análise de dicroísmo circular

Para a análise, foi utilizado o equipamento Jasco J-815, do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara. As soluções de peptídeos e metalopeptídeos foram preparadas em água, em uma concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, perfazendo o volume final de 500 μL . Os espectros

foram obtidos com acúmulo de 12 varreduras, de 200 a 250 nm, com medições a cada 0,1 nm, numa velocidade de 100 nm min⁻¹. Foram monitorados os sinais de dicroísmo circular e absorvância.

iv. Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As análises de infravermelho foram geradas em espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr, disponível no Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, setor de Inorgânica, do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara.

v. Análises de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF

A Espectrometria de massas que promove a caracterização de moléculas por meio da determinação da relação massa/carga (m/z) de íons positivos ou negativos. A técnica foi aplicada de forma a determinar a massa molecular dos compostos de coordenação formados, sem que houvesse quebra e ionização, sendo possível identificar a razão molar de coordenação entre peptídeo e metal, e assim, determinando a estrutura das moléculas.

A análise de massas dos compostos de coordenação estudados foi realizada pela Central Analítica de Instrumentação da Universidade de São Paulo, Instituto de Química, USP – SP, utilizando um espectrômetro tipo MALDI Ultraflex extreme Bruker Daltonics, com analisador TOF/TOF, e aquisição de dados MS e MS/MS (modo refletor). Os compostos de coordenação foram preparados em uma proporção 1:1 (v/v) com uma matriz de 10 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

d. Ensaios microbiológicos

i. Preparo os inóculos de *C. albicans*

No preparo dos inóculos de cepas de *C. albicans* testadas, ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, o microrganismo liofilizado foi reativado em caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi®) e incubado em estufa por 24 horas, a 37°C. Após esse período, uma alçada de leveduras foi semeada em placa com ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Kasvi®), que foi então incubada a 37°C, por 48 horas. Após o período de crescimento, a cultura estoque foi armazenada em geladeira, a 4°C, até o uso.

Para o preparo das suspensões padronizadas, colônias da cultura-estoque foram semeadas em caldo SDB estéril e incubadas por 24 horas, a 37°C. Na sequência, cerca de 400 µL da solução estoque foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo SDB estéril. Essa solução foi lida no espectrofotômetro em 530 nm, apresentando valores de densidade ótica (DO) entre 0,1 e 0,15 A, indicando uma concentração de cerca de 1x10⁶ UFC.mL⁻¹. A

solução foi então diluída até a concentração de 1×10^3 UFC.ml⁻¹, solução padrão utilizada para os testes de inibição de crescimento e de concentração inibitória mínima.

ii. Determinação da concentração inibitória mínima

Para determinação da concentração inibitória mínima em que os peptídeos e complexos inibem o crescimento da *C. albicans*, foi utilizado o método de microdiluição em microplaca, de acordo com protocolo adaptado do manual M27-A3 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

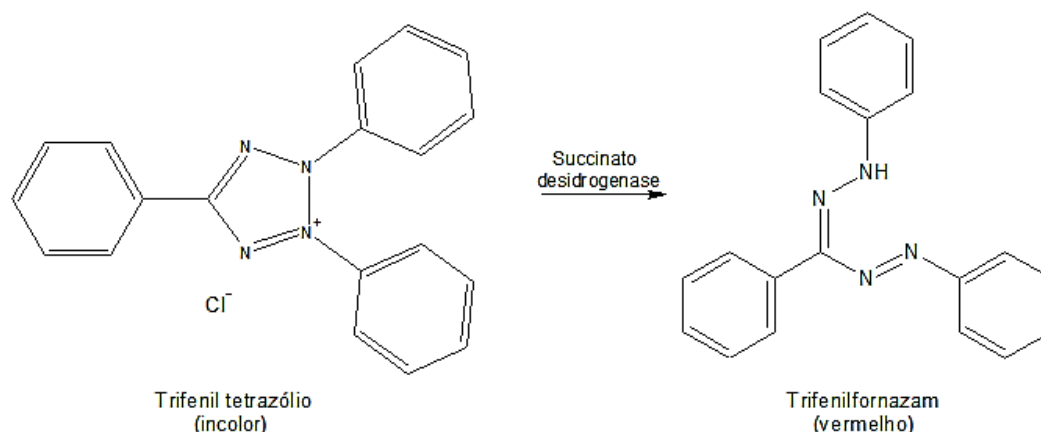
Inicialmente, foi adicionado 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose estéril a cada um dos 96 poços da microplaca (Kasvi®). Em seguida, foi adicionado ao primeiro poço das linhas de A a F, 100 µL de uma solução-padrão de peptídeo, complexo ou padrões de comparação, com concentração inicial de 640 µmol L⁻¹, de modo que, com as diluições que se seguiram, a concentração na primeira coluna foi de 160 µmol L⁻¹. A adição do composto às colunas de 1 a 10 foi realizada por diluição seriada, com concentrações indo de 160 a 0,31 µmol L⁻¹. Às colunas de 1 a 11, foram adicionados 100 µL de suspensão padronizada de *C. albicans* em 1×10^3 UFC.ml⁻¹. Aos poços da coluna 12, foram adicionados mais 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®), completando assim 200 µL em cada um dos 96 poços. A microplaca foi incubada a 37°C, por 48 horas.

Ao final do período, a inibição do crescimento do microrganismo foi avaliada pela medição da densidade ótica de cada poço, através de um espectrofotômetro de microplacas (Biotek Epoch), a 595 nm. O teste foi realizado em triplicata, e a partir das médias das DOs, foi calculada a inibição do crescimento da *C. albicans* através da equação 01:

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

A viabilidade celular também foi determinada por teste colorimétrico, utilizando o indicador cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) 2% em água. 20 µL do indicador foram adicionados a cada poço da microplaca, que foi então incubada por 2 horas, a 37°C. O indicador, cuja solução é originalmente incolor, sofre redução por desidrogenases, na presença de células metabolicamente ativas, sendo convertido à trifênilfornazam (TPF), que possui coloração avermelhada, indicando, portanto, viabilidade celular.

Figura 08. Reação colorimétrica de redução do cloreto de trifenil tetrazólio (incolor) para trifenilformazam (vermelho), indicando viabilidade celular.



Elaborado pela autora, 2022.

iii. Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada através do protocolo modificado de Onuma e colaboradores (1999), de modo a investigar a toxicidade dos compostos de coordenação estudados em células eucarióticas.

Hemácias humanas, do tipo O+, foram obtidas a partir do sangue fresco de um doador voluntário (CAAE: 61293316.4.0000.5426). O sangue coletado foi lavado três vezes com tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ com NaCl, e centrifugado, de forma a separar o plasma das hemácias. A solução final de eritrócitos consistiu em 250 µL de hemácias lavadas e 4,75 mL de tampão PBS. Os compostos de coordenação foram preparados na proporção 1:1 peptídeo/prata(I), em tubos tipo Eppendorf, nas menores concentrações em que apresentaram atividade antifúngica (concentração inibitória mínima), de acordo com os resultados de experimentos prévios. Como controle positivo, 100% de hemólise, foi utilizado uma solução de Triton X-100 a 1% (v/v), e tampão PBS 0,01 M como controle negativo, considerado como 0% de hemólise.

Alíquotas de 100 µL da suspensão de eritrócitos e 100 µL de cada composto de coordenação foram incubados a 37°C, durante 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 3 minutos, e 100 µL de cada solução foram adicionados a placas de cultura celular 96 poços. Foi realizada a medição da absorvância de cada solução utilizando um leitor de microplaca Biotek, modelo Epoch, num comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise de cada composto de coordenação foi determinada de acordo com a equação 02 (ONUMA et al., 1999):

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\left(\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{Triton 1\%}} - A_{\text{PBS}}} \right) \times 100\% \right)$$

onde “A” representa a absorvância obtida nas medições das microplacas e “Triton 1%” e “PBS”, representam as medidas obtidas nos controles positivos e negativos, respectivamente.

iv. Determinação da toxicidade celular

O ensaio de toxicidade foi realizado conforme descrito por Costa-Orlandi, 2020, com o objetivo de verificar a viabilidade celular frente aos peptídeos e complexos estudados. Células escamosas de carcinoma oral (OSCC - *oral squamous cell carcinoma*) foram mantidas em garrafas próprias para cultivo de células com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), contendo 10% de soro fetal bovino sem vermelho de fenol, e incubadas com 5% de CO₂, a 37°C.

As suspensões de células foram preparadas para uma concentração final de 2×10^4 células/poço, em microplaca de 96 poços. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido, e foram adicionados 200 µL dos quatro peptídeos e quatro compostos de coordenação, com concentração de 320 µM. Após diluição, as concentrações foram de 160 a 10 µM. As placas foram incubadas por 48 horas, protegidas da luz. Após a incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina, a 60 µmol L⁻¹, e as placas foram novamente incubadas, por mais 18 horas, aproximadamente. A viabilidade celular foi avaliada com base na análise espectrofotométrica (Epoch, Biotek), pela medição da densidade ótica nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

4. Resultados e discussão

a. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos

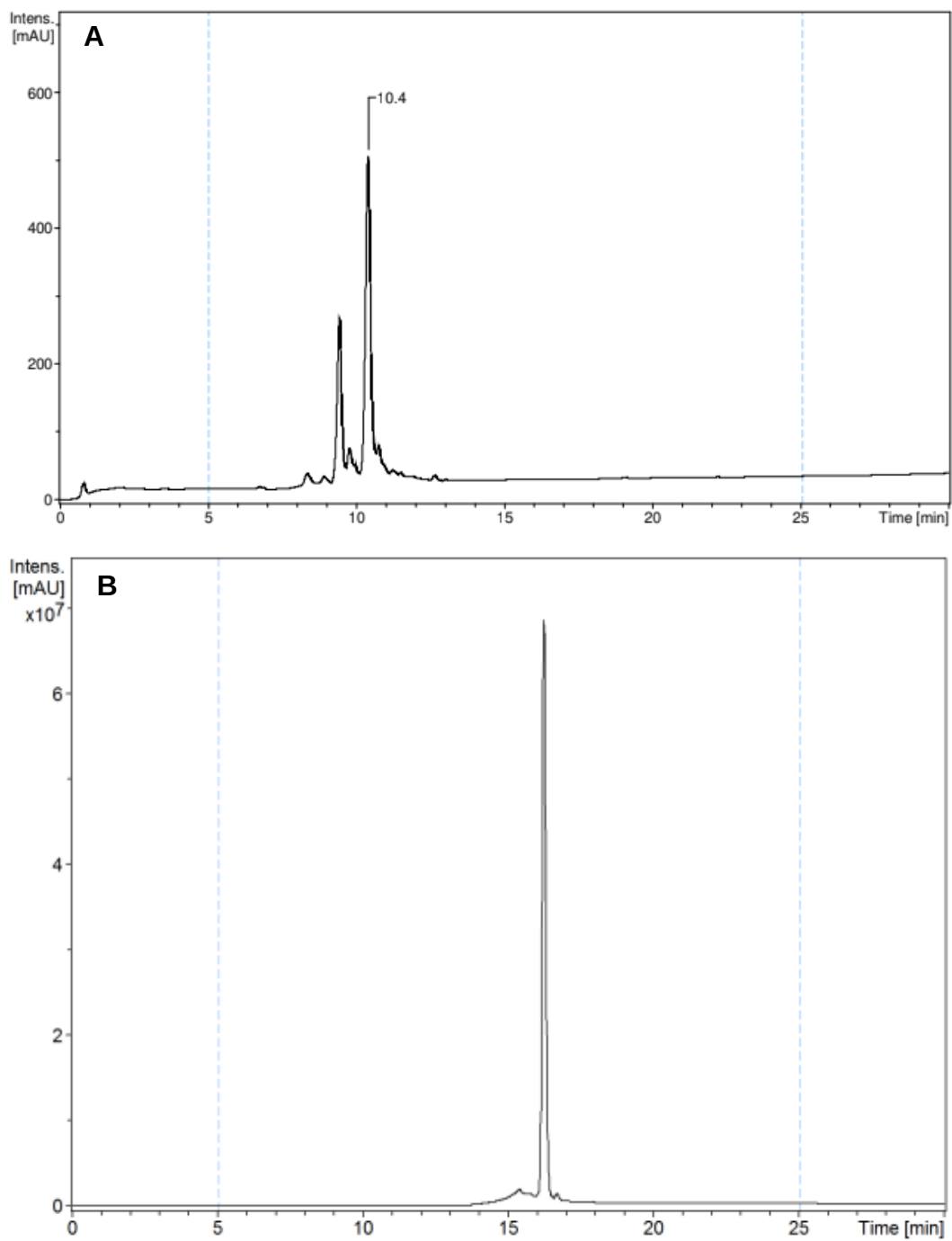
Estudos prévios demonstraram a eficiência da atividade antifúngica de fragmentos de peptídeo originados da Hst5, podendo ser inclusive superior ao peptídeo original (HELMERHORST, 2006). Assim, foi proposta a síntese de dois fragmentos, cada um deles apresentando uma ou duas trocas em resíduos de aminoácido (lisina 11 e/ou lisina 17 por arginina), totalizando quatro peptídeos, que apresentam uma perspectiva promissora de atividade antifúngica, além de potencial diminuição na degradação pelo fungo e por componentes da saliva, uma vez que foram baseados em fragmentos proteolíticos naturalmente encontrados na cavidade oral.

Os peptídeos foram sintetizados manualmente, de acordo com a sequência de aminoácidos de cada um, em resina Wang. Foi adicionado ao final de cada cadeia um resíduo de triptofano (W), aminoácido que apresenta emissão de fluorescência no espectro UV-visível, o que permitiu que os peptídeos fossem detectados por meio de técnicas de espectroscopia de UV-vis e fluorescência. Os peptídeos foram clivados, e obtidos com grau de pureza acima de 95%, após purificação por HPLC. Nas figuras 09 a 12, correspondentes aos peptídeos 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, respectivamente, está apresentado o perfil cromatográfico do material bruto e após a purificação em coluna de fase reversa C-18, que foram obtidos para cada um dos peptídeos. Os materiais obtidos foram caracterizados, em seguida, por espectrometria de massas, como apresentado na figura 13. Para todos os peptídeos, foram obtidos resultados próximos com o teórico esperado, como apresentado na tabela 05.

A pequena diferença observada entre os tempos de retenção no perfil cromatográfico do material bruto e purificado pode ser decorrente à formação de pares iônicos entre os peptídeos e subprodutos ou contaminantes presentes antes da purificação. A formação de par iônico interfere na carga do peptídeo, de forma que esse acaba sendo mais ou menos retido pela coluna. Após a purificação, esses subprodutos e contaminantes não estão mais presentes, e é então observado o tempo de retenção correspondente apenas ao peptídeo. Tal efeito foi observado nos cromatogramas de todos os peptídeos.

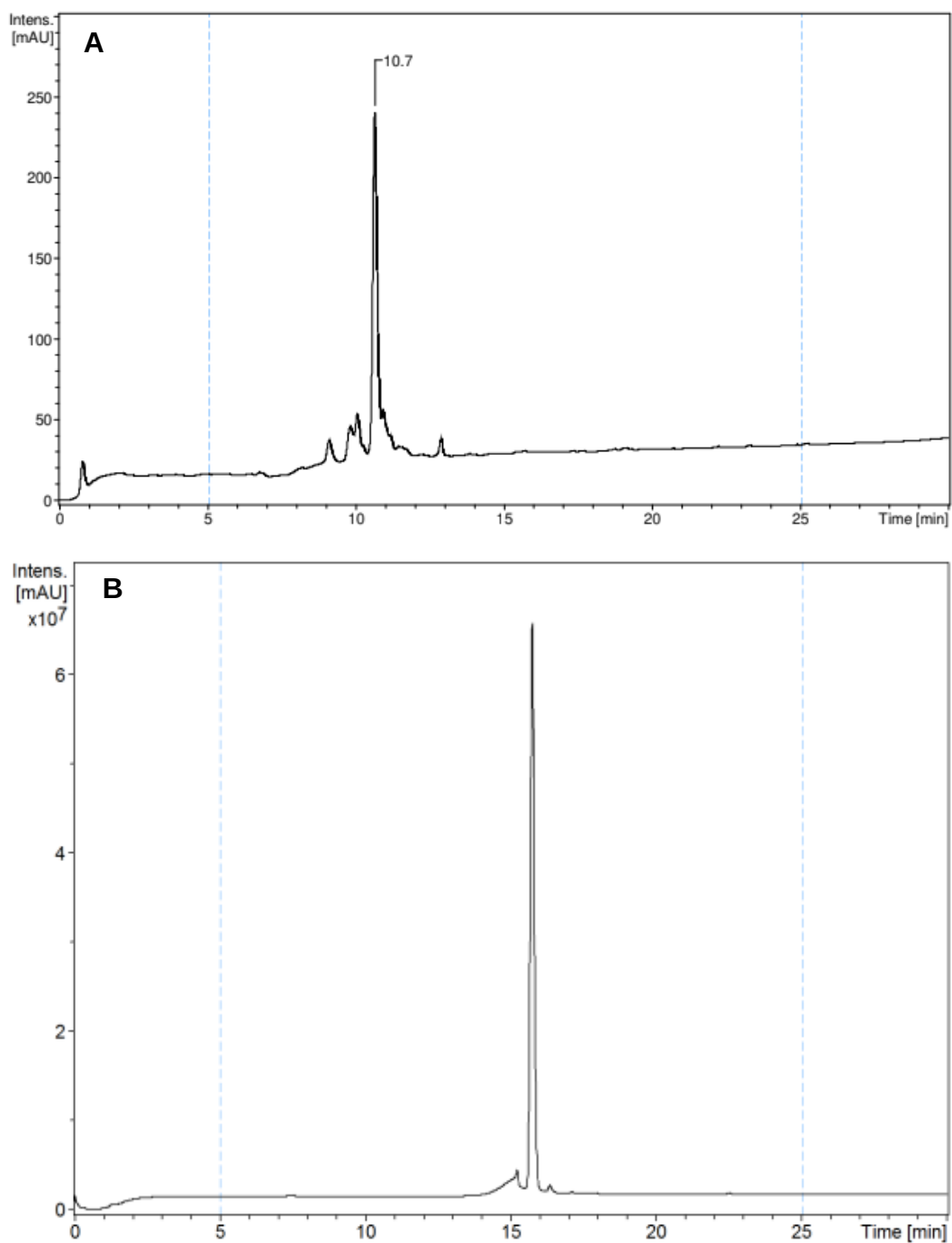
A partir dos valores das massas molares teóricas dos peptídeos, é possível calcular a razão massa/carga teórica esperada para o espectro de massas, pela soma da massa molar de cada peptídeo com a carga teórica referente ao número de prótons (H^+), e dividindo pelo valor da carga. As razões de massa/carga teóricas e experimentais para cada peptídeo estão apresentadas na tabela 05, bem como a massa molar de cada um dos quatro peptídeos analisados, obtidas a partir dos dados experimentais.

Figura 09. Perfil cromatográfico do peptídeo 14 Hst5; **(A)** peptídeo bruto; **(B)** peptídeo purificado.



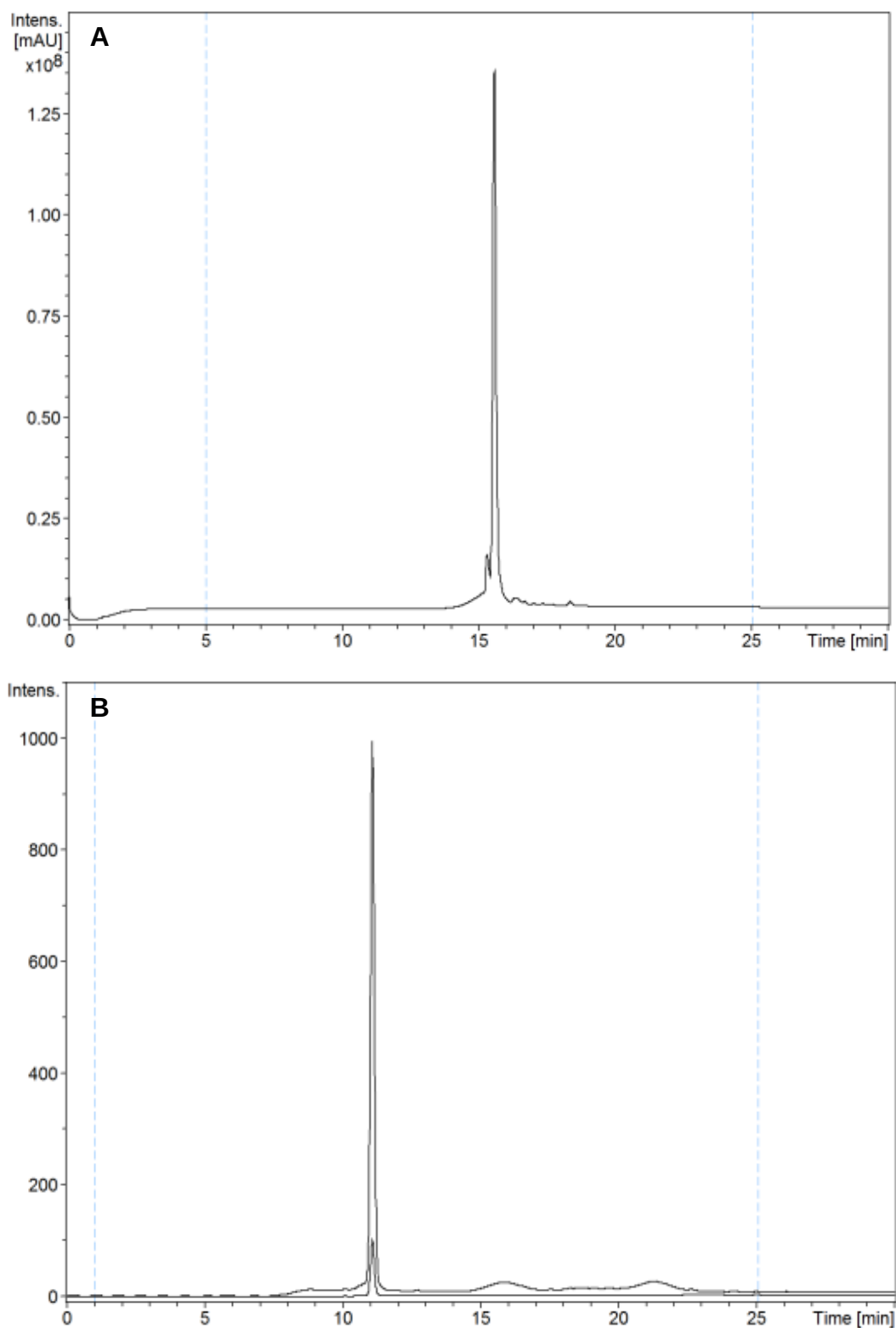
Elaborado pela autora, 2021.

Figura 10. Perfil cromatográfico do peptídeo 14 Hst5 K11,17R; **(A)** peptídeo bruto; **(B)** peptídeo purificado.



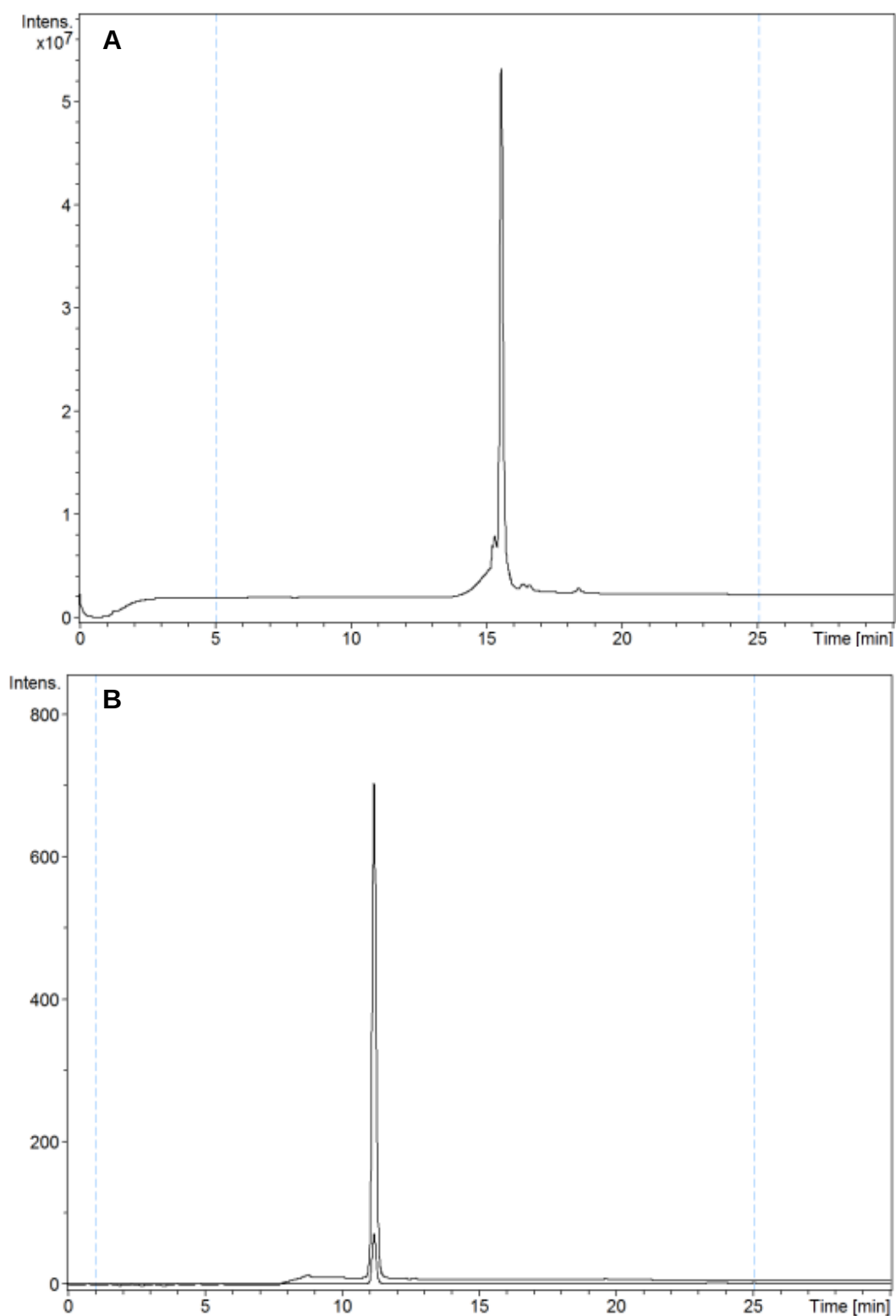
Elaborado pela autora, 2021.

Figura 11. Perfil cromatográfico do peptídeo 15 Hst5; **(A)** peptídeo bruto; **(B)** peptídeo purificado.



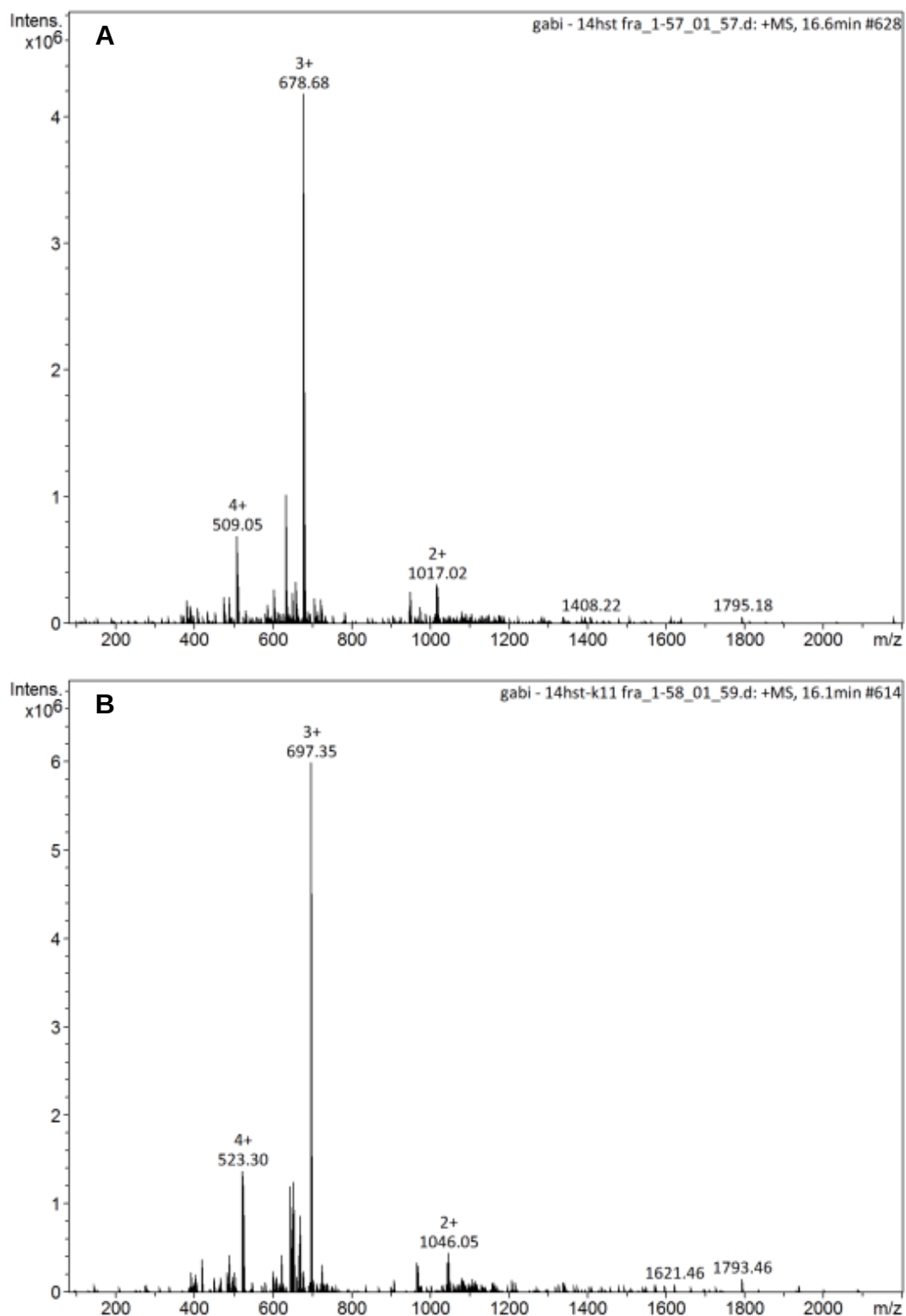
Elaborado pela autora, 2021.

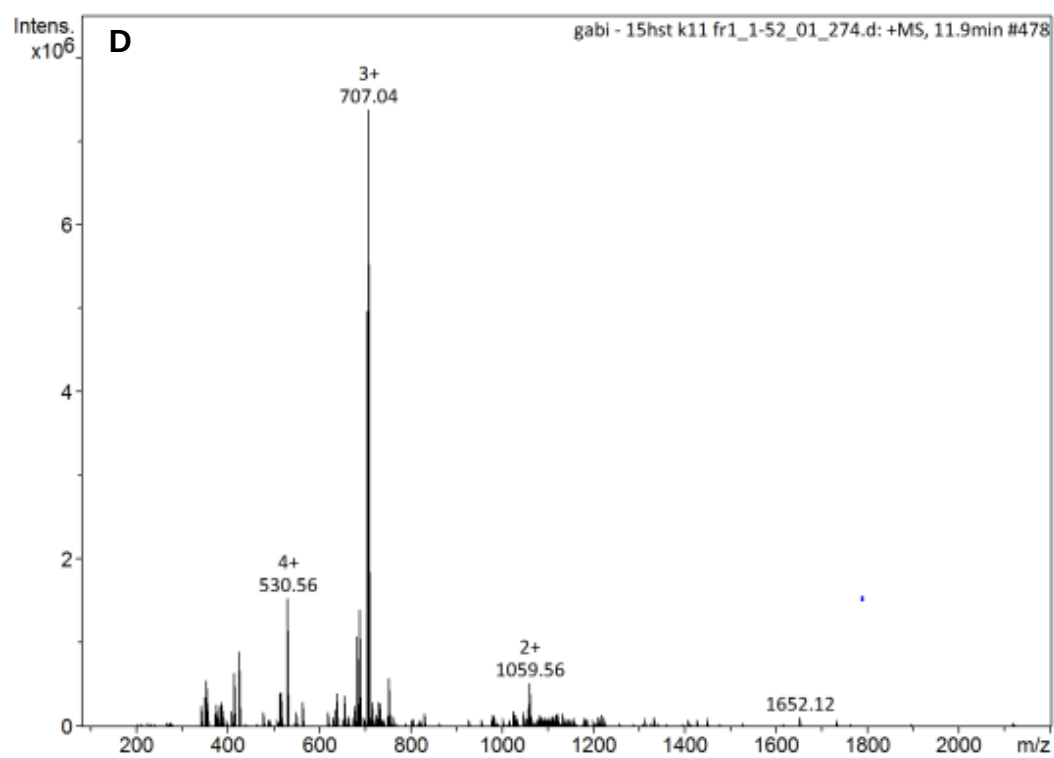
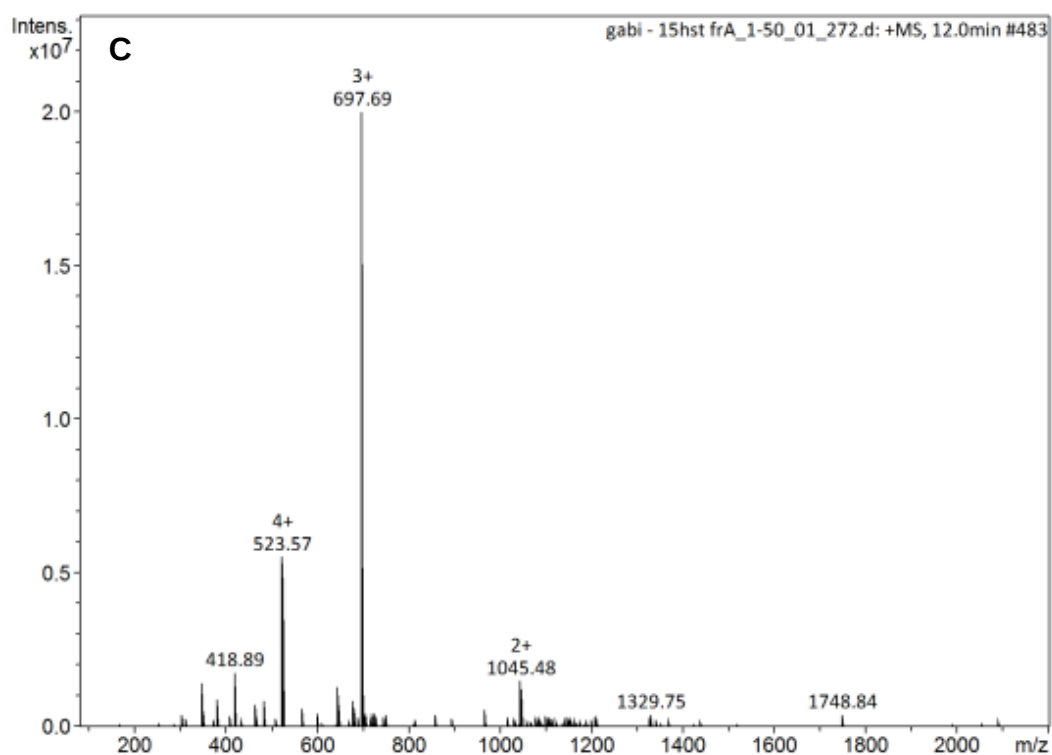
Figura 12. Perfil cromatográfico do peptídeo 15 Hst5 K11R; **(A)** peptídeo bruto; **(B)** peptídeo purificado.



Elaborado pela autora, 2021.

Figura 13. Espectro de massas obtido para os peptídeos **(A)** 14 Hst5; **(B)** 14 Hst5 K11,17R; **(C)** 15 Hst5 e **(D)** 15 Hst5 K11R, após purificação, indicando a obtenção dos peptídeos puros e confirmando suas massas moleculares.





Elaborado pela autora, 2021.

Tabela 05. Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas para os peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Carga (z)	Razão m/z teórica	Razão m/z experimental	Massa molar experimental (g/mol)	Massa molar teórica (g/mol)
14 Hst5	2	1017,63	1017,02	2032,04	2033,26
	3	678,75	678,68		
	4	509,31	509,05		
14 Hst5 K11,17R	2	1045,64	1046,05	2090,1	2089,29
	3	697,43	697,35		
	4	523,32	523,3		
15 Hst5	2	1046,15	1045,48	2088,96	2090,31
	3	697,77	697,69		
	4	523,58	523,57		
15 Hst5 K11R	2	1060,16	1059,56	2117,12	2118,33
	3	707,11	707,04		
	4	530,58	530,56		

Elaborado pela autora, 2021.

A similaridade entre os valores de razão massa/carga teóricos e experimentais obtidos, bem como a massa molar de cada peptídeo calculada a partir dos valores de m/z obtidos a partir dos espectros de massas, confirmam a síntese e a purificação efetiva de cada um dos peptídeos propostos.

b. Formação e caracterização dos compostos de coordenação

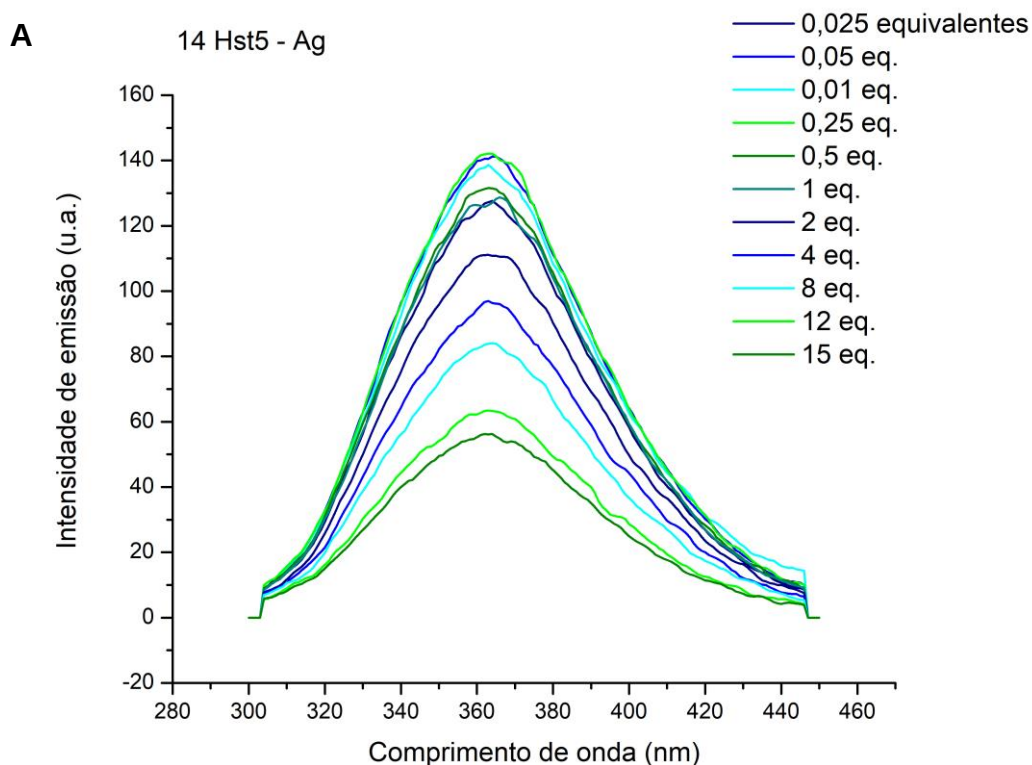
i. Formação dos compostos metalopeptídicos

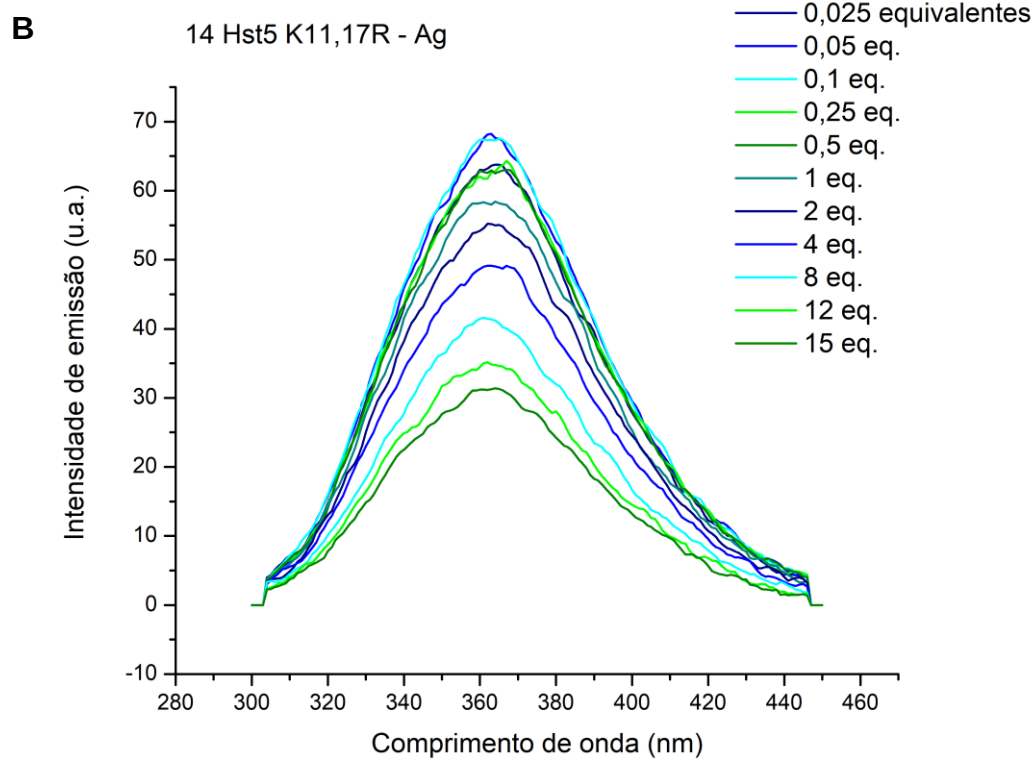
Para o preparo dos compostos de coordenação dos quatro peptídeos, 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, com Ag(I), foram adicionadas alíquotas do íon metálico, em crescente concentração, à uma solução contendo uma concentração fixa do peptídeo de interesse, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para um volume final de 500 μL . Posteriormente, as soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos para a formação e estabilização dos compostos de coordenação. O pH das soluções foi mantido em torno de 7,2, pelo uso do tampão HEPES 0,1 M no preparo das soluções de prata.

Os espectros de emissão de fluorescência de cada peptídeo com prata, nas diferentes concentrações do cátion, foram então analisados, qualitativamente, buscando identificar a proporção molar de coordenação. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas utilizando um comprimento de onda de excitação de 280 nm, com varredura no intervalo de 300 a 450 nm, tendo como fluoróforo a cadeia lateral do resíduo de triptofano (W) presente em todos os peptídeos, além das cadeias laterais dos resíduos de

fenilalanina (F) e tirosina (Y) presentes nas moléculas. Embora os resíduos de F e Y apresentem característica de emissão de fluorescência, essa emissão é relativamente baixa, de forma que a adição do resíduo de W foi feita para que as emissões de fluorescência dos peptídeos fossem mais bem observadas. O comprimento de onda de 280 nm é capaz de excitar os três resíduos de aminoácido, e a faixa de emissão de 300 a 450 nm engloba os diferentes comprimentos de onda de emissão máxima destes. Foram traçados os perfis de emissão de fluorescência de cada peptídeo, na faixa de comprimento de ondas analisada, como apresentado nas figuras 14 e 15, e, a partir dos perfis, foi determinada a área sob a curva das emissões para os respectivos equivalentes molares de cada peptídeo.

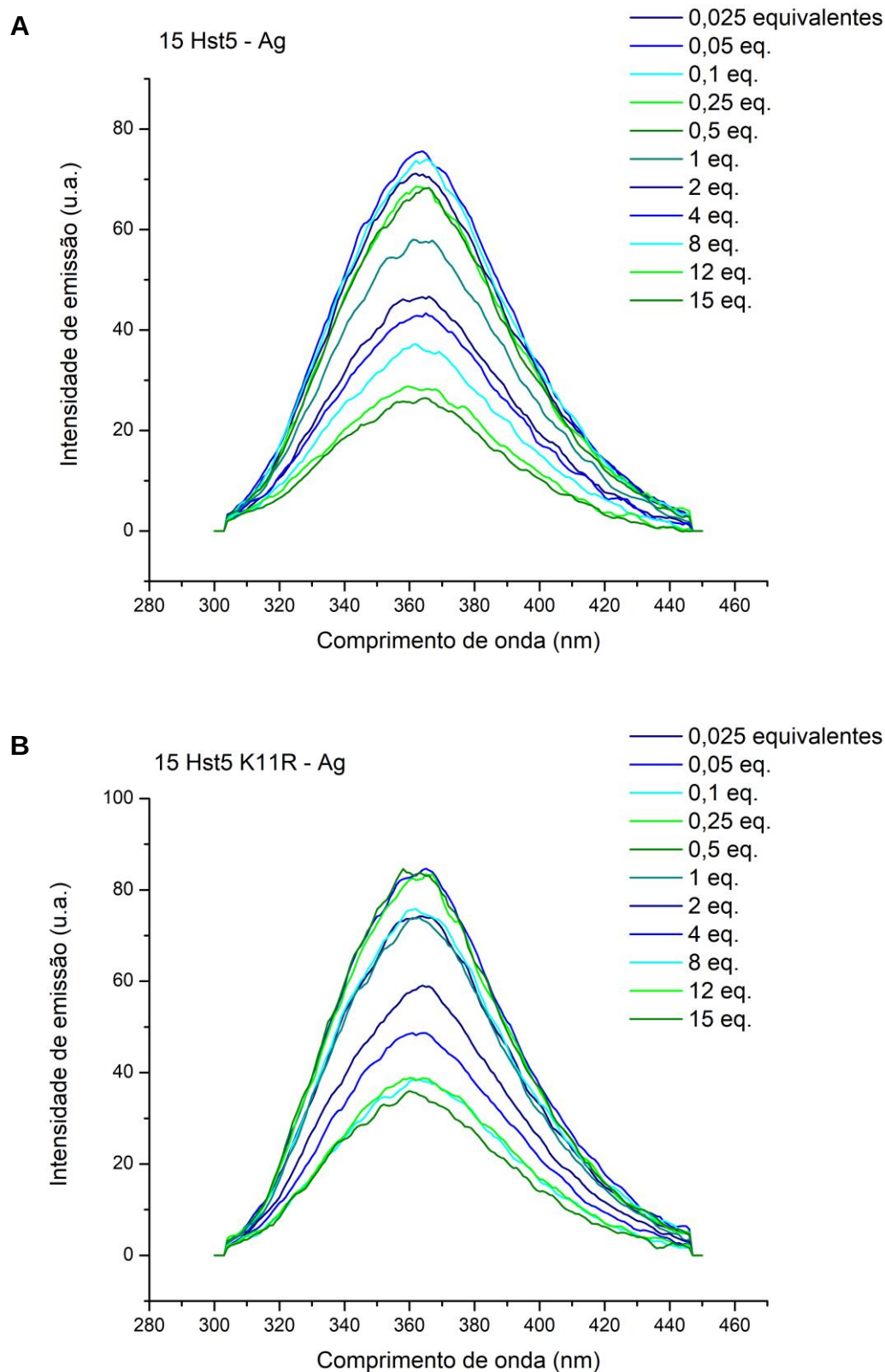
Figura 14. Perfis de fluorescência da intensidade de emissão nos comprimentos de onda de 300 a 450 nm, para diferentes equivalentes de complexação entre Ag(I) e **(A)** 14 Hst5 e **(B)** 14 Hst5 K11,17R, ambos os peptídeos na concentração fixa de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$.





Elaborado pela autora, 2022.

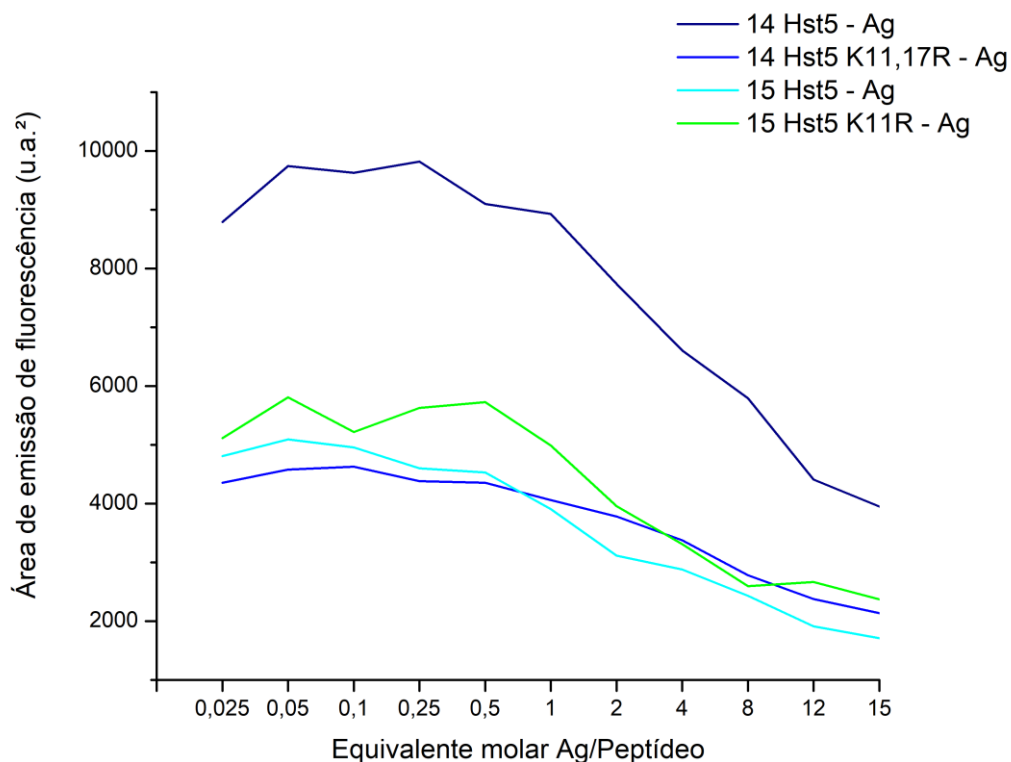
Figura 15. Perfis de fluorescência da intensidade de emissão nos comprimentos de onda de 300 a 450 nm, para diferentes equivalentes de complexação entre Ag(I) e **(A)** 15 Hst5 e **(B)** 15 Hst5 K11R, ambos os peptídeos na concentração fixa de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Elaborado pela autora, 2022.

Como resultado, os perfis obtidos a partir das áreas, apresentado na figura 16, exibiu uma tendência para a razão molar próxima de 1:1 entre os peptídeos e o íon metálico de Ag(I), pois é observada uma supressão significativa na intensidade de emissão para condições de equivalentes molares maiores que 1 equivalente (PROFT, 2019).

Figura 16. Perfis de fluorescência da complexação 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag, 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag, a partir da área de emissão de fluorescência.



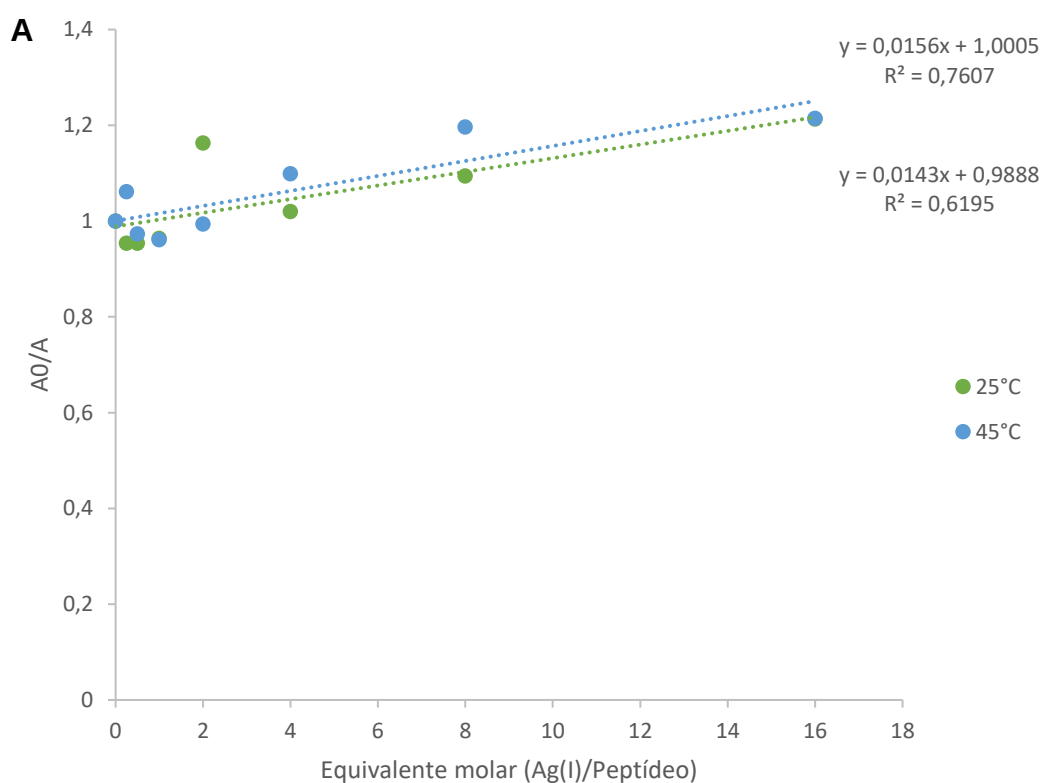
Elaborado pela autora, 2022.

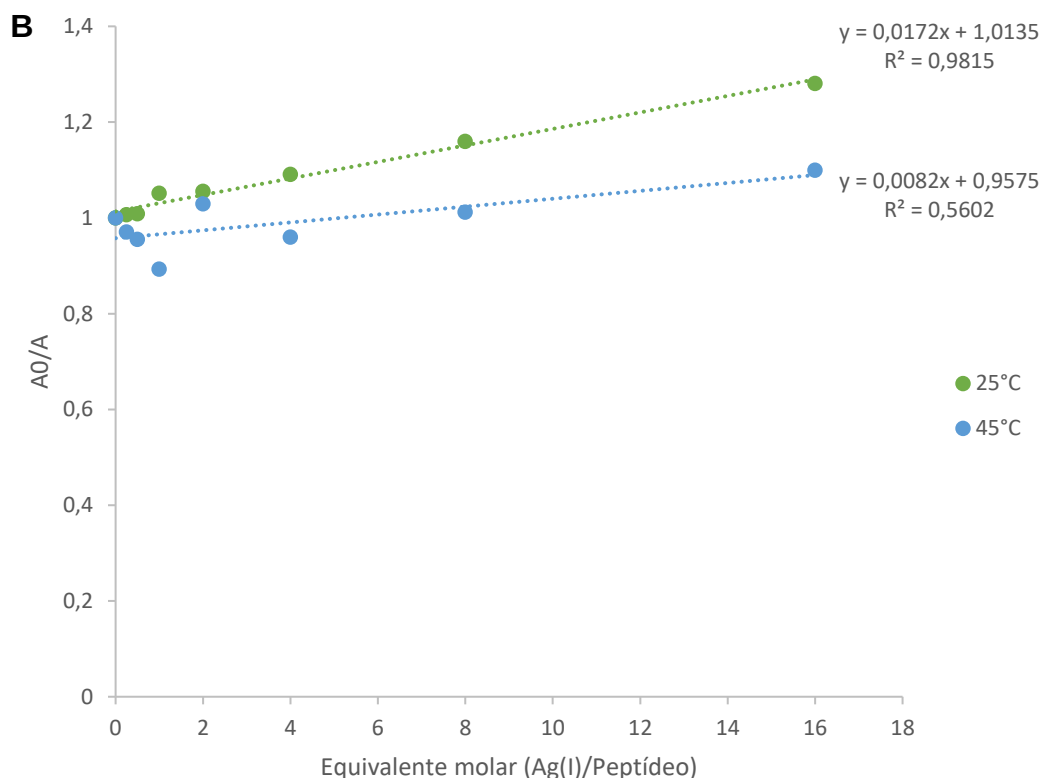
ii. Supressão de fluorescência

Estudos de supressão da fluorescência para os quatro peptídeos coordenados ao metal foram realizados, levando em consideração o comportamento proposto por Lacowicz (2006), onde a supressão de fluorescência de peptídeos na presença metais é semelhante aos estudos envolvendo a supressão entre dois peptídeos. Assim, para os estudos de supressão, alíquotas crescentes de solução de Ag(I) foram adicionadas, por titulação, variando de 0,25 a 16 equivalentes molares em relação a concentração fixa de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos peptídeos. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm, e a emissão foi medida na faixa de 300 a 450 nm, tendo sido realizado as temperaturas de 25° e 45 °C.

Os dados obtidos foram representados em um gráfico de supressão de luminosidade, onde a variação da fluorescência relativa a cada um dos peptídeos, determinada através da área de emissão (A_0/A), foi avaliada em função da proporção molar da solução do íon metálico adicionado, sendo A_0 a área de intensidade de emissão de fluorescência de cada peptídeo, na ausência da Ag(I), e A , a área de intensidade de fluorescência na presença do metal. A variação das intensidades de emissão de cada peptídeo, na presença da Ag(I), nas diferentes temperaturas estudadas, estão apresentadas nas figuras 17 e 18.

Figura 17. Efeito da temperatura na interação dos peptídeos **(A)** 14 Hst5 e **(B)** 14 Hst5 K11,17R com Ag(I). Ag(I) (0,25 a 16 equivalentes molares) foi adicionado, por titulação, a uma solução de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeo, e a fluorescência medida com excitação a 280 nm, a 25° e 45°C.





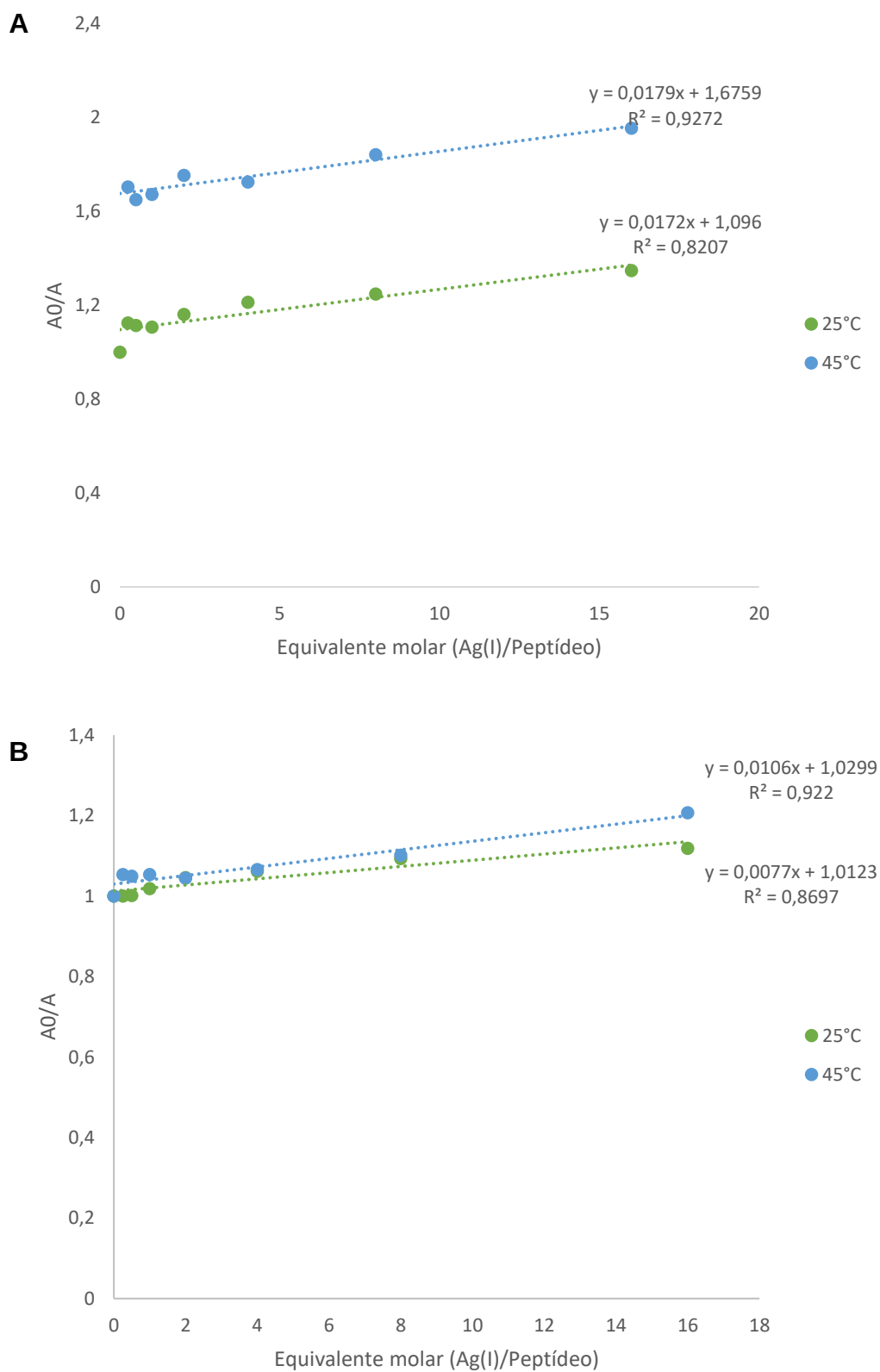
Elaborado pela autora, 2022.

Através da comparação entre diferentes temperaturas, é possível determinar o tipo de supressão causado pela presença do metal, podendo ser estática (formação de complexo), quando é observada uma diminuição na constante de supressão estática (K_s), com a elevação da temperatura, ou dinâmica (encontro colisional entre as espécies), enquanto um efeito inverso é observado, com um aumento da constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}). Para ambas, a dependência de A_0/A em relação a concentração do metal $[Q]$ é a mesma, entretanto, a constante de supressão, no caso de uma supressão estática, corresponde à constante de associação (K_a) do composto de coordenação formado (LACOWICZ, 2006). Tais constantes podem ser obtidas através da equação 03:

$$\frac{A_0}{A} = 1 + K \cdot [Q]$$

As diferentes linearidades observadas nas figuras 17 e 18, para os quatro peptídeos, podem indicar a existência de mais de uma única classe de fluoróforos, não sendo esses igualmente acessíveis ao supressor (LACOWICZ, 2006).

Figura 18. Efeito da temperatura na interação dos peptídeos **(A)** 15 Hst5 e **(B)** 15 Hst5 K11R com Ag(I). Ag(I) (0,25 a 16 equivalentes molares) foi adicionado, por titulação, a uma solução de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeo, e a fluorescência medida com excitação a 280 nm, a 25° e 45°C.



Elaborado pela autora, 2022.

Os valores das constantes de supressão estática e de Stern-Volmer, obtidas a partir da equação 03, à 25° e à 45°C, sendo obtidos a partir de uma média entre as medidas realizadas, estão apresentados na tabela 06. A diminuição do valor da constante em baixas temperaturas é devido à maior estabilidade que o peptídeo apresenta quando coordenado com um íon metálico grande, como a prata(I). O aumento do valor da constante em temperaturas mais altas, por outro lado, ocorre pela dependência da supressão de processos dinâmicos à difusão, de forma que um aumento na temperatura resulta em maiores coeficientes de difusão e, conseqüentemente, em um aumento na constante de supressão.

Tabela 06. Constante de supressão de luminosidade (K), em 25° e 45 °C.

Composto de coordenação	Constante de supressão ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}$)	
	25°C	45°C
14 Hst5 – Ag	-2,76	-2,91
14 Hst5 K11,17R – Ag	-2,90	-2,72
15 Hst5 – Ag	-3,19	-4,80
15 Hst5 K11R – Ag	-2,86	-2,98

Elaborado pela autora, 2022.

Os resultados obtidos demonstram, portanto, que os peptídeos 14 Hst5, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, quando na presença de Ag(I), sofrem supressão estática, havendo diminuição na K_s em maiores temperaturas, indicando uma possível formação de complexo entre os peptídeos e íon metálico. Já o peptídeo 14 Hst5 K11,17R apresentou supressão dinâmica na presença da Ag(I), tendo ocorrido uma diminuição na constante a 45°C, resultante, portanto, de encontros colisionais entre as espécies, e não devido a formação de um complexo. É importante destacar, porém, que a ampla variação nos resultados de A_0/A , torna as informações extraídas dos estudos de supressão de fluorescência relativamente inconclusivas, sendo necessário a realização de outros experimentos de elucidação estrutural para a maior riqueza de detalhes acerca dos dados.

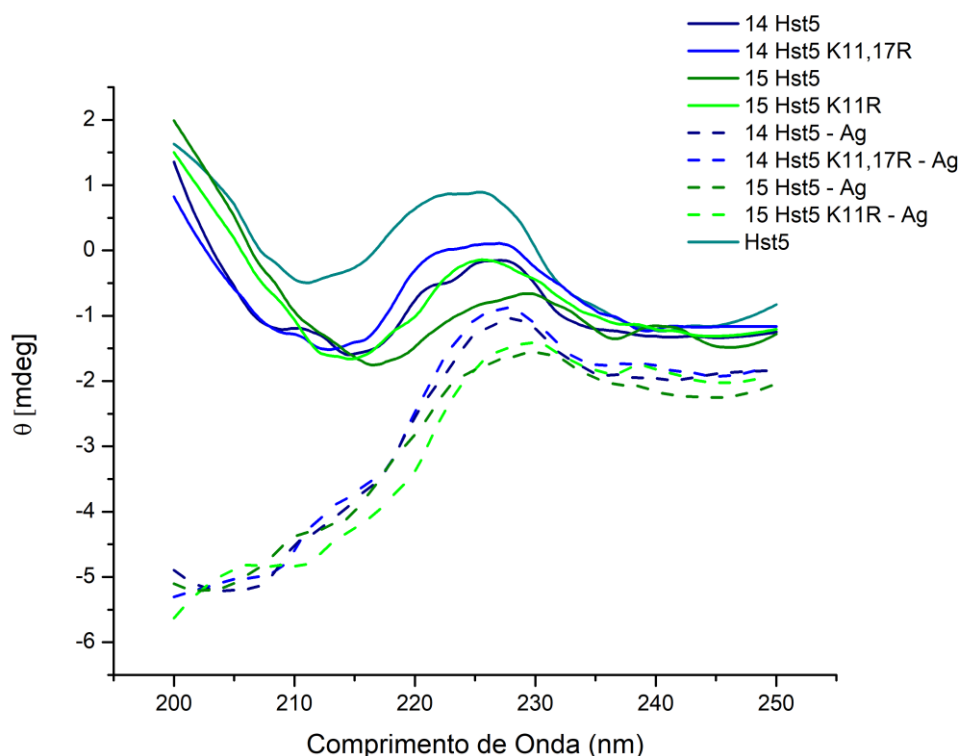
iii. Análise de dicroísmo circular

A técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD) é muito empregada para investigar as características estruturais de moléculas assimétricas ou quirais a partir da interação dessas com a luz circularmente polarizada. Uma onda eletromagnética monocromática é dita circularmente polarizada quando o vetor campo elétrico possuir módulo constante ao longo do tempo, mas variando sua direção em uma trajetória periódica circular, com período igual ao da onda. Assim, os sinais de CD surgem da diferença de absorvância entre a luz polarizada circularmente para a direita (sentido horário, ϵ_R) e para esquerda

(sentido anti-horário, ϵ_L). O espectro de CD é representado como a elipticidade molar ($\theta_m = 3298 \times \Delta\epsilon$, onde $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$) em função do comprimento de onda.

Em peptídeos e proteínas, a ligação no HN-C α possui ângulo de rotação Φ , e C α -C=O, ângulo de rotação ψ . Há uma restrição na rotação da ligação, de forma que diferentes conformações das cadeias polipeptídicas, denominadas como estruturas secundárias, são dependentes dos ângulos de torção ϕ e ψ . Os ângulos específicos são responsáveis pelo espectro de dicroísmo característico de estruturas secundárias (α -hélice, folha- β e randômica). Assim, é possível inferir a estrutura secundária dos peptídeos deste trabalho e dos compostos de coordenação derivados.

Figura 19. Dicroísmo circular, de 200 a 250 nm, dos peptídeos Hst5; 14 Hst5; 14 Hst5 K11,17R; 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, e complexos 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag; 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag, em água, a temperatura ambiente, suavizados em 50 pontos.



Elaborado pela autora, 2022.

A Hst5, sendo composta por 24 resíduos de aminoácido, possui estrutura de α -hélice, que, embora seja pouco estável, é passível de ser verificada através de análises de dicroísmo circular. O perfil característico da estrutura de α -hélice da Hst5 conta com bandas negativas em comprimentos de onda próximos de 215-220 nm e 205-208 nm, características da estrutura helicoidal e atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ de grupamentos amidas, assim como uma banda

máxima positiva abaixo de 200 nm, relacionadas as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ da cadeia principal do polipeptídeo, como apresentado na figura 19, sendo similar ao observado em diversos trabalhos prévios (HELMERHORST, 2001; RAJ, 1990; SITU, 2000; TSAI, 1996).

A Ag(I) possui configuração eletrônica $4d^{10}5s^0$, ou seja, todos os orbitais do subnível d estão completamente ocupados. Isso resultará em uma falta de estabilização do campo cristalino nos complexos formados, de forma que, possuindo um número de coordenação igual a quatro, a configuração eletrônica tenderá a formação de complexos cujo ambiente de coordenação e geometria serão tetraédricos.

Tabela 07. Comprimentos de onda característicos para análise da estrutura secundária da Hst5 e derivados, e seus respectivos valores de $[\theta]_M$ obtidos para os peptídeos e compostos de coordenação.

Peptídeo	λ (nm)	$[\theta]_M$ (deg cm ² dmol ⁻¹)
14 Hst5	200	0,987
	208	-1,289
	220	-1,001
14 Hst5 – Ag	200	-5,062
	208	-4,858
	220	-2,906
14 Hst5 K11,17R	200	0,687
	210	-1,885
	220	-0,263
14 Hst5 K11,17R – Ag	200	-5,247
	210	-4,577
	220	-2,687
15 Hst5	200	1,851
	210	-0,939
	220	-1,463
15 Hst5 – Ag	200	-5,033
	210	-4,066
	220	-2,779
15 Hst5 K11R	200	1,445
	209	-0,960
	220	-0,930
15 Hst5 K11R – Ag	200	-5,362
	209	-4,808
	220	-3,249

Elaborado pela autora, 2022.

A mudança de conformação é claramente visualizada nos perfis de dicroísmo circular dos peptídeos e complexos metalopeptídicos, exibidos na figura 19. Os peptídeos seguem o perfil da Hst5, exibindo bandas negativas próximas a 208 e 220 nm, e máximos positivos próximos a 200 nm, como mostrado na tabela 07, o que sugere uma estrutura predominantemente de α -hélice. Isso não é visualizado nos perfis dos complexos, uma vez que a Ag(I), através da coordenação com cadeias laterais dos aminoácidos que compõe o peptídeo, induz uma mudança na conformação espacial dos ligantes, alterando, portanto, a estrutura de todo o composto.

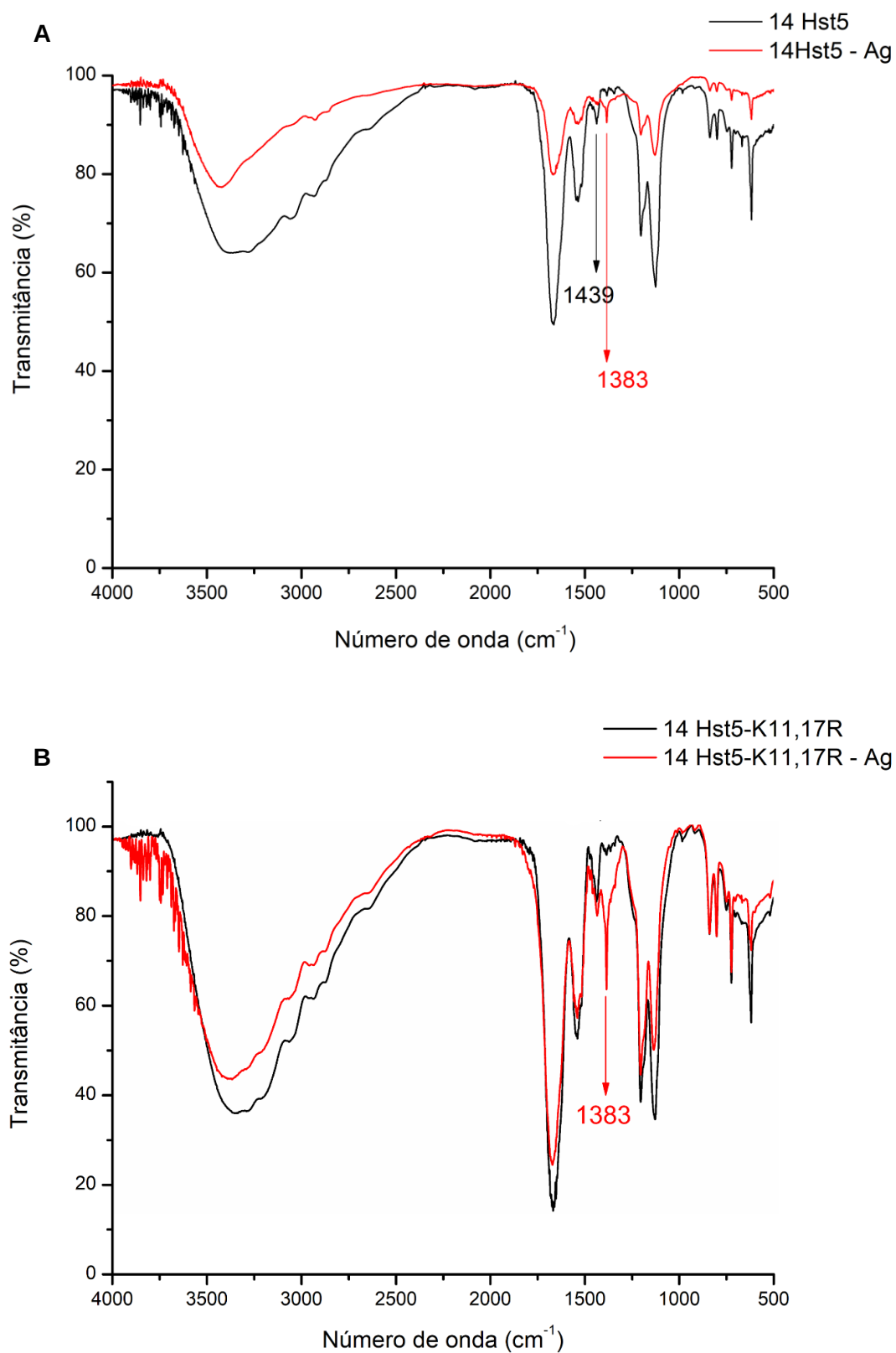
Além disso, a perda da helicidade, observada para todos os complexos formados, também sugere que a coordenação ao íon Ag(I) ocorra em cadeias laterais de resíduos de aminoácidos mais centrais do peptídeo, uma vez que a coordenação com resíduos próximos aos terminais da cadeia não geraria torção significativa ao ponto de modificar toda a estrutura molecular. Assim, observa-se que coordenação da Ag(I) no meio da estrutura do peptídeo desfaz a tendência de conformação em α -hélice intrínseca, uma vez que se espera uma geometria tetraédrica, em virtude da configuração eletrônica fechada d^{10} . Essa característica está relacionada diretamente a ausência das bandas negativas nos espectros de CD, observado na figura 19.

iv. Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A técnica de espectroscopia da região do infravermelho se baseia nas frequências de vibração das ligações químicas das moléculas, decorrentes de variações no momento dipolar (μ) que, por sua vez é dependente da geometria e energia potencial da molécula, bem como da força da ligação e massas reduzidas dos átomos envolvidos nas ligações.

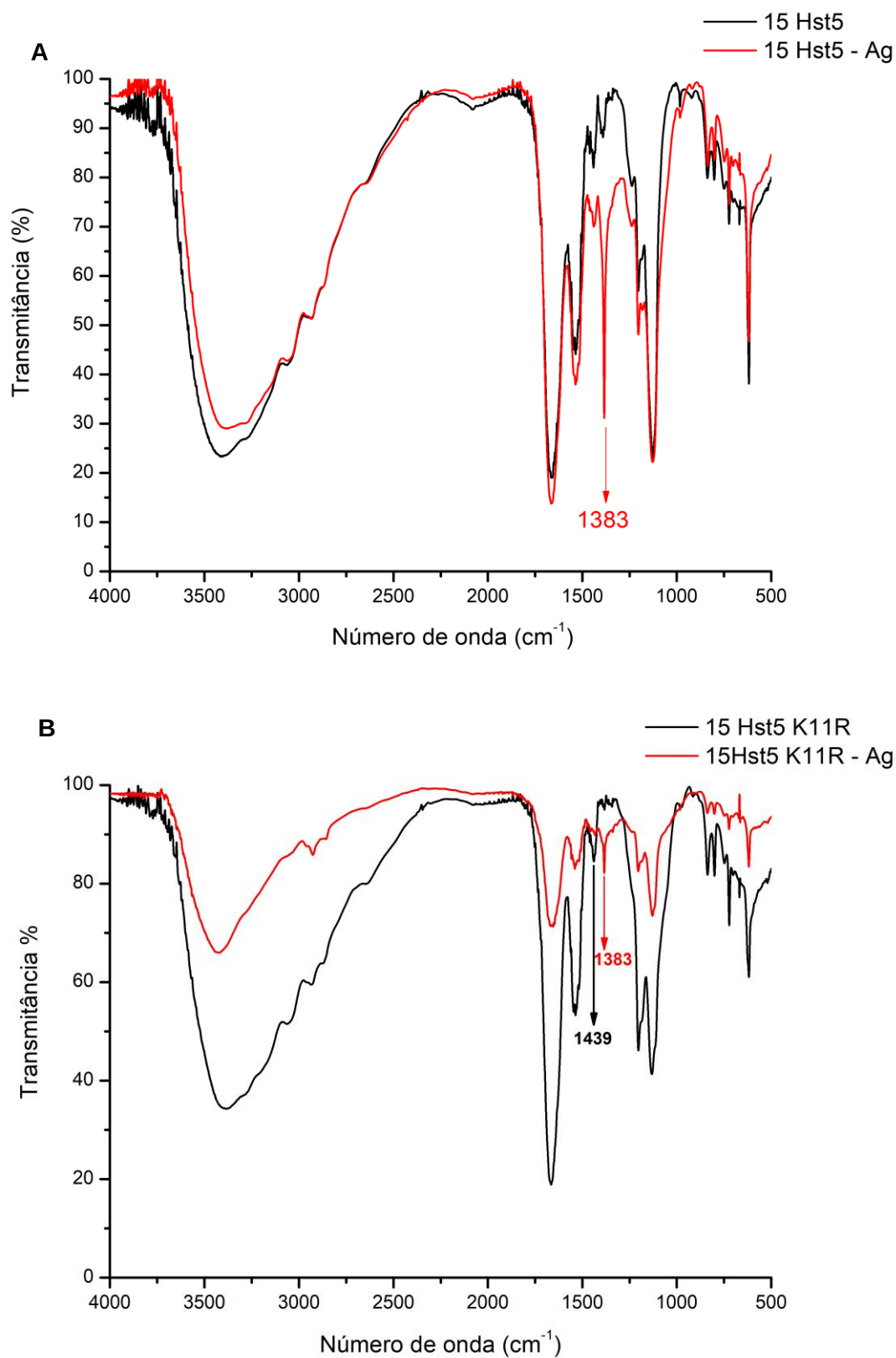
Há uma semelhança significativa para quase todos os espectros de peptídeo e seu respectivo complexo, como é possível observar nas figuras 20 e 21. O surgimento de uma nova banda em 1383 cm^{-1} e/ou deslocamento da banda existente em 1439 cm^{-1} , referente ao modo $\bar{\nu}(\text{C-H})$ da cadeia lateral de histidina, para menores valores de número de onda, indicam a formação de um novo composto, sugerindo o sucesso reacional na coordenação. Além disso, a similaridade entre os perfis dos espectros de infravermelho obtidos para os quatro peptídeos e quatro complexos indica que os modos de coordenação entre os peptídeos e a Ag(I) devem ter ocorrido de modo similar.

Figura 20. Espectros de infravermelho, de 4000 a 400 cm^{-1} , obtidos em KBr, para os peptídeos e complexos **(A)** 14 Hst5 e 14 Hst5 – Ag e **(B)** 14 Hst5 K11,17R e 14 Hst5 K11,17R – Ag;



Elaborado pela autora, 2022.

Figura 21. Espectros de infravermelho, de 4000 a 400 cm^{-1} , obtidos em KBr, para os peptídeos e complexos **(A)** 15 Hst5 e 15 Hst5 – Ag; e **(B)** 15 Hst5 K11R e 15 Hst5 K11R – Ag.



Elaborados pela autora, 2022.

Tendo em vista que não ocorre variação entre os modos vibracionais do tipo amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) e amida II ($1480-1580\text{ cm}^{-1}$), que correspondem, respectivamente, aos estiramentos $\bar{\nu}(\text{C}=\text{O})$, $\bar{\nu}(\text{C}-\text{N})$ e $\bar{\nu}(\text{C}-\text{H})$ da ligação peptídica, bem como a deformação angular $\delta(\text{N}-\text{H})$, também da cadeia principal do peptídeo (GAIGEOT, 2007), propõe-se que a coordenação da Ag(I) não ocorra na cadeia principal do peptídeo, e sim através das cadeias laterais, com maior direção as histidinas. A tabela 08 resume valores selecionados para os modos de vibração observados (RAJ, 1990; SITU, 2000; HELMERHORST, 2001).

Tabela 08. Números de onda correspondentes às bandas teóricas de amida I e amida II, bem como ao estiramento CH_2 da molécula de histidina, e os valores obtidos pela espectroscopia de infravermelho para os peptídeos e complexos estudados.

	Amida I $\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ (cm^{-1})	Amida II $\nu(\text{C}-\text{H}) + \delta(\text{N}-\text{H})$ (cm^{-1})	Histidina $\nu(\text{C}-\text{H})$ (cm^{-1})
<i>Peptídeo teórico</i>	1600-1700	1480-1580	~1438
<i>14 Hst5</i>	1667	1534	1439
<i>14 Hst5 – Ag</i>	1667	1534	1383
<i>14 Hst5 K11,17R</i>	1669	1539	1439
<i>14 Hst5 K11,17R – Ag</i>	1669	1539	1383
<i>15 Hst5</i>	1663	1534	1439
<i>15 Hst5 – Ag</i>	1663	1534	1383
<i>15 Hst5 K11R</i>	1663	1536	1439
<i>15 Hst5 K11R – Ag</i>	1663	1536	1383

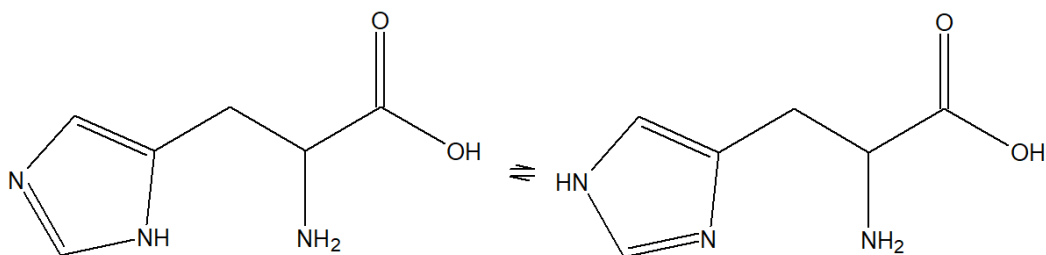
Elaborado pela autora, 2022.

A partir dos resultados obtidos nas análises de dicroísmo circular, infere-se que a coordenação esteja ocorrendo através dos resíduos de aminoácidos centrais da cadeia peptídica. Para os quatro peptídeos estudados, a região central é caracterizada por uma alta concentração de resíduos de histidina, havendo as sequências HEKHHSH no 14 Hst5 e HERHHSH no 14 Hst5 K11,17R, e HAKRHH no 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, que possuem, portanto, susceptibilidade à coordenação com metais. De fato, conforme os dados obtidos nos espectros de infravermelho, a banda que se diferencia entre o peptídeo e seu respectivo complexo é o estiramento νCH_2 da histidina ($\sim 1438\text{ cm}^{-1}$) (MESU, 2005).

A histidina apresenta, em pH fisiológico, duas formas tautoméricas referentes à alternância entre a ligação de um átomo de hidrogênio e N^π e N^τ , nitrogênios do anel de imidazol (mais próximo e mais distante do CH_2 , respectivamente), apresentados na figura 22. De acordo com a literatura, a coordenação da Ag(I) pela histidina deve ocorrer preferencialmente em um dos

nitrogênios citados, sendo o mais provável aquele que apresentar menor impedimento estérico em relação a cadeia principal do peptídeo, portanto, o N^T.

Figura 22. Formas tautoméricas da histidina.

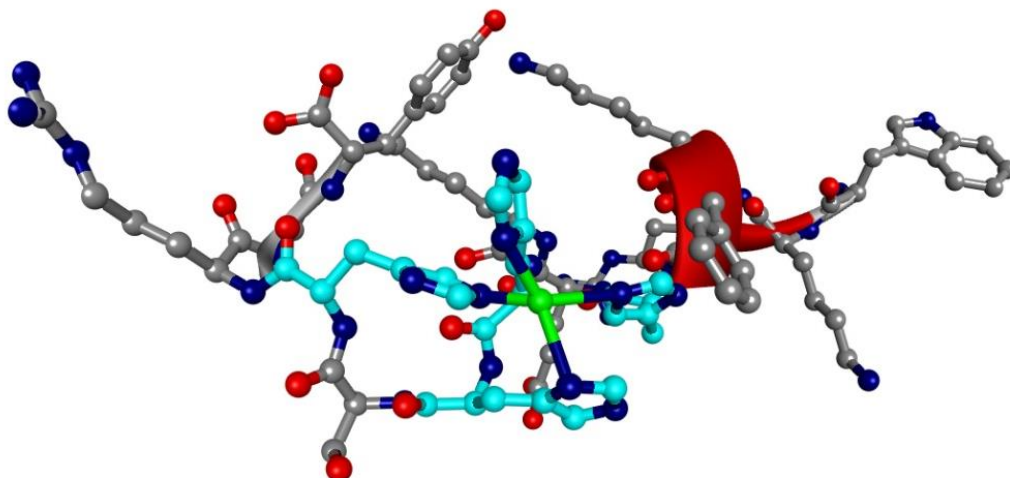


Elaborado pela autora, 2022.

É esperado que a coordenação da Ag(I) através do N^T propicie um aumento na acidez dos hidrogênios do grupamento CH₂, o que resultaria no aumento dos valores de frequência das respectivas vibrações. Curiosamente, se observa uma diminuição nos valores de vibração do modo $\bar{\nu}(\text{C-H})$. Uma explicação razoável consiste na possibilidade de formação de ligação hidrogênio intramolecular não-clássica do tipo C-H...X entre a subunidade metilênica (CH₂) e átomos mais eletronegativos com pares de elétrons disponíveis (X) que se localizem próximos ao anel imidazólico da histidina utilizada na coordenação (MESU, 2005). Tal situação poderia diminuir os graus de liberdade de vibração do grupamento C-H, com diminuição dos momentos dipolares e respectivas quedas nos valores de frequências associadas.

Por fim, a formação de ligações coordenadas entre as histidinas e a prata estaria reforçando a hipótese de uma coordenação na região central do peptídeo, levando a distorção da estrutura predominantemente em α -hélice, mediante direcionamento espacial dos ligantes para um ambiente de coordenação tetraédrico. O resultado de dicroísmo circular obtido para os complexos coincide com a hipótese, devido a perda de helicidade que se observa apenas para os complexos, de que a coordenação não ocorre nas extremidades dos peptídeos utilizados. A coordenação com nitrogênios próximos aos terminais do peptídeo não teria tal poder de interferência na estrutura secundária do composto. É apresentado na figura 23 uma representação estrutural da possível conformação do composto de coordenação, com a perda da helicidade causada pela coordenação com a Ag(I).

Figura 23. Representação da estrutura 3D do composto de coordenação formado entre o peptídeo 14 Hst5 e Ag(I).



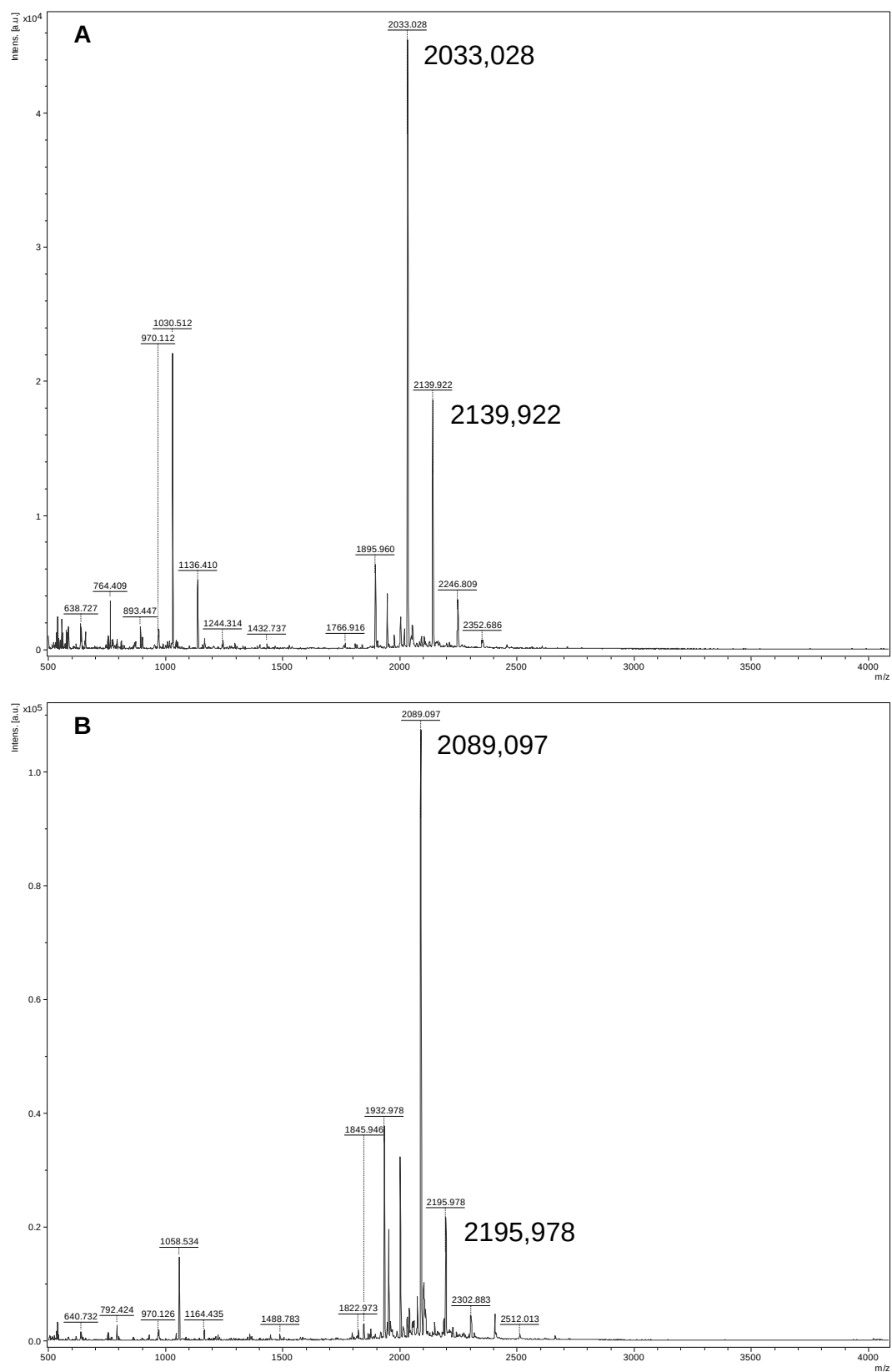
Criado com Discovery Studio. Elaborado pela autora, 2022.

v. Análises de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF

A técnica de Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS, do inglês “*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*”), é uma técnica que permite a análise de massas de biomoléculas, sendo uma importante ferramenta de identificação de peptídeos e proteínas, que possuem massa molecular elevada. A principal vantagem do método é a não destruição da amostra (VRIONI, 2018; NIELEN, 1999; WEBSTER, 2012).

A ionização da matriz através de um feixe de laser possibilita uma transferência de prótons para a amostra, ionizando as moléculas, e ao mesmo tempo desencadeando o processo de dessorção da amostra, favorecendo a passagem para o estado gasoso. Dessa forma, a transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, uma vez que não sofreram incidência direta da energia do laser (CROXATTO, 2012; ROEPSTORFF, 2000). Através de um campo elétrico, os íons formados são acelerados e individualmente analisados, formando espectros de massa de acordo com a razão massa/carga (NIELEN, 1999), como pode ser observado nas figuras 24 e 25.

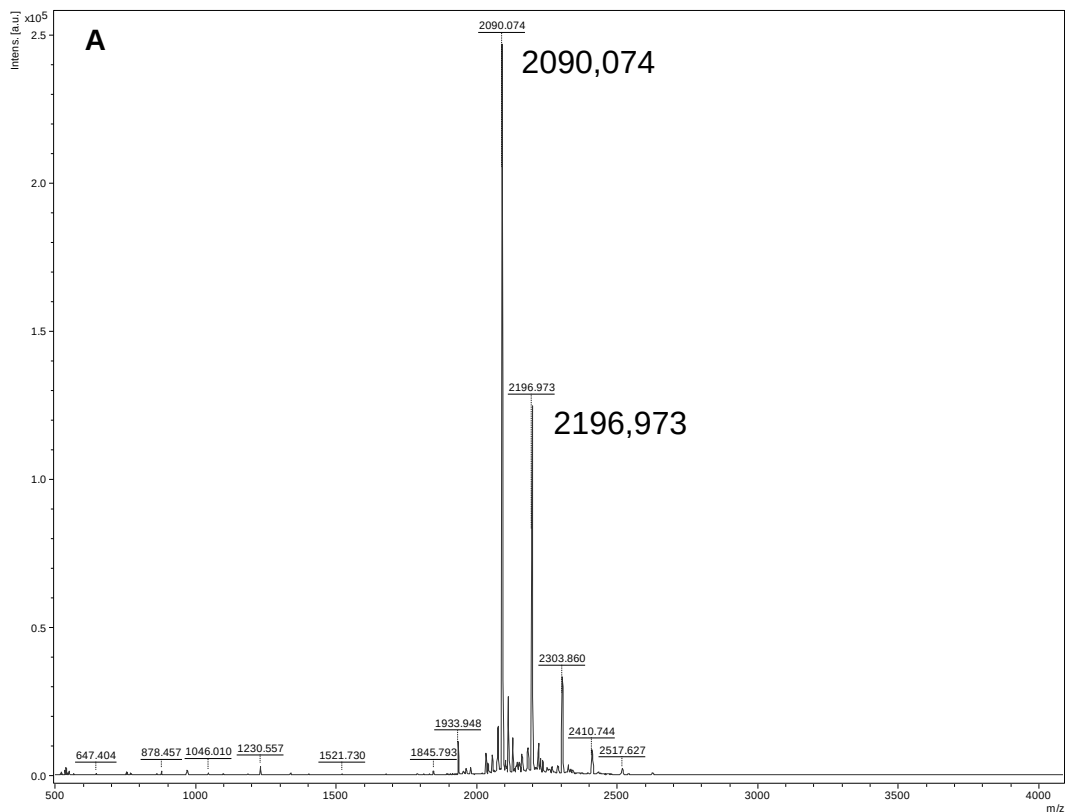
Figura 24. Espectro de massas por MALDI-TOF dos compostos de coordenação **(A)** 14 Hst5 – Ag e **(B)** 14 Hst5 K11,17R – Ag.

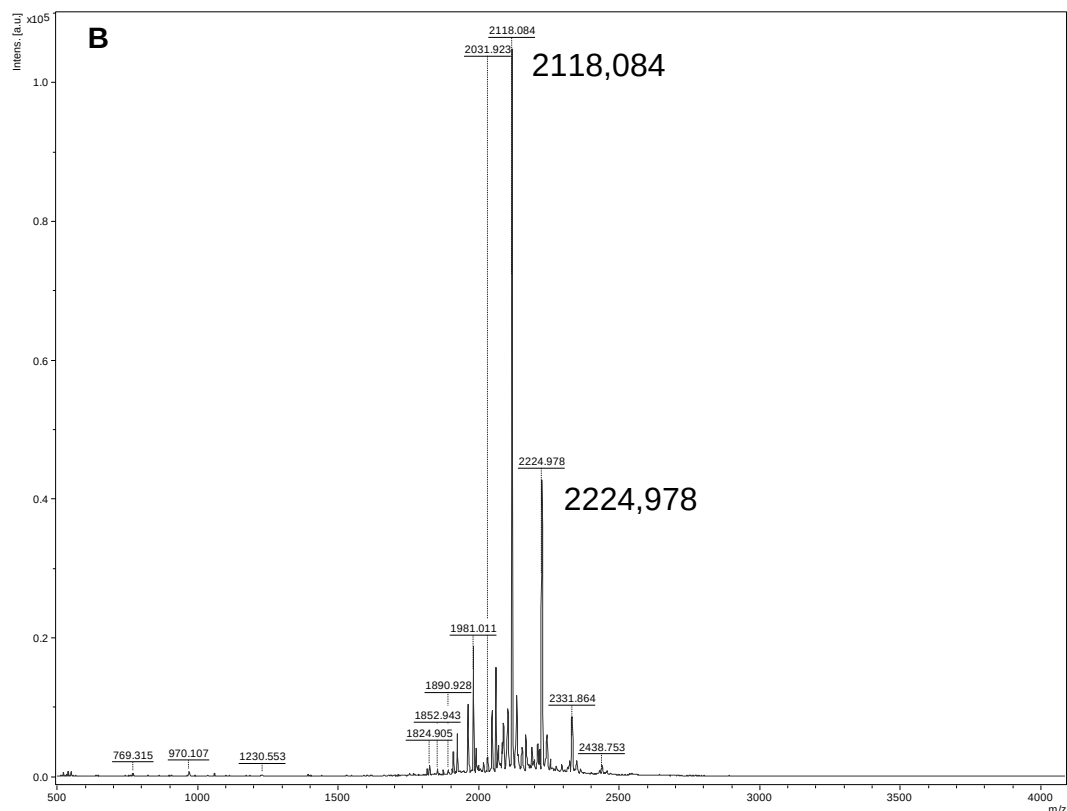


Elaborado pela autora, 2023.

A vantagem em se utilizar a técnica para a determinação da massa dos compostos de coordenação formados entre os peptídeos 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R com Ag(I) é a possibilidade de se obter a massa do composto inteiro, sem a fragmentação que poderia ocorrer em outras técnicas de espectrometria de massas, e, dessa forma, confirmar de forma precisa a razão molar de coordenação entre os peptídeos e o metal.

Figura 25. Espectro de massas por MALDI-TOF dos compostos de coordenação **(A)** 15 Hst5 – Ag e **(B)** 15 Hst5 K11R – Ag.





Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 09. Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas por MALDI-TOF para os compostos de coordenação.

Composto de coordenação	Carga (z)	Razão m/z teórica	Razão m/z experimental	Massa molar experimental (g/mol)	Massa molar teórica (g/mol)
14 Hst5 – Ag	2	1071,56	1052,49	2139,92	2141,13
	3	714,71	744,61		
	4	536,28	536,50		
14 Hst5 K11,17R – Ag	2	1099,58	1086,54	2195,98	2197,16
	3	733,39	754,31		
	4	550,29	542,51		
15 Hst5 – Ag	2	1100,09	1099,46	2199,98	2198,18
	3	733,73	746,33		
	4	550,54	550,56		
15 Hst5 K11R – Ag	2	1114,1	1112,98	2224,98	2226,2
	3	743,1	756,29		
	4	557,55	557,32		

Elaborado pela autora, 2023.

Como pode ser observado na tabela 09, os valores da razão molar m/z obtidos experimentalmente são condizentes com os valores teóricos calculados para a proporção molar de 1:1 peptídeo/Ag(I), para todos os compostos de coordenação. Os resultados corroboram o obtido através das análises de fluorescência, e, portanto, é possível afirmar que a coordenação corre entre uma molécula de peptídeo e uma molécula de Ag(I), para os quatro casos.

c. Ensaios Microbiológicos

i. Inibição do crescimento da *C. albicans*

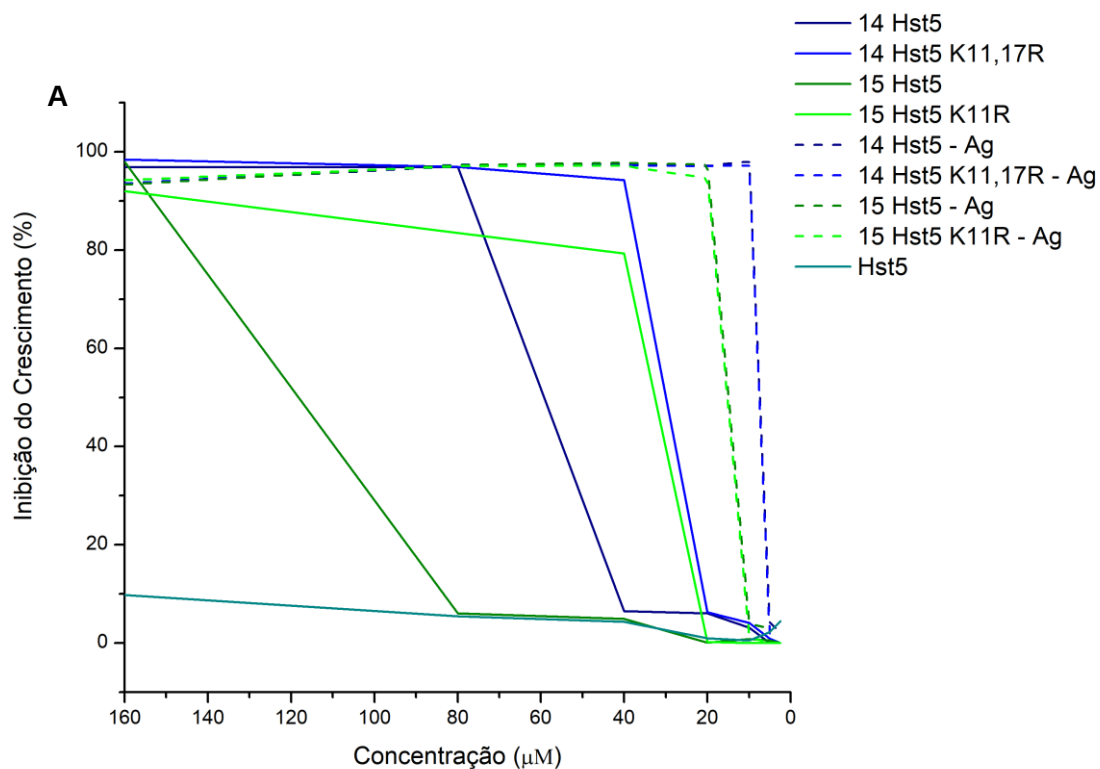
Foi realizado o experimento para avaliar a capacidade de cada um dos peptídeos propostos na inibição do crescimento de *C. albicans*, num período de 48 horas. Foram utilizadas as cepas ATCC 90028, padrão para o tipo de experimento; ATCC 18804, isolado de lesão cutânea, que apresenta indução de imunidade mediada por células contra *C. albicans* e certa resistência a medicamentos como fluconazol; e ATCC 10231, que também apresenta resistência à fluconazol, além de ser capaz de formar biofilmes. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, com diversas concentrações de peptídeo obtidas a partir de diluição seriada, indo de 160 a 0,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo possível, portanto, avaliar, de acordo com os resultados apresentados na figura 26, a porcentagem de inibição do crescimento da *C. albicans* nas concentrações de 160 a 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, uma vez que abaixo da concentração de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, não houve inibição significativa.

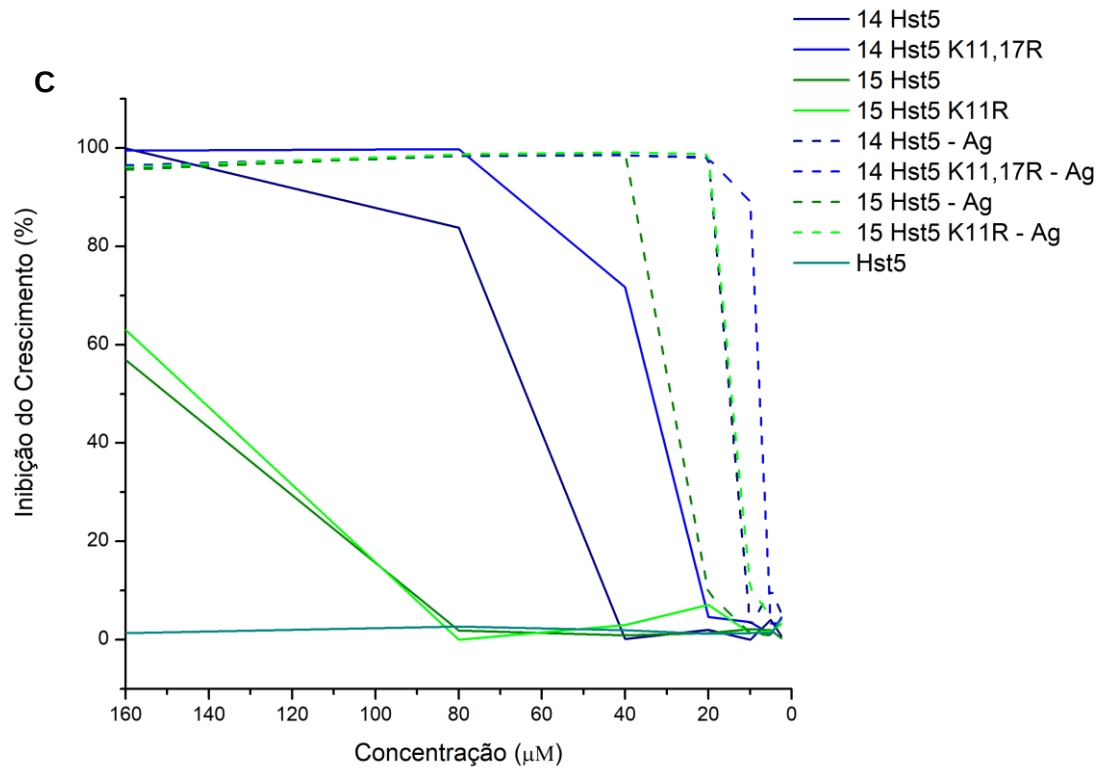
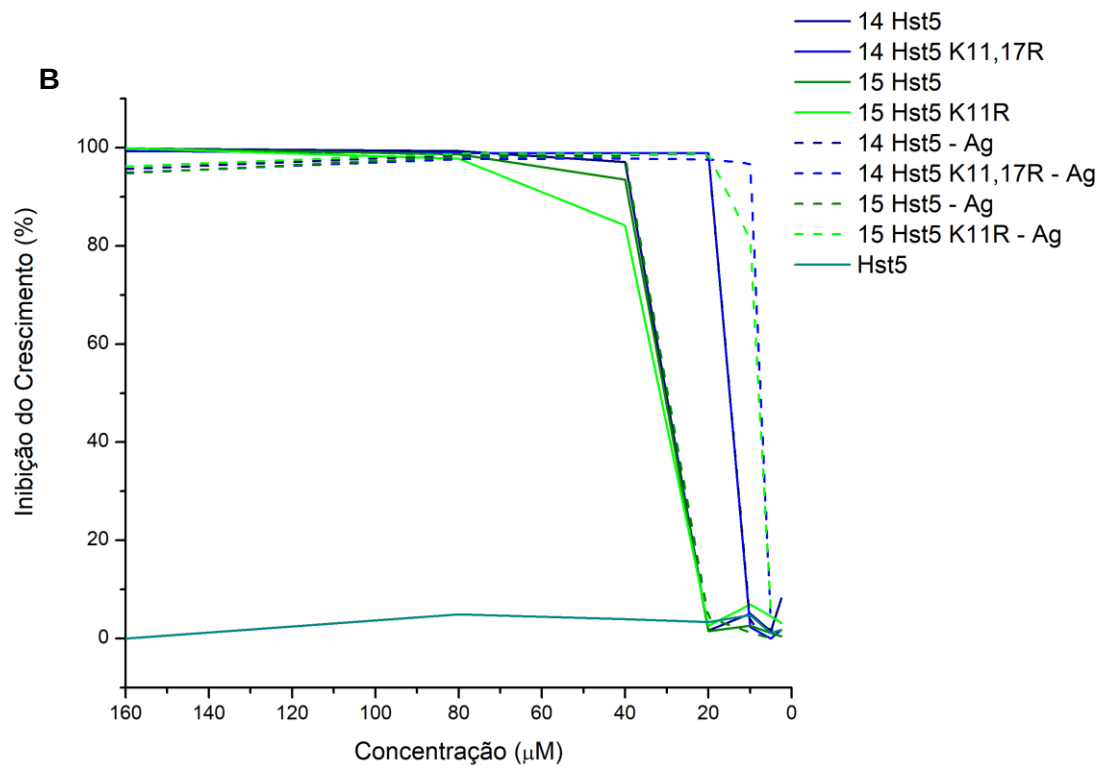
Para os peptídeos, foram obtidos diferentes resultados para cada uma das cepas, tendo sido mais eficientes para a inibição do crescimento da ATCC 18804, enquanto a ATCC 10231 obteve as menores inibições. Considerando a estrutura da Hst5, que possui um domínio funcional de atividade antimicrobiana entre os aminoácidos 11 e 24 de sua cadeia, é esperado que os peptídeos 14 Hst5 e 14 Hst5 K11,17R, que compreendem os aminoácidos de 10 a 24 da cadeia da Hst5, apresentem atividade superior em relação aos peptídeos 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, o que pôde ser observado experimentalmente, com os dois primeiros peptídeos apresentando inibição de crescimento da *C. albicans* superior a 90%, em 40 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, na cepa com melhor resultado. Os peptídeos 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R apresentaram a mesma inibição apenas em 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na mesma cepa, comprovando assim a importância do domínio funcional na estrutura do peptídeo para a atividade antimicrobiana. De acordo com a literatura, o peptídeo Hst5 apresenta inibição do crescimento de *C. albicans* em 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a cepa ATCC 90028. Tal resultado não foi observado, não havendo nenhuma considerável porcentagem de inibição de crescimento por Hst5 em 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em todas as cepas testadas.

Dentre os dois peptídeos de maior eficiência na inibição do crescimento de *C. albicans*, o resultado do peptídeo 14 Hst5 K11,17R foi superior, indicando que as modificações na sequência de aminoácidos, dos resíduos 11 e 17 de lisina por resíduos de arginina, realmente apresentam o resultado esperado, uma vez que houve uma provável redução da quebra do peptídeo, mediada pelo

fungo, ao se retirar o aminoácido que atua como sítio de partida para a ação proteolítica fúngica (lisina).

Figura 26. Inibição do crescimento de células planctônicas de *C. albicans* pelos peptídeos Hst5, 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5, 15 Hst5 K11R, seus respectivos complexos nas cepas **(A)** ATCC 90028 **(B)** ATCC 18804 **(C)** ATCC 10231.





Elaborado pela autora, 2022.

O estudo propôs a adição de um íon metálico de prata à estrutura de cada um dos peptídeos, pela coordenação metal-peptídeo, com o objetivo de aumentar a capacidade de inibição de crescimento fúngico de *C. albicans*. Tal efeito pôde ser observado para cada um dos complexos formados, ou seja, a adição de um íon metálico de prata aumentou significativamente a atividade antifúngica de cada um dos peptídeos, com a concentração para inibição de 90% do crescimento fúngico passando de 80 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no caso da 14 Hst5, de 80 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para de 20 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no caso da 14 Hst5 K11,17R, de acima de 160 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para de 40 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a 15 Hst5, e de acima de 160 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a 15 Hst5 K11R, nas cepas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, como é possível observar na figura 26. O aumento na carga positiva final do composto de coordenação, pela interação de peptídeos com carga líquida positiva com um íon catiônico, pode favorecer a ação antimicrobiana por aumentar a interação do complexo com as cargas negativas das membranas fúngicas. Essa otimização da atividade antifúngica dos peptídeos na presença da Ag(I) também pode ser um indicativo da coordenação entre as moléculas, já que a formação dos complexos possibilitaria uma atividade sinérgica entre Ag(I), que atua nas membranas, e os peptídeos, com ação intracelular, favorecendo a ação antifúngica, como realmente é observado.

ii. Concentração inibitória mínima

Para cada um dos quatro peptídeos analisados, 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R, e dos seus respectivos complexos com prata(I), os valores de concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a concentração capaz de inibir, num período de 48 horas, um mínimo de 90% do crescimento da *C. albicans*, são apresentados na tabela 10.

A partir dos valores de densidade óptica (DO), obtidos pela medição em 595 nm, foram obtidos diferentes valores de CIM para cada um dos diferentes peptídeos analisados, nas diferentes cepas. No caso do 14 Hst5, foi obtido um valor de CIM de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nas cepas ATCC 90028 e ATCC 18804, enquanto na cepa ATCC 10231 esse valor foi maior, chegando a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Considerando a resistência à medicação que a última cepa apresenta, bem como sua capacidade de formar biofilmes fúngicos, é esperado que o valor de CIM para os peptídeos seja maior do que para outras cepas, entretanto, o valor de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ corresponde ao valor já apresentado, em diversos estudos (ZAMBOM, 2019; MOFFA, 2015), da concentração inibitória mínima da Hst5, peptídeo original de onde foram retirados os fragmentos, para todas as cepas testadas, demonstrando que o 14 Hst5 possui atividade igual (ATCC 10231) ou superior (ATCC 90028 e ATCC 18804) em comparação ao peptídeo original. A coordenação do peptídeo com um íon metálico de prata otimizou sua atividade antifúngica, com valores de CIM passando para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as cepas testadas. O aumento da atividade é esperado na coordenação do peptídeo com a prata, pois o metal possui atividade antimicrobiana intrínseca, de forma que a junção de diferentes agentes antifúngicos contribui para que haja mais

mecanismos de ação presentes na tentativa de inibição das células fúngicas de *C. albicans*, o que, para esse caso, foi demonstrado ser mais eficiente do que o peptídeo isolado.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima dos peptídeos e complexos estudados nas cepas de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231.

Peptídeo/Complexo	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	ATCC 90028	ATCC 18804	ATCC 10231
14 Hst5	80	40	80
14 Hst5 – Ag	20	20	20
14 Hst5 K11,17R	40	20	80
14 Hst5 K11,17R – Ag	10	10	20
15 Hst5	160	40	>160
15 Hst5 – Ag	20	40	40
15 Hst5 K11R	160	80	>160
15 Hst5 K11R – Ag	20	20	20
Ag(I)	80	80	80
Flu	5	>160	>160
Nys	2,5	2,5	2,5

Elaborado pela autora, 2022.

Para o peptídeo 14 Hst5 K11,17R, os valores de CIM obtidos foram de 40, 20 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as cepas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, respectivamente. Foi mantido o padrão do peptídeo 14 Hst5, sendo a eficiência da inibição do crescimento do fungo pelo peptídeo menor na cepa que apresenta mais mecanismos de resistência. Os valores de CIM obtidos para as outras cepas mostram uma eficácia promissora do 14 Hst5 K11,17R, indicando, que de todos os peptídeos testados, é o que apresenta maior atividade antifúngica, e possivelmente, a menor degradação proteolítica ocasionada pela *C. albicans*. Também foi possível observar um grande aumento da atividade antifúngica do peptídeo 14 Hst5 K11,17R quando complexado com a prata, tendo a concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento de 90% dos fungos passado de 40, 20 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 10, 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para as cepas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, mostrando, novamente, a otimização da atividade como resultado da coordenação.

Os peptídeos 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R apresentaram atividades antifúngicas bastante semelhantes, havendo uma diferença no valor de CIM apenas na cepa ATCC 18804, sendo de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o primeiro peptídeo, e de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o segundo. Uma vez que a estrutura dos peptídeos corresponde apenas aos primeiros 15 resíduos de aminoácidos da cadeia original da Hst5, compreendendo apenas três dos aminoácidos que fazem parte

do domínio funcional do peptídeo, uma menor atividade antifúngica em relação aos peptídeos 14 Hst5 e 14 Hst5 K11,17R era esperada. Como nos casos anteriores, houve também uma melhora da atividade antifúngica dos peptídeos quando coordenados com o íon metálico de prata. Para a 15 Hst5, o CIM do complexo chegou a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na cepa ATCC 90028, enquanto o peptídeo isolado apresentava CIM de 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A otimização da capacidade de inibição do crescimento fúngico da 15 Hst5 K11R foi ainda mais significativo, diminuindo de 160, 80 e $>160 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas cepas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, respectivamente, para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todos os casos.

Os padrões de Fluconazol (Flu) e Nistatina (Nys), dois agentes antifúngicos usados no tratamento de infecções de *C. albicans*, sendo o primeiro utilizado amplamente em infecções tópicas e sistêmicas, e o segundo usado principalmente em casos de infecção tópica, foram obtidos como parâmetros para avaliação da eficiência dos peptídeos e complexos estudados. É possível observar que ambos apresentam alta eficiência na inibição do crescimento fúngico na cepa ATCC 90028, sendo acima de 95% até 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Flu, e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Nys. Porém, o resultado do Flu não se repete para as outras cepas, onde a inibição do crescimento se mantém abaixo de 45% em todas as concentrações testadas, nas cepas ATCC 18804 e ATCC 10231. A Nys, por outro lado, manteve uma inibição acima de 95% em todas as cepas, até a concentração de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Abaixo dessa concentração, houve quedas significativas nas porcentagens de inibição. Padrões de prata(I) também foram analisados como parâmetros. A porcentagem de inibição de Ag(I) se manteve acima de 95% até a concentração de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as cepas testadas, sendo ligeiramente mais eficiente na cepa ATCC 90028, onde a concentração de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ainda apresentou uma inibição acima de 85%, enquanto a mesma concentração, nas outras duas cepas, apresentou inibição próxima a zero.

O significativo aumento da atividade antifúngica contra células planctônicas de *C. albicans* por todos os compostos de coordenação formados entre íons metálicos de prata(I) e os peptídeos desenvolvidos, tendo os próprios peptídeos isolados uma atividade antifúngica superior ao peptídeo original, Hst5, demonstra quão eficiente e promissora é a complexação. Embora medicamentos amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. albicans*, como Fluconazol e Nistatina, possam apresentar concentrações inibitórias mínimas inferiores aos compostos de coordenação, algumas problemáticas são encontradas. No caso do Fluconazol, a inibição ocorre unicamente na cepa ATCC 90028, sendo o medicamento incapaz de combater infecções das cepas ATCC 18804 e ATCC 10231, enquanto os compostos de coordenação são eficientes para as três cepas. A Nistatina, por outro lado, é usada apenas para infecções tópicas, sem uso para casos sistêmicos ou contaminações abióticas, enquanto os complexos podem ainda ser explorados para tais situações, apresentando excelentes perspectivas. As inibições dos peptídeos e complexos estudados foram superiores aos padrões de Hst5 e Ag(I) em todas as cepas, além de Fluconazol nas cepas ATCC 18804 e ATCC 10231, demonstrando que os compostos propostos pelo trabalho não são suscetíveis aos mecanismos de resistência da *C. albicans* que diminuem a atividade do

agente antifúngico. Assim, os resultados obtidos para os compostos estudados são promissores para o desenvolvimento de agentes antifúngicos eficientes e de amplo uso.

iii. Avaliação da atividade hemolítica

Peptídeos antimicrobianos, de maneira geral, possuem uma alta atividade hemolítica associada. Da mesma forma, altas concentrações de prata podem ser tóxicas para o organismo. Assim, a determinação da atividade hemolítica dos peptídeos produzidos associados ao metal podem indicar um certo nível de toxicidade dos compostos de coordenação, permitindo quantificar o dano causado sobre a membrana plasmática dos eritrócitos e a consequente liberação da hemoglobina, e, portanto, sua margem de segurança para aplicação como tratamentos antifúngicos.

A atividade foi determinada pela adição de alíquotas de cada um dos complexos, analisadas em sua concentração inibitória mínima (apresentada em experimentos anteriores de atividade antifúngica), à solução de hemácias recém-preparadas. Após o período de incubação, foi feita a medição da densidade ótica de cada solução, que foram calculadas com base nos controles negativo e positivo utilizados. Os resultados da porcentagem de hemólise que cada composto de coordenação apresentou estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11. Porcentagem de atividade hemolítica dos complexos estudados em sua concentração inibitória mínima de atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Complexo	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% Hemólise
14 Hst5 – Ag	20	35 $\pm$ 13
14 Hst5 K11,17R – Ag	20	61 $\pm$ 11
15 Hst5 – Ag	40	46 $\pm$ 10
15 Hst5 K11R – Ag	20	49 $\pm$ 3

Elaborado pela autora, 2022.

Os compostos de coordenação apresentaram porcentagem de hemólise inferior a 50% na concentração inibitória mínima, com exceção ao composto 14 Hst5 K11,17R – Ag, cuja atividade hemolítica ficou em torno de 60%. Sendo esse o complexo que apresentou maior atividade antifúngica, é esperado que apresente uma toxicidade superior aos outros complexos estudados.

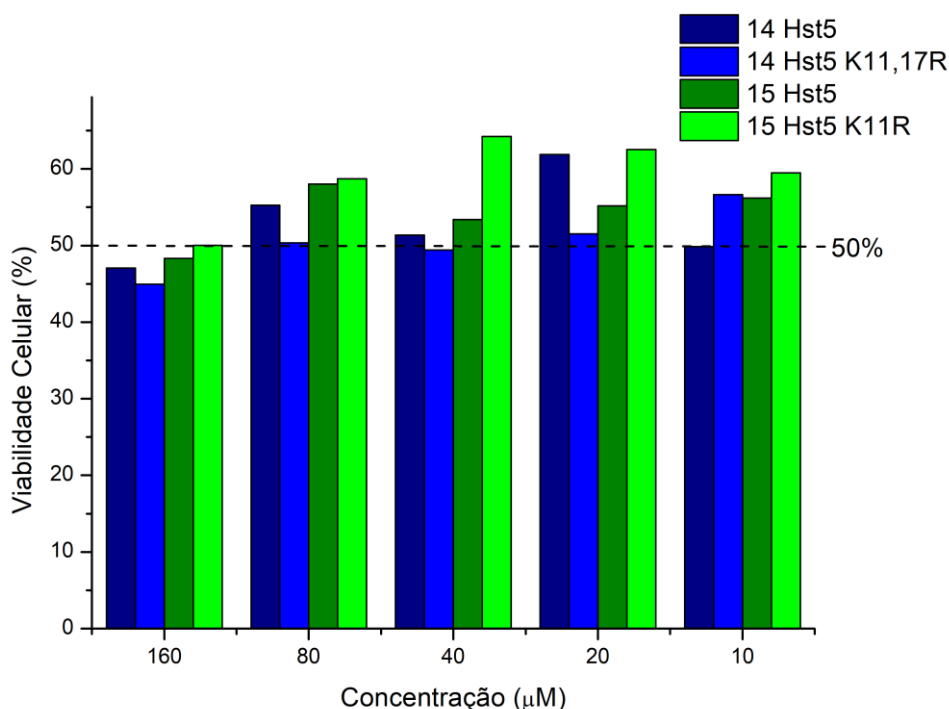
É possível observar, que em ambos os casos em que houve a troca de resíduos de aminoácidos na estrutura do peptídeo, 14 Hst5 K11,17R e 15 Hst5 K11R, a atividade hemolítica foi superior ao peptídeo original fragmento da Hst5, 14 Hst5 e 15 Hst5, respectivamente. Portanto, é possível que a troca dos resíduos de lisina por arginina possa interferir no nível de toxicidade dos

peptídeos. Estudos demonstram que a arginina possui uma maior capacidade de interação com membranas, podendo contribuir para o rompimento dessas (LI, 2013). Tal fato pode ser bastante interessante do ponto de vista da atividade antifúngica, contribuindo para uma maior interação peptídeo-membrana e, portanto, para uma maior ação prejudicial para células fúngicas. Por outro lado, essa maior interação também pode tornar o peptídeo mais tóxico para células humanas, uma vez que a arginina não apresenta especificidade entre membranas humanas e fúngicas

iv. Determinação da toxicidade celular

De modo a avaliar os possíveis efeitos citotóxicos dos peptídeos e compostos de coordenação, foram realizados ensaios de toxicidade celular utilizando células OSCC, de carcinoma na mucosa oral. Os resultados obtidos para os valores de porcentagem de viabilidade celular para células estão apresentados nas figuras 27 e 28, com indicação da viabilidade de 50%.

Figura 27. Viabilidade de células OSCC após incubação com diferentes concentrações dos peptídeos 14 Hst5, 14 Hst5 K11,17R, 15 Hst5 e 15 Hst5 K11R. O traço pontilhado indica 50% de viabilidade celular.



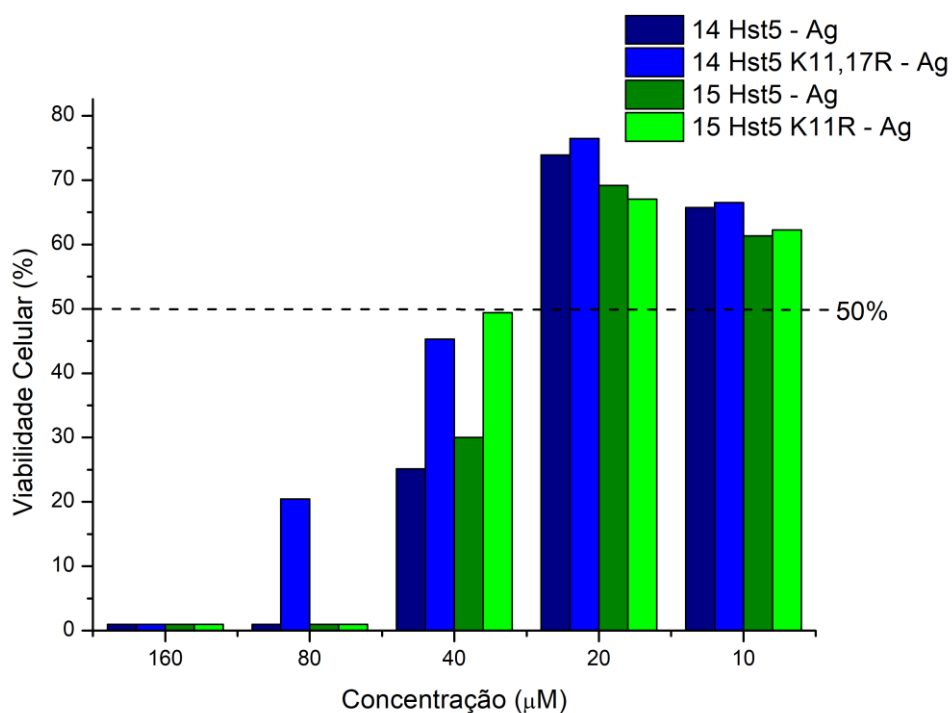
Elaborado pela autora, 2023.

Como pode ser observado na figura 27, os peptídeos apresentaram relativatotoxicidade, obtendo-se valores de viabilidade celular acima de 50% para concentrações acima de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Essa menor toxicidade para células

humanas era esperada, uma vez que se trata de peptídeos encontrados naturalmente na saliva (14 Hst5 e 15 Hst5) e análogos com poucas modificações estruturais (14 Hst5 K11,17R e 15 Hst5 K11R).

A viabilidade celular apresentada pode estar associada ao mecanismo de ação dos peptídeos, que, semelhantes ao da Hst5, possuem ação intracelular, sendo a mitocôndria e o núcleo os principais alvos da atividade antimicrobiana. Dessa forma, os peptídeos são capazes de atravessar as paredes e membrana plasmática das células sem causar danos pela formação de poros, e, portanto, não são capazes de zerar a viabilidade das células OSCC nem na maior concentração testada ($160 \mu\text{mol L}^{-1}$), embora maiores concentrações possam apresentar efeitos diferentes para as células.

Figura 28. Viabilidade de células OSCC após incubação com diferentes concentrações dos compostos de coordenação 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag, 15 Hst5 – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag. O traço pontilhado indica 50% de viabilidade celular.



Elaborado pela autora, 2023.

Para os compostos de coordenação formados entre os peptídeos e Ag(I), as viabilidades celulares apresentadas na figura 28 são menores que para os peptídeos isolados. A prata, isolada, apresenta toxicidade para microrganismos como fungos, vírus e bactérias, sendo capaz de inibir o crescimento e causar a perda da infectividade, impedindo processos que ocorrem na superfície e no interior da célula dos microrganismos. Embora seja menos tóxica para células

mamíferas, a prata ainda pode causar danos quando exposta em altas concentrações ou por longos períodos (LARA, 2011).

Os resultados obtidos para viabilidade das células OSCC demonstram uma maior toxicidade para os peptídeos quando na presença da prata, entretanto, apenas para concentrações superiores a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Uma vez que os valores de concentração inibitória mínima para o crescimento de *C. albicans* obtidas para os compostos de coordenação 14 Hst5 – Ag, 14 Hst5 K11,17R – Ag e 15 Hst5 K11R – Ag variou entre 10 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, e foi apresentada uma viabilidade celular acima de 50%, é possível afirmar que os compostos de coordenação possuem uma margem de segurança para uso como agente antifúngico, em baixas concentrações ($<40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Já o composto de coordenação 15 Hst5 – Ag apresentou concentração inibitória mínima de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 de *C. albicans*, e sua viabilidade celular, conforme apresentado na figura 28, é inferior a 50% nessa concentração, de forma que este composto de coordenação não pode ser considerado seguro para uso como agente antifúngico.

A margem de segurança apresentada pelos peptídeos e compostos de coordenação reafirmam a possibilidade de uso dos compostos como agentes de tratamento de infecções causadas por *C. albicans*, principalmente nas cepas que apresentam resistência à fluconazol, ATCC 18804 e ATCC 10231, onde as moléculas apresentaram atividade antifúngica eficiente. Embora as cepas sejam suscetíveis a nistatina, o medicamento não é absorvido pelo trato gastrointestinal, além de possuir efeitos tóxicos para órgãos como rins e fígado quando muito utilizado, o que limita não apenas o tempo de tratamento, mas o tipo de infecção que pode ser tratada com o medicamento. Assim, os peptídeos e compostos de coordenação surgem como uma alternativa para casos de infecção onde os medicamentos tradicionais não são capazes de agir.

5. Conclusão

Estima-se que ocorram, anualmente, cerca de 700 mil mortes em decorrência de infecções causadas por micróbios resistentes (ROCHA, 2020), sendo o aumento da resistência à antifúngicos considerado pela OMS como uma das 10 principais ameaças à saúde pública global que a humanidade enfrenta. As infecções causadas por *Candida albicans* são relevantes nesse panorama, pois correspondem a uma parcela significativa das infecções, sendo superficiais ou sistêmicas, que apresentam taxas de morbidade e mortalidade que podem chegar a 40%. O uso de peptídeos antimicrobianos, tal como a Hst5, está sendo cada vez mais explorado como potenciais agentes para o tratamento de infecções fúngicas. Novas estratégias vêm sendo buscadas visando otimizar a atividade do peptídeo em células de *C. albicans*. No desenvolvimento desse trabalho, foram desenvolvidos peptídeos derivados de fragmentos proteolíticos da Hst5, cuja atividade antimicrobiana é mantida mesmo após a degradação, com troca de resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica, visando uma melhora na atividade. Com esse mesmo propósito, os peptídeos formados ainda foram coordenados com íons metálicos de prata(I).

A metodologia da síntese de peptídeos em fase sólida utilizada mostrou-se eficiente para obtenção dos quatro peptídeos propostos para esse trabalho, e o processo de purificação através de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a obtenção de todos os peptídeos com grau de pureza acima de 95%, tendo suas caracterizações confirmada por espectrometria de massas, indicando a obtenção adequada dos peptídeos.

A coordenação entre os peptídeos e a Ag(I) foi eficiente, como confirmado pelos estudos de caracterização dos compostos de coordenação formados, que permitiu a formulação de hipóteses acerca da estrutura formada, acreditando-se que a ligação entre o metal e os peptídeos ocorra em um resíduo de histidina, situado na parte central da estrutura dos peptídeos.

Os ensaios antimicrobianos permitiram identificar as concentrações inibitórias mínimas dos peptídeos e seus respectivos complexos frente à três cepas de *C. albicans*, correspondendo à cepa padrão, a um isolado clínico com tendência à resistência, e a uma cepa com alto grau de resistência à fármacos. A alteração de resíduos de aminoácidos na cadeia dos peptídeos estudados se mostrou eficiente, uma vez que houve uma melhora da atividade antifúngica quando comparado aos fragmentos originais. A coordenação dos peptídeos com prata(I) também demonstrou ser bastante vantajosa, apresentando menores valores de CIM do que os peptídeos isolados.

Os peptídeos e compostos de coordenação formados ainda foram analisados quanto a sua toxicidade em células humanas, de carcinoma oral. Todos os peptídeos e complexos apresentaram viabilidade celular acima de 50%, exceto o composto de coordenação 15 Hst5 – Ag, em suas concentrações inibitórias mínimas de crescimento de *C. albicans*, de modo que, com exceção ao complexo citado, todos apresentam margem de segurança para uso como tratamento para infecções fúngicas.

6. Referências

- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate medical journal**, v. 78, n. 922, p. 455-459, 2002
- BAEV, D. et al. Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 4777-4784, 2002.
- BOCHENSKA, O. et al. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 3, p. 403-410, 2016.
- BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases - estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BREWER, D.; LAJOIE, G. Evaluation of the metal binding properties of the histidine-rich antimicrobial peptides histatin 3 and 5 by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 19, p. 1736-1745, 2000.
- BROWN, A. JP. et al. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 11, p. 614-622, 2014.
- BULLOCK, C. B.; MCNABB, D. S.; PINTO, I. Whole-genome approach to understanding the mechanism of action of a histatin 5-derived peptide. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. e01698-19, 2020.
- CALDERONE, R. A.; Clancy, C. J. *Candida* and candidiasis. 2nd ed. **American Society for Microbiology Press**, 2011.
- CANNON, R. D. et al. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3211-3217, 2007.
- CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.
- CONKLIN, S. E. et al. Specific histidine residues confer histatin peptides with copper-dependent activity against *Candida albicans*. **Biochemistry**, v. 56, n. 32, p. 4244-4255, 2017.
- COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DADAR, M. et al. *Candida albicans*-biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DALLE, F. et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248-271, 2010.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 5-18, 2010.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 18, p. 1337-1347, 2005.

D'ENFERT, C. et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS microbiology reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa060, 2021.

EPSTEIN, J. B.; POLSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. **Clinical therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 40-57, 1998.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FISHER, M. C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-15, 2022.

GAIGEOT, M.-P.; MARTINEZ, M.; VUILLEUMIER, R. Infrared spectroscopy in the gas and liquid phase from first principle molecular dynamics simulations: application to small peptides. **Molecular Physics**, v. 105, n. 19-22, p. 2857-2878, 2007.

GUPTA, A. K. et al. The increasing problem of treatment-resistant fungal infections: a call for antifungal stewardship programs. **International journal of dermatology**, 2021.

GUSMAN, H. et al. Is salivary histatin 5 a metallopeptide?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1545, n. 1-2, p. 86-95, 2001.

HAMPE, I. A. I. et al. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006655, 2017.

HARFORD, C.; SARKAR, B. Amino terminal Cu (II)-and Ni (II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. **Accounts of chemical research**, v. 30, n. 3, p. 123-130, 1997.

HELMERHORST, E. J. et al. Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane

integrity excludes a Candidacidal mechanism of pore formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5643-5649, 2001.

HELMERHORST, E. J. et al. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7286-7291, 1999.

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

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

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152, 2010.

IKONOMOVA, S. P. et al. Effects of histatin 5 modifications on antifungal activity and kinetics of proteolysis. **Protein Science**, v. 29, n. 2, p. 480-493, 2020.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.

JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; STOKOWA-SOŁTYS, K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. **European journal of medicinal chemistry**, v. 143, p. 997-1009, 2018.

JOLY, V.; BOLARD, J.; YENI, P. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 9, p. 1799-1804, 1992.

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

KNETSCH, M. L. W; KOOLE, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. **Polymers**, v. 3, n. 1, p. 340-366, 2011.

KORDALEWSKA, M. et al. Antifungal Drug Susceptibility and Genetic Characterization of Fungi Recovered from COVID-19 Patients. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 552, 2021.

KUMAR, R. et al. Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transporters Dur3 and Dur31 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43748-43758, 2011.

LACOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006.

- LAI, Z. et al. Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability. **Biotechnology Advances**, p. 107962, 2022.
- LARA, H. H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2011.
- LARSON, J. L. et al. The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran®(liposomal nystatin) in rats and rabbits. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 2, p. 421-429, 2000.
- LI, C. et al. Heat shock protein 90 (Hsp90)/Histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for the treatment of azoles-resistant *Candida albicans*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 227, p. 113961, 2022.
- LI, R. et al. *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1832-1839, 2013.
- LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.
- LU, H. et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.
- LYNCH, D. P. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 78, n. 2, p. 189-193, 1994.
- LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug design, development and therapy**, p. 1161-1171, 2016.
- MATEJUK, A. et al. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. **Drugs of the Future**, v. 35, n. 3, p. 197, 2010.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MBA, I. E. et al. Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. **Infection, Genetics and Evolution**, p. 105256, 2022.
- MELINO, S. et al. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15373-15383, 2006.
- MELINO, S. et al. Zn²⁺ ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. **Biochemistry**, v. 38, n. 30, p. 9626-9633, 1999.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, July. 1963.

MESU, J. G. et al. Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment. **Vibrational spectroscopy**, v. 39, n. 1, p. 114-125, 2005.

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

MOFFA, E. B. et al. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to reconstructed human oral epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 885, 2015.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12-13, p. 963-976, 2011.

NAM, K. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. **The journal of advanced prosthodontics**, v. 3, n. 1, p. 20, 2011.

NIELEN, M. W. F. MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 18, n. 5, p. 309-344, 1999.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, n. 1, p. 15-25, 2010.

NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de mycologie medicale**, v. 22, n. 2, p. 173-178, 2012.

OPPENHEIM, F. G. et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7472-7477, 1988.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of hospital infection**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PROFT, C. S. F. Síntese, estudos estruturais e de atividades biológicas de metalopeptídeos estruturalmente derivados da toxina CcdB. 2019.

PURI, S. et al. *Candida albicans* Shed Msb2 and host mucins affect the Candidacidal activity of salivary Hst 5. **Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 752–63, 2015.

PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill?: understanding the Candidacidal mechanism of salivary histatin 5. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 958-964, 2014.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

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

ROEPSTORFF, P. MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry. **Proteomics in Functional Genomics: Protein Structure Analysis**, p. 81-97, 2000.

ROTHSTEIN, D. M. et al. Anti*Candida* activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1367-1373, 2001.

SANTOS, G. C. de O. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SEMIS, R. et al. Mechanism of activity and toxicity of Nystatin-Intralipid. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 422-431, 2013.

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276–12286, 2012.

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

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SZAFRANSKI-SCHNEIDER, E. et al. Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002501, 2012.

TATI, S. et al. Histatin 5-spermidine conjugates have enhanced fungicidal activity and efficacy as a topical therapeutic for oral candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 756–66, 2014.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.

TSAI, H.; RAJ, P. A.; BOBEK, L. A. *Candidacidal* activity of recombinant human salivary histatin-5 and variants. **Infection and immunity**, v. 64, n. 12, p. 5000-5007, 1996.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

VRIONI, G. et al. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 12, 2018.

VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006149, 2017.

WEBSTER, J.; OXLEY, D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. **Chemical Genomics and Proteomics: Reviews and Protocols**, p. 227-240, 2012.

WILSON, D.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005867, 2016.

ZAMBOM, C. R. et al. A novel antifungal system with potential for prolonged delivery of Histatin 5 to limit growth of *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1667, 2019.

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

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, 2010.

ZIPFEL, P. F. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. **Immunology letters**, v. 126, n. 1-2, p. 1-7, 2009.