

FAULLER HENRIQUE DA FONSECA

Avaliação do efeito sinérgico entre o peptídeo 0WHistatina-5 e antifúngicos comerciais na inibição do crescimento de *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido  
Coorientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

F676a Fonseca, Fauller Henrique da  
Avaliação do efeito sinérgico entre o peptídeo OWHistatina-5 e antifúngicos comerciais na inibição do crescimento de *Candida albicans*/ Fauller Henrique da Fonseca. –Araraquara : [s.n.], 2020  
64 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Saulo Santesso Garrido

Coorientador: Marlus Chorilli

1. Peptídeos. 2. Antimicóticos. 3. *Candida albicans*. 4. Terapia combinada. 5. Candidíase bucal. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação de efeito sinérgico entre o peptídeo 0WHistatina-5 e antifúngicos comerciais na inibição do crescimento de *Candida albicans*"

**AUTOR: FAULLER HENRIQUE DA FONSECA**  
**ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO**  
**COORIENTADOR: MARLUS CHORILLI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora



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



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



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

Araraquara, 25 de setembro de 2020

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Fauller Henrique da Fonseca

**Nome em citações bibliográficas:** FONSECA, F. H.; DA FONSECA, FAULLER H.; HENRIQUE DA FONSECA, FAULLER HENRIQUE DA

### ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Instituto de Química – UNESP Araraquara (IQAr – UNESP)  
Rua Prof. Francisco Degni, 55, 14800-900, Araraquara – SP, Brasil

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

**2014 – 2017**

Bacharelado em Química.  
Instituto de Química – UNESP Araraquara  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

#### Projetos de pesquisa e extensão

**2016 – 2017**

Bolsista de iniciação científica  
Instituto de Química – UNESP Araraquara  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil  
Projeto: Carbono orgânico dissolvido e aldeídos na água de chuva de Araraquara  
Orientador: Raquel Fernandes Pupo Nogueira  
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2015 – 2017**

Bolsista do Programa de Educação Tutorial – Grupo PET Química  
Instituto de Química – UNESP Araraquara  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil  
Bolsista do(a): Ministério da Educação

#### Cursos de curta duração

**2019**

Uso de Proteolipossomos para a Saúde: Uma Abordagem Nanobiotecnológica (Carga horária: 2h).  
IX Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2019**

Sistemas de Liberação de Fármacos: Tecnologias e Inovações (3h) (Carga horária: 3h).  
IX Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2018**

Nanotecnologia aplicada à saúde (Carga horária: 8h).  
48ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2018**

Química Supramolecular: Aplicações em materiais e dispositivos (Carga horária: 8h).

48ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2018**

Ação Fotodinâmica no Tratamento do Câncer e Controle Microbiológico (Carga horária: 2h).

VIII Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2018**

Química Medicinal e Metalofármacos: Estado da Arte e Perspectivas. (Carga horária: 2h).

VIII Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2017**

Química Forense (Carga horária: 8h).

47ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2017**

Perícia Criminal: Toxicologia Forense. (Carga horária: 9h).

Helix Cursos, HELIX, Cotia, Brasil

**2017**

Perícia Criminal: Biologia Forense. (Carga horária: 9h).

Helix Cursos, HELIX, Cotia, Brasil.

**2016**

Endoc 2016: Inovação no Ensino (Carga horária: 8h).

Centro de Estudos e Práticas Pedagógicas da UNESP, CENEPP, Brasil

**2016**

A Beleza Estrutural da Natureza aos Olhos dos Químicos Medicinais (Carga horária: 8h).

46ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2016**

Atividades Investigativas e Interações em Sala de Aula (Carga horária: 8h).

46ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**2015**

Técnicas Analíticas de Determinação. (Carga horária: 12h).

45ª Semana da Química, Instituto de Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

REIS ZAMBOM, CAROLINA REIS; **HENRIQUE DA FONSECA, FAULLER HENRIQUE DA**; SANTESSO GARRIDO, SAULO. Bio- and Nanotechnology as the Key for Clinical Application of Salivary Peptide Histatin: A Necessary Advance. *Microorganisms*, v.8,1024, 2020.

ZAMBOM, CAROLINA R.; **DA FONSECA, FAULLER H.**; CRUSCA, EDSON; DA SILVA, PATRÍCIA B.; PAVAN, FERNANDO R.; CHORILLI, MARLUS; GARRIDO, SAULO S. A Novel Antifungal System With Potential for Prolonged Delivery of Histatin 5 to Limit Growth of *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, v.10, a1667, 2019.

### **Apresentação de trabalhos**

**FONSECA, F. H.**; ZAMBOM, C. R.; MARCHETTO, R.; CHORILLI, M.; GARRIDO, S. S. Evaluation of the Synergy Effect Between the Peptide 0WHistatin-5 and the Antifungals Nystatin and Fluconazole against *Candida albicans*. 48ª Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular; Águas de Lindoia – SP, 2019.

**FONSECA, F. H.**; ZAMBOM, C. R.; CHORILLI, M.; GARRIDO, S. S. Síntese do peptídeo 0WHistatina-5 e avaliação de seu efeito sinérgico com antifúngicos convencionais na inibição do crescimento de *Candida albicans* pelo ensaio *checkerboard*, 2019. IX Congresso Farmacêutico da UNESP; Araraquara – SP, 2019.

NALIATTO, N.; **FONSECA, F. H.**; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. Metalopeptídeos derivados da Histatina 5 como alternativa para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*. XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP - 1ª Fase; Araraquara – SP, 2019.

MONTEIRO, A. R.; **FONSECA, F. H.**; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. Síntese e caracterização de peptídeos antifúngicos derivados da Histatina-5 para o tratamento de candidíase bucal. XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP - 1ª Fase; Araraquara – SP, 2019.

**FONSECA, F. H.**; NOGUEIRA, R. F. P.; CAMPOS, M. L. A. M.; SILVA, D. G.; MELLO, I. N. P. D. Aldeídos e carbono orgânico dissolvido na água de chuva de Araraquara: fontes de emissão e análise de sazonalidade. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 2ª Fase; Bauru – SP, 2017.

**FONSECA, F. H.**; NOGUEIRA, R. F. P.; CAMPOS, M. L. A. M.; SILVA, D. G.; MELLO, I. N. P. D. Aldeídos e carbono orgânico dissolvido na água de chuva de Araraquara: fontes de emissão e análise de sazonalidade. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 1ª Fase; Araraquara – SP, 2017.

**FONSECA, F. H.; SILVA, D. G.; CAMPOS, M. L. A. M.; NOGUEIRA, R. F. P.** Carbono orgânico dissolvido na água de chuva de Araraquara: fontes e sazonalidade. VIII Encontro Nacional de Química Ambiental; Curitiba – PR, 2017.

**FONSECA, F. H.; NOGUEIRA, R. F. P.; CAMPOS, M. L. A. M.; SILVA, D. G.** Determinação de carbono orgânico dissolvido em água de chuva e estudo do armazenamento de amostras. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 2ª Fase; Bauru – SP, 2016.

#### **Participação em eventos científicos**

**48ª Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2019.**

**IX Congresso Farmacêutico da UNESP, 2019.**

**2ª Escola de Modelagem Molecular da UNESP, 2019.**

**VIII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2019.**

**1ª Escola de Verão em Química, 2018.**

**IX Encontro dos PET Química do estado de São Paulo, 2017.**

**Pré-Sudeste 2017, 2017.**

**SudestePET 2017, 2017.**

**VIII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2017.**

**V Para Pensar o PET, 2016.**

**IV Para Pensar o PET, 2015.**

**VII Encontro dos PET Química do Estado de São Paulo, 2015.**

**XV Sudeste PET, 2015.**

**III Para Pensar o PET, 2014.**

**VI Encontro dos PET Química do Estado de São Paulo, 2014.**

*Dedico este trabalho primeiramente à minha avó Mirtes (in memoriam)*

*Dedico também aos meus pais, Neusa e Lázaro, por todo o apoio*

*Dedico, finalmente, a todos aqueles que contribuíram,*

*de alguma forma, para que eu chegasse até aqui.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À minha avó Mirtes, por todo o amor e ensinamento, que direta ou indiretamente, me permitiram chegar até aqui. Te levo sempre comigo.*

*Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo esforço que foram essenciais para meu crescimento enquanto pessoa e para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos, um passo de cada vez. Devo tudo a vocês.*

*Amo vocês!*

*Aos meus familiares, principalmente minha irmã Alessandra e minha sobrinha Thayna, pelo carinho, apoio e incentivo durante a jornada.*

*Ao Professor Saulo Santesso Garrido, meu orientador, pela excepcional orientação e por ser um exemplo não apenas de profissional, mas também de pessoa. Obrigado pela oportunidade de ser seu orientado e por todo o crescimento que isso me permitiu! Vamos em frente!*

*Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, coorientador deste trabalho, que sempre foi muito atencioso e esteve muito disposto a ajudar com o que fosse necessário.*

*Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pelas contribuições na qualificação que possibilitaram o aprimoramento deste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado nas conversas durante o café na “salinha”.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Pavan por toda a contribuição na qualificação que possibilitou o desenvolvimento final deste trabalho e por aceitar ser parte da banca de defesa deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente por aceitar compor a banca avaliadora da defesa deste trabalho.*

*Ao Crusca, por todo o auxílio prestado nos experimentos ao longo deste projeto.*

*À Carol, por toda a contribuição ao longo de todo o trabalho, mas principalmente nos meus primeiros passos como mestrando. Aprendi e aprendo muito com você!*

*Aos amigos do laboratório: Aderson, Alessandro, Beatriz, Bianca, Carol, Daniela, Flávia, Gabriela, Gregório, Jéssica, Jonatas, Lorrane, Naiara, Nathalia e Zaida. Obrigado pelas risadas, pelas discussões de dados, pelas oportunidades de aprender e ensinar que cada um de vocês me proporcionou, seja no âmbito acadêmico ou pessoal. O caminho não teria sido o mesmo sem vocês.*

*Aos amigos que o IQ me proporcionou ao longo de todos esses anos: Amanda, Beatriz Campanhol, David, Karla, Luana, Paulo e tantos outros com quem dividi momentos. Agradeço a todos pelos momentos compartilhados, pelos desabafos e pelo carinho de cada um de vocês.*

*Àqueles que me ajudaram a não vacilar e sempre me lembraram do meu potencial nessa reta final: Carol, David, Filipe, Gabriela, Letícia, Naiara, Nathalia e William. Cada palavra de vocês me ajudou e me impulsionou a dar o meu melhor. Muito obrigado!*

*À pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, e todos os funcionários e funcionárias da Seção Técnica de Pós-graduação, pela atenção, cuidado e incrível trabalho dispensados a cada um dos alunos.*

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

*Finalmente, a todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido.*

“A journey is a gift. Something to offer at the door to the rooms of your mind.  
This is how we journey, far, and can still always find something like home.  
[...] Follow your light. Or lose it.”

(BEYONCÉ, Black Is King, 2020)

“Não devemos acreditar nos muitos que dizem que só as pessoas livres devem ser educadas, deveríamos acreditar nos filósofos que dizem que apenas as pessoas educadas são livres.”

(EPICTETO, filósofo romano e ex-escravo)

## RESUMO

*Candida albicans* é uma espécie que geralmente se apresenta como um fungo comensal presente na microbiota humana, que pode se desenvolver como patógeno oportunista e causar infecções, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Frente ao surgimento de resistência a antifúngicos a busca por novas alternativas terapêuticas se torna necessária. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos, como a Histatina-5 presente na saliva, se mostram como potenciais candidatos para o combate de infecções fúngicas. Além disso, as terapias combinatórias se demonstram uma opção valiosa no tratamento dessas infecções, principalmente daquelas causadas por cepas resistentes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de sinergismo pela combinação do peptídeo 0WHistatina-5 (0WHst5) e os fármacos fluconazol (Flu) e nistatina (Nys) na inibição do crescimento de *C. albicans*. O peptídeo foi obtido pela síntese de peptídeos em fase sólida, purificado por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizado por espectrometria de massas. A concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo e dos fármacos para as cepas *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* ATCC 10231 foi determinada pelo método da microdiluição em caldo. O ensaio *checkerboard* foi utilizado para avaliar a inibição do crescimento de *C. albicans* ATCC 90028 pela combinação de diferentes concentrações de 0WHst5 e dos fármacos. Por fim, realizou-se o ensaio *time-kill*, a fim de observar o perfil temporal de ação das combinações e determinar qual combinação possuía maior potencial terapêutico. O processo de síntese e purificação foi bem-sucedido e a espectrometria de massas confirmou a identidade do peptídeo. A CIM do peptídeo foi de 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para as três cepas testadas; para Nys, a CIM foi 2,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para *C. albicans* ATCC 18804 e 4,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para as demais; para Flu, a CIM foi 13  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a cepa *C. albicans* ATCC 90028 e  $>400 \mu\text{mol L}^{-1}$  para as demais. Os dados do ensaio *checkerboard* foram analisados na plataforma SynergyFinder e foi observado um valor indicativo de sinergismo para a combinação 0WHst5/Flu por todos os modelos aplicados, enquanto para a combinação 0WHst5/Nys se obteve um valor indicativo de aditividade ou antagonismo a depender do modelo aplicado. O ensaio *time-kill* permitiu a visualização dos efeitos de inibição de algumas das combinações e principalmente uma comparação com a ação individual do peptídeo e dos fármacos. Para as três cepas testadas observou-se uma diferença bastante significativa entre a ação individual do Flu e a ação da combinação 0WHst5/Flu, tanto ao final, quanto ao longo do ensaio. Para a combinação com Nys também observou-se melhores perfis temporais para a associação, porém as mudanças em relação ao perfil individual foram menos acentuadas, o que já era esperado pelos resultados obtidos no ensaio *checkerboard*. Desta forma, este trabalho mostrou que a associação do peptídeo 0WHistatina-5 a fármacos convencionais pode representar uma alternativa para o combate e inibição de infecções causada por *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Histatina-5. *Candida albicans*. Sinergismo. Fluconazol. Nistatina.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is a species that is usually a commensal fungus present in the human microbiota, which can develop as an opportunistic pathogen and cause infections, especially in immunocompromised patients. Taking into account the emergence of resistance to antifungals, such as fluconazole, the search for new therapeutic alternatives is necessary. In this context, antimicrobial peptides, such as Histatin-5 from human saliva, become potential candidates for combating fungal infections. In addition, combinatorial therapies are also a valuable option in the treatment of these infections, especially those caused by resistant strains. The aim of this work was to evaluate the occurrence of synergism by combination of the peptide 0WHistatin-5 (0WHst5) and the drugs fluconazole (Flu) and nystatin (Nys) to inhibit the growth of *C. albicans*. The peptide was obtained by solid phase peptide synthesis, purified by high performance liquid chromatography and characterized by mass spectrometry. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptide and drugs for the strains *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 18804 and *C. albicans* ATCC 10231 was determined by broth microdilution method. The checkerboard assay was used to assess the inhibition of *C. albicans* ATCC 90028 growth by combining different concentrations of 0WHst5 and the drugs. Finally, the time-kill assay was carried out in order to observe the action of the combinations timewise and determine which combination had the greatest therapeutic potential. The synthesis and purification processes were successful and mass spectrometry confirmed the identity of the peptide. The MIC of the peptide was 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for the three tested strains; for Nys, the MIC was 2,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for *C. albicans* ATCC 18804 and 4,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for the other two; for Flu, the MIC was 13  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for the strain *C. albicans* ATCC 90028 and >400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for the other two. Data from checkerboard assay were analyzed using SynergyFinder platform and synergism was suggested for the 0WHst5/Flu combination for all applied models, while for the 0WHst5/Nys combination the values suggested additivity or antagonism depending on the model applied. The time-kill assay allowed a better visualization of the inhibition effects of some of the combinations and a comparison with the individual action of the peptide and the drugs. For the three strains tested, a very significant difference was observed between the individual action of Flu and the action of the 0WHst5/Flu combination. For combination with Nys, better time profiles were also observed for the association, but the changes in comparison to the individual profile were smaller than the ones observed for Flu, which was already expected due to the results obtained in the checkerboard assay. Thus, this work showed that the association of the peptide 0WHistatina-5 with conventional drugs may have potential as an alternative to combat and inhibit infections caused by *C. albicans*.

**Keywords:** Histatin-5. *Candida albicans*. Synergism. Fluconazole. Nystatin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida.....	33
Figura 2: Esquema da microplaca montada para o teste de susceptibilidade.....	35
Figura 3: Conversão da resazurina à resofurina por células viáveis.....	36
Figura 4: Esquema da microplaca montada para o ensaio checkerboard.....	37
Figura 5: Cromatogramas obtidos para o peptídeo 0WHistatina-5.....	39
Figura 6: Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 puro.....	41
Figura 7: Matrizes de inibição média obtidas no ensaio <i>checkerboard</i> .....	43
Figura 8: Mapa de contorno obtido pelo modelo ZIP.....	45
Figura 9: Resultados do ensaio time-kill para <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	46
Figura 10: Comparação das combinações para <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	47
Figura 11: Resultados do ensaio time-kill para <i>C. albicans</i> ATCC 18804.....	48
Figura 12: Comparação das combinações para <i>C. albicans</i> ATCC 18804.....	49
Figura 13: Resultados do ensaio time-kill para <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	50
Figura 14: Comparação as combinações para <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	51
Figura 15: Estruturas moleculares dos fármacos e sequência da 0WHistatina-5.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura primária dos peptídeos Histatina-1, Histatina-3 e Histatina-5.....	24
Tabela 2: Sequência primária dos peptídeos Histatina-5 e 0WHistatina-5.....	32
Tabela 3: Condições utilizadas na purificação do peptídeo 0WHistatina 5.....	34
Tabela 4: Razões m/Z esperadas para o peptídeo 0WHistatina-5.....	40
Tabela 5: Concentração inibitória mínima frente a <i>C. albicans</i> .....	42
Tabela 6: Pontuação média calculada para as combinações peptídeo/fármaco.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### **Aminoácidos**

**Ala (A)** – Alanina

**Arg (R)** – Arginina

**Asn (N)** – Asparagina

**Asp (D)** – Ácido Aspártico

**Cys (C)** – Cisteína

**Gln (Q)** – Glutamina

**Glu (E)** – Ácido Glutâmico

**Gly (G)** – Glicina

**His (H)** – Histidina

**Ile (I)** – Isoleucina

**Leu (L)** – Leucina

**Lys (K)** – Lisina

**Met (M)** – Metionina

**Phe (F)** – Fenilalanina

**Pro (P)** – Prolina

**Ser (S)** – Serina

**Thr (T)** – Treonina

**Trp (W)** – Triptofano

**Tyr (Y)** – Tirosina

**Val (V)** – Valina

## **Outros**

**0WHst5** – 0WHistatina-5

**ADP** – Adenosina difosfato

**Als** – Proteínas de sequência tipo-aglutinina

**AMP** – Adenosina monofosfato

**AMPs** – Peptídeos antimicrobianos

**ATP** – Adenosina trifosfato

**CIF** – Concentração inibitória fracionária

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**Cu<sup>2+</sup>** – Íon cobre (II)

**DIC** – N,N'-diisopropilcarbodiimida

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DO** – Densidade ótica

**ESI-MS** – *Electrospray ionization-Mass spectrometry*

**Flu** – Fluconazol

**Fmoc** – 9-Fluorenilmetiloxycarbonil

**Fmoc-aa** – Fmoc-aminoácido

**H<sup>+</sup>** – próton

**HOBt** – N-Hidroxibenzotriazol

**HSA** – *Highest Single Agent*

**Hst5** – Histatina-5

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**K<sup>+</sup>** – Íon potássio

**Mg<sup>2+</sup>** – Íon magnésio

**m/Z** – Razão massa/carga

**NAD<sup>+</sup>** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**Ni<sup>2+</sup>** – Íon níquel (II)

**Nys** – Nistatina

**t-Bu** – *terc*-butil

**UFC** – Unidade formadora de colônia

**ZIP** – *Zero Interaction Potency*

**Zn<sup>2+</sup>** – Íon zinco (II)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 O gênero <i>Candida</i>: características e fatores de virulência.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Peptídeos antimicrobianos e família das histatinas.....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Síntese de peptídeos em fase sólida.....	26
<b>1.3 Terapias combinatórias no combate à resistência antimicrobiana.....</b>	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 0WHistatina-5.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Ensaio de atividade antimicrobiana.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Preparação dos inóculos.....	34
3.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	35
3.2.3 Ensaio <i>checkerboard</i> para avaliação de efeito sinérgico.....	36
3.2.4 Ensaio <i>time-kill</i> para identificação da melhor combinação.....	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 0WHistatina-5.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Ensaio de atividade antimicrobiana.....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	42
4.2.2 Ensaio <i>checkerboard</i> para avaliação de efeito sinérgico.....	43
4.2.3 Ensaio <i>time-kill</i> para identificação da melhor combinação.....	45
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 O gênero *Candida*: características e fatores de virulência

O gênero *Candida* abrange em torno de 200 espécies de fungos que se apresentam majoritariamente na forma de leveduras unicelulares, com algumas espécies dimórficas, com capacidade de se desenvolver na forma de células alongadas, denominadas pseudo-hifas (CALDERONE; CLANCY, 2011). Dentre as espécies patogênicas, destacam-se *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, sendo a primeira a mais recorrentemente isolada de pacientes com infecções superficiais ou invasivas (BERKOW; LOCKHART, 2017).

*C. albicans* se apresenta como um fungo comensal presente naturalmente na microbiota dos tratos gastrointestinal, respiratório e geniturinário humano. O estado comensal é mantido por fatores como barreiras epiteliais intactas, respostas do sistema imune do hospedeiro e interação com demais microrganismos presentes na microbiota humana (CALDERONE; CLANCY, 2011; VILA et al., 2019). Portanto, os fatores de risco para infecções causadas por essa espécie incluem: situações que possibilitem a invasão tecidual pelo fungo, como procedimentos cirúrgicos, hemodiálise, uso de cateter ou ventilação mecânica; alterações no sistema imune do hospedeiro, devido à idade, desnutrição, infecção por HIV, utilização de quimioterapia; e situações que promovam a colonização pelo fungo, como alta disponibilidade nutricional ou uso de antibiótico de amplo espectro (PFALLER; DIEKEMA, 2007; CANELA et al., 2018; DADAR et al., 2018). Logo, a associação de alguns desses fatores pode promover o desenvolvimento dessa espécie como um patógeno oportunista, que pode causar desde infecções superficiais até infecções sistêmicas que podem levar à morte (VILA et al., 2020). Uma dessas infecções é a candidíase, uma infecção fúngica comum na pele, cavidade oral, esôfago, trato gastrointestinal, trato geniturinário e sistema vascular dos seres humanos (BERKOW; LOCKHART, 2017). A candidíase oral é uma das infecções mais recorrentes em pacientes imunodeprimidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV, na sigla em inglês) e pode também acometer recém-nascidos, pessoas idosas e usuários de próteses dentárias (PATIL et al., 2018)

Os fatores de virulência de *C. albicans* são inúmeros. Um dos mais relevantes é seu dimorfismo, que possibilita a transição de células leveduriformes para células alongadas, denominadas pseudo-hifas, o que potencializa a virulência do micro-organismo ao

favorecer a invasão de tecidos, o aumento da adesão celular, a resistência à fagocitose e a formação de biofilmes (VERMA-GAUR; TRAVEN, 2016). Além disso, as proteínas denominadas adesinas permitem a fixação do micro-organismo ao tecido epitelial do hospedeiro e também a superfícies abióticas, como catéteres ou dentaduras. As proteínas de sequência tipo-aglutinina Als5p e Als3, presentes na parede celular de *C. albicans*, estão relacionadas à capacidade de adesão das leveduras e das pseudo-hifas, respectivamente, às superfícies anteriormente citadas e também têm um importante papel na interação entre células de *C. albicans* (GAUR; SMITH; KLOTZ, 2002; MURCIANO et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015; XU et al., 2017). Após a adesão ao epitélio do hospedeiro, *C. albicans* dá início ao processo de invasão tecidual, que pode ocorrer por duas vias. A primeira é a endocitose induzida, que é mediada pelas células do hospedeiro ao reconhecer proteínas de superfície da célula fúngica (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; SWIDERGALL; FILLER, 2017). A segunda via é a penetração ativa realizada pelas células de *C. albicans* por meio da alongação das pseudo-hifas e pela secreção de enzimas e peptídeos com ações hidro e citolítica como as aspartil-proteinases (SAPs) e o peptídeo candidalisina (WÄCHTLER et al., 2012; ALLERT et al., 2018). Outro fator de virulência bastante relevante nas infecções envolvendo *C. albicans* é a capacidade deste micro-organismo de formar biofilmes, que são comunidades microbianas associadas a superfícies bióticas ou abióticas. Comparados à forma planctônica, micro-organismos associados a biofilmes mostram expressão elevada de alguns dos fatores de virulência citados anteriormente, além de apresentar menor susceptibilidade à fagocitose e alterações na expressão de fatores de resistência a antifúngicos, como bombas de efluxo (JABRA-RIZK et al., 2016; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Quanto aos mecanismos de defesa do hospedeiro, tem-se primeiramente as células epiteliais que agem como uma barreira física à aderência e invasão de *C. albicans*. Além disso, a saliva também é um fator de grande importância no controle de *C. albicans*, seja através de remoção mecânica ou pela ação de proteínas e peptídeos com ação antimicrobiana presentes em sua composição, como as histatinas, defensinas, catelicidinas e lactoferrinas (NAGLIK et al., 2017; SULTAN et al., 2018). O peptídeo Histatina-5, foco desse trabalho, faz parte da família das histatinas que será melhor descrita adiante. As defensinas produzidas por células epiteliais são classificadas como  $\beta$ -defensinas e são peptídeos ricos em cisteína. A catelicidina humana LL-37 é responsável por impedir a adesão das células fúngicas às células do hospedeiro, além de induzir a produção de quimiocinas, implicadas nos processos de recrutamento de células do sistema

imune, Por fim, a lactoferrina foi descrita como uma proteína capaz de romper a membrana plasmática da célula do fungo, além de afetar o metabolismo do ferro (KIRKPATRICK et al., 1971; NIKAWA et al., 1993; DIAMOND; RYAN, 2011; TSAI et al., 2011). A imunidade adquirida é mediada pelos linfócitos Th1 e Th17, sendo que o segundo é sugerido como responsável pela imunidade a longo prazo contra infecções da mucosa por *C. albicans* (LIN et al., 2009; HERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2013; KRAGELUND, 2017).

Em relação às estratégias terapêuticas para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, tem-se disponíveis os fármacos das classes dos azóis, dos polienos e das equinocandinas (ARENDRUP, 2013; PERFECT, 2017; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). A primeira classe age pela inibição da enzima 14- $\alpha$  demetilase, envolvida na via biossintética do ergosterol, um importante componente da membrana celular da célula fúngica. O mecanismo de ação primário dos polienos também está associado ao ergosterol: estes fármacos possuem a capacidade de se ligar ao ergosterol, de forma a lisar a membrana celular e permitir o extravasamento do conteúdo citoplasmático. Por fim, as equinocandinas agem pela inibição da enzima glucana sintase, parte do complexo proteico envolvido na síntese das  $\beta$ -1,3-glucanas presentes na parede celular de *C. albicans* e outros fungos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Para o tratamento de infecções da mucosa por *C. albicans*, são utilizados fármacos das duas primeiras classes (ARENDRUP, 2013; PERFECT, 2017; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

O tratamento de um quadro de candidíase oral geralmente tem duração entre 7 e 14 dias e a administração do fármaco pode se dar por via oral ou tópica. Preparações tópicas comuns são aquelas contendo antifúngicos azóis, como miconazol e clotrimazol. Os polienos nistatina e anfotericina-B também podem ser aplicados topicamente, porém são pouco tolerados pelos pacientes e são utilizados em casos de infecção resistente aos azóis. A administração tópica tem a vantagem de diminuir os efeitos colaterais e a possibilidade de interação com outros fármacos (CALDERONE; CLANCY, 2011; GARCIA-CUESTA; SARRION-PÉREZ; BAGÁN, 2014). No entanto, medicamentos de aplicação tópica, especialmente para tratamento de doenças orais, estão sujeitos à ação diluente da saliva e à movimentação da língua e da musculatura presente na cavidade interna da boca, o que produz doses subterapêuticas e torna o tratamento menos efetivo. O tratamento sistêmico com fluconazol por via oral também se mostra eficiente no combate à candidíase oral, entretanto foi observada resistência ao tratamento em pacientes que passaram por longos períodos de exposição ao fármaco e em pacientes infectados com

HIV (CALDERONE; CLANCY, 2011). A maior taxa de resistência é observada para os azóis e para as equinocandinas. Para fluconazol, as maiores taxas observadas são para *C. krusei*, que é intrinsecamente resistente; *C. glabrata*, com taxas aproximadas de 13%; e para *Candida auris*, que tem ganhado bastante atenção devido às taxas de resistência a fluconazol próximas de 93% e ao aparecimento de cepas multirresistentes (PFALLER et al., 2008; CLEVELAND et al., 2012; LOCKHART et al., 2017). O aparecimento de espécies e cepas resistentes aos tratamentos convencionais surge como consequência do uso frequente de antifúngicos em tratamentos profiláticos e terapêuticos, tanto de humanos, quanto na pecuária; além da aplicação nas indústrias agrícola, madeireira e têxtil (VINCENT et al., 2013; PARKER et al., 2014; REVIE et al., 2018). Os mecanismos de resistência são diversos. Em algumas situações, podem ocorrer substituições de aminoácidos nos alvos moleculares dos fármacos, o que diminui a afinidade ou evita a ligação do fármaco ao alvo, como já foi observado para as enzimas glucana sintase e 14- $\alpha$  demetilase, alvos das equinocandinas e dos azóis, respectivamente (SANGLARD et al., 1998; PARK et al., 2005; WARRILOW et al., 2010). A resistência a fluconazol também já foi observada em espécies do gênero *Candida* capazes de superexpressar o gene ERG11, codificador da enzima 14- $\alpha$  demetilase. Além disso, resistência cruzada a azóis e polienos foi relatada em cepas de *C. albicans* que não expressavam o gene ERG3, gene que codifica a enzima esterol  $\Delta^{5,6}$ -dessaturase envolvida na biossíntese do ergosterol. Sem a expressão do gene, o ergosterol é substituído por outros lipídeos na membrana celular e não ocorre a acumulação de esteróis metilados tóxicos para a célula fúngica (MARTEL et al., 2010; SINGH-BABAK et al., 2012; COWEN et al., 2015; BERKOW; LOCKHART, 2017). Por fim, as bombas de efluxo de fármacos, que impedem o acúmulo do fármaco no interior da célula fúngica, são mecanismos bastante recorrentes em espécies e cepas resistentes a azóis. Três bombas de efluxo já foram observadas e identificadas em micro-organismos do gênero *Candida* resistentes a fluconazol (PAO; PAULSEN; SAIER, 1998; WIRSCHING; MICHEL; MORSCHHÄUSER, 2000; PRASAD; GOFFEAU, 2012).

Embora existam alternativas quando se identifica resistência ao tratamento sistêmico com fluconazol, como outros azóis ou administração intravenosa de AmB, o desenvolvimento de resistência microbiana se torna um problema a ser enfrentado. Por esse motivo, a busca por novas opções de tratamento e, inclusive, por novos fármacos, está em constante desenvolvimento, principalmente na área da biotecnologia.

## 1.2 Peptídeos antimicrobianos e família das histatinas

Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, da sigla em inglês) se mostram como uma alternativa promissora para o futuro desenvolvimento de novos fármacos que combatam infecções fúngicas, como a candidíase oral, uma vez que possuem uma vasta gama de ação e baixo potencial para desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos (SHAGAGHI et al., 2018). AMPs são compostos, no geral, por menos de 100 resíduos de aminoácidos, são catiônicos em sua maioria, anfipáticos e apresentam uma grande variedade de estruturas primária e secundária (SHAGAGHI et al., 2018). Estas moléculas são parte importante da imunidade inata do organismo humano e, além disso, podem possuir outras funções, como sinalização celular, ações antitumoral e contraceptiva e modulação imunológica (SHAGAGHI et al., 2018; OSHIRO et al., 2019).

Exemplos de AMPs são os peptídeos que fazem parte da família das histatinas. Esse grupo de peptídeos ricos em resíduos de histidina foi primeiramente descrito por Oppenheim e colaboradores (OPPENHEIM et al., 1988). São peptídeos encontrados na saliva humana, secretados pelas glândulas parótida e submandibular e que agem como a principal fonte de ação antimicrobiana da saliva (OPPENHEIM et al., 1988; CALDERONE; CLANCY, 2011). Além disso, a família das histatinas auxilia na manutenção da homeostase oral, na ligação de alguns íons metálicos, na re-epitelização oral e na formação da película que recobre os dentes e tecidos moles da cavidade oral (BAEV et al., 2002; HELMERHORST et al., 2006; KHURSHID et al., 2017). Os peptídeos da família das histatinas apresentam ação contra uma vasta gama de micro-organismos, como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, algumas espécies do gênero *Leishmania* e algumas espécies do gênero *Candida*, incluindo cepas resistentes a fluconazol e AmB. As histatinas majoritárias na saliva humana são as histatinas 1, 3 e 5, cujas estruturas primárias são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Estrutura primária dos peptídeos Histatina-1, Histatina-3 e Histatina-5.

<b>Histatina-1</b>	<sup>1</sup> DpSHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPFYGDYGSNYLYDN <sup>38</sup>
<b>Histatina-3</b>	<sup>1</sup> DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN <sup>32</sup>
<b>Histatina-5</b>	<sup>1</sup> DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY <sup>24</sup>

Fonte: elaborado pelo autor

A Histatina-5 (Hst5) é um peptídeo composto por 24 resíduos de aminoácidos e proveniente da clivagem enzimática da ligação peptídica entre o 24º e 25º resíduo de aminoácido do peptídeo Histatin-3, que possui 32 resíduos de aminoácidos (WIESNER; VILCINSKAS, 2010; CALDERONE; CLANCY, 2011). Esse peptídeo apresenta elevada atividade antifúngica, principalmente contra espécies do gênero *Candida*, além de demonstrar ação fungicida contra biofilmes de *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que *C. albicans* apresenta susceptibilidade à ação da Histatina-5 em doses de 25 a 800 µg mL<sup>-1</sup>. Moffa e colaboradores também mostraram a capacidade desse peptídeo em inibir a adesão de *C. albicans* a superfícies abióticas e a epitélio reconstruído (MOFFA et al., 2015). A importância desse peptídeo para o controle da homeostase e controle da proliferação de *C. albicans* na cavidade bucal se torna clara quando observamos alguns dados, como os maiores níveis de IgA *Candida*-específica observados no organismo de pacientes que apresentam menores níveis de Histatina-5 na saliva e, portanto, são mais suscetíveis à colonização e invasão tecidual por *C. albicans* (KHAN et al., 2013).

A Histatina-5 possui massa molecular de 3222,5 Da, positivamente carregada em pH fisiológico e que assume diferentes estruturas secundárias dependendo do ambiente químico em que se encontra: estrutura randômica em solução aquosa ou estrutura em  $\alpha$ -hélice, quando em dimetilsulfóxido ou trifluoretanol/água (OPPENHEIM et al., 1988; SEO et al., 2012). Os mecanismos de ação da Hst5 já foram bastante estudados e envolvem alvos intracelulares. A parede celular dos fungos, inclusive do gênero *Candida*, é composta basicamente por  $\beta$ -glucanas, quitina e proteínas glicosiladas, como as proteínas Ssa1 e Ssa2 (SUN et al., 2008). A captação de Hst5 pelas células de *C. albicans* tem início com a interação, possivelmente eletrostática, entre o peptídeo e as  $\beta$ -glucanas e proteínas acima citadas. Após essa interação, a Hst5 é transportada para o interior da célula através dos transportadores de poliaminas, Dur3 e Dur31, localizados na membrana plasmática. Tal processo é possível graças à característica catiônica desse peptídeo (WOONG et al., 2008; JANG et al., 2010).

Na célula, a Hst5 promove o efluxo, para o meio extracelular, de espécies importantes para o metabolismo celular, como ATP (BAEV et al., 2002; HELMERHORST et al., 2006; CALDERONE; CLANCY, 2011; KHURSHID et al., 2017). O efluxo de ATP ocorre, principalmente, pela interação da Hst5 positivamente carregada com os lipídeos negativamente carregados presentes na membrana externa da mitocôndria. Alguns dados também sugeriram que a interação do peptídeo com a mitocôndria também leva à

formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (HELMERHORST; TROXLER; OPPENHEIM, 2001), que devido à alta reatividade causam danos à membrana e ao DNA do organismo, o que auxilia no processo de morte celular. Porém, este mecanismo ainda necessita mais atenção, uma vez que outros trabalhos não observaram a formação de espécies oxidantes (WUNDER et al., 2004). Outras espécies, como NAD<sup>+</sup>, AMP, ADP, íons K<sup>+</sup> e íons Mg<sup>2+</sup> são lançadas para o meio extracelular, o que causa um estresse osmótico que leva à diminuição irreversível do volume da célula e consequente parada do ciclo celular (HELMERHORST et al., 1999; BAEV et al., 2002). Alguns estudos também sugerem uma possível relação entre a habilidade da Histatina-5 de se ligar a metais. Sítios de ligação para Cu<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup>, assim como para Zn<sup>2+</sup> foram observados e estão destacados em vermelho e azul, respectivamente, na Tabela 1 (GROGAN et al., 2001; GUSMAN et al., 2001; PURI; EDGERTON, 2014). Estudos reportaram geração de espécies oxidantes e também aumento no potencial antifúngico pela associação do peptídeo com íons de Cu<sup>2+</sup> (TAY et al., 2009; MELINO et al., 2014; CONKLIN et al., 2017). Outra importante atividade relatada para esse peptídeo, é a capacidade de inibir cepas de *C. auris*, espécie anteriormente citada devido à característica de multi-resistência a antifúngicos (PATHIRANA et al., 2018).

Alguns mecanismos de evasão e resistência à Histatina-5 já foram descritos em *C. albicans* e outras espécies do gênero. A baixa susceptibilidade de *C. glabrata* a esse peptídeo, por exemplo, foi relacionada a uma menor variedade de transportadores Dur, responsáveis pela internalização do peptídeo. Foi observado uma maior susceptibilidade em mutantes que expressavam transportadores Dur3 e Dur31 de *C. albicans* (TATI et al., 2013). Meiller e colaboradores (MEILLER et al., 2009) observaram uma relação inversa entre o potencial antifúngico do peptídeo e a densidade de células de *C. albicans* em um experimento *in vitro*, fato relacionado à degradação do peptídeo pela enzima Sap9p, uma das aspartil-proteases expressas pelo fungo. Outra proteína que impede a ação antifúngica desse peptídeo é Msb2p, uma proteína de membrana com capacidade de degradar não apenas Histatina-5, mas também anticorpos envolvidos no controle de *C. albicans* (SWIDERGALL; ERNST; ERNST, 2013; PURI et al., 2015). Por fim, mutações em transportadores de efluxo de poliaminas, como Flu1, causadas pela frequente exposição a fluconazol, foram reportadas como capazes de diminuir o acúmulo de Histatina-5 no interior da célula fúngica (LI et al., 2013; HAMPE et al., 2017).

### 1.2.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

Os estudos físico-químicos, bioquímicos e biológicos necessários quando se visa à aplicação de um peptídeo como a Histatina-5 exigem quantidades relativamente grandes do material, que podem ser obtidas pela síntese química de peptídeos em fase sólida (MERRIFIELD, 1963). Nessa técnica, a cadeia peptídica se forma ligada covalentemente a uma resina insolúvel nos solventes utilizados durante o processo de síntese. A estratégia de síntese é determinada de acordo com os grupos protetores dos grupamento  $\alpha$ -amino e das cadeias laterais reativas dos aminoácidos. O objetivo dos grupos protetores é direcionar a formação da ligação peptídica e evitar a ocorrência de reações colaterais. A estratégia Fmoc/t-Bu é classificada como ortogonal e utiliza o grupo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc), lábil em condições básicas, como grupo protetor do grupamento  $\alpha$ -amino e grupos terc-butil (t-Bu), lábeis em condição ácida, como protetores das cadeias laterais (AMBLARD et al., 2006).

A formação da ligação peptídica ocorre pela utilização de agentes acopladores, entre eles as carbodiimidias, como a N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e o hidroxibenzotriazol (HOBt). Esses agentes se ligam covalentemente ao grupo  $\alpha$ -carboxílico, o que ativa o carbono carbonílico e gera uma espécie mais suscetível ao ataque nucleofílico pelo grupo  $\alpha$ -amino de um segundo aminoácido. Uma vez que a ligação amídica é formada, procede-se a retirada do grupo Fmoc por tratamento com uma base orgânica (JARADAT, 2018).

Ao final da síntese, é realizado o procedimento de clivagem, no qual é utilizado ácido trifluoracético, responsável por clivar a ligação covalente existente entre a cadeia peptídica e a resina (suporte sólido) e também pela remoção dos grupos protetores de cadeias laterais dos aminoácidos que possuem cadeias laterais reativas. Durante a clivagem são utilizados ainda, agentes como triisopropilsilano e etanoditiol, os quais atuam como sequestrantes dos grupos protetores liberados durante a clivagem (LLOYD-WILLIAMS; ALBERICIO; GIRALT, 2020).

### **1.3 Terapias combinatórias no combate à resistência antimicrobiana**

Uma outra estratégia que possui potencial no combate ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana são as terapias combinatórias, nas quais são administrados dois ou mais fármacos que possuam ação contra o micro-organismo alvo (CUI et al., 2015) (CUI et al., 2015). A prática de associação de fármacos é uma realidade desde o início da era dos antibióticos e, além de diminuir o surgimento de mecanismos de resistência por parte dos micro-organismos, as terapias combinatórias têm a vantagem de

permitir a diminuição da dose de administração dos fármacos sem alteração da atividade antimicrobiana e, como consequência, promover a redução dos efeitos toxicológicos dos fármacos (CUI et al., 2015; BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019). Por outro lado, a associação de dois ou mais fármacos pode levar a efeitos indesejados, como aumento da toxicidade ou inativação das moléculas por transformações químicas. Por isso, o estudo e avaliação preliminares do tipo de interação, seja sinérgica ou antagônica, é bastante importante quando se pensa na aplicação terapêutica de uma combinação de fármacos (BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019).

Um dos métodos utilizados para investigar a ocorrência de sinergismo entre dois compostos é o método *checkerboard*, no qual é testada a susceptibilidade de um micro-organismo à combinações de diferentes concentrações dos fármacos. Os dados de inibição do crescimento são então avaliados de acordo com modelos, que baseiam o sinergismo na diferença entre a inibição esperada ( $y_{\text{modelo}}$ ) e a inibição observada experimentalmente ( $y_{\text{observada}}$ ) para uma combinação. O que diferencia um modelo do outro é o cálculo de  $y_{\text{modelo}}$ . O modelo mais usado para o cálculo de sinergismo é o índice de concentração inibitória fracionário (CIF) que avalia a razão entre o valor de concentração inibitória mínima (CIM) das amostras testadas individualmente e em combinação, de acordo com a Equação 1. O modelo considera a ocorrência de sinergismo quando os valores de CIF são menores ou iguais a 0,5, ocorrência de aditividade para valores de CIF entre 0,5 e 1, indiferença para valores de CIF até 4 e ocorrência de antagonismo para valores acima disso (SOARES et al., 2014).

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM}_{\text{combinada1}}}{\text{CIM}_{\text{individual1}}} + \frac{\text{CIM}_{\text{combinada2}}}{\text{CIM}_{\text{individual2}}} \quad (1)$$

O modelo de independência de Bliss assume um processo estocástico em que as drogas agem independentemente e  $y_{\text{Bliss}}$  é calculado a partir da expressão  $y_{\text{Bliss}} = y_1 + y_2 - y_1y_2$ , na qual  $y_1$  e  $y_2$  representam a inibição produzida individualmente pelos fármacos nas concentrações  $x_1$  e  $x_2$ . Esse modelo geralmente é aplicado quando as amostras testadas possuem diferentes mecanismos de ação (YADAV et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2020). O modelo de aditividade de Loewe assume que os fármacos 1 e 2 possuem curvas de dose-resposta idênticas e considera que  $y_{\text{Loewe}} = y_1 + y_2$ , uma vez que fármacos idênticos não deveriam apresentar sinergismo ou antagonismo (TANG; WENNERBERG; AITTOKALLIO, 2015). Por fim, tem-se o modelo ZIP, que calcula  $y_{\text{ZIP}}$

pela combinação da forma paramétrica do modelo de Loewe com o processo estocástico assumido pelo modelo de Bliss e, portanto, se propõe a avaliar combinações independentemente de seus mecanismos de ação (YADAV et al., 2015).

A ocorrência de efeito sinérgico entre fármacos em terapia combinatória está, no geral, associada a diferentes mecanismos de ação de cada um dos fármacos (HOF et al., 2000). Barchiesi e colaboradores (1997) estudaram, por exemplo, a associação da terbinafina a azóis *in vitro*. Apesar de ambos atuarem na via biossintética do ergosterol, os alvos moleculares são diferentes, uma vez que a terbinafina inibe a ação da enzima esqualeno epoxidase e os azóis atuam na enzima 14- $\alpha$  demetilase, como citada anteriormente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A interação entre os fármacos foi avaliada pelo índice de concentração inibitória fracionária (CIF) e, apesar, dos resultados não terem atingido valores indicativos de sinergismo, foi possível observar a diminuição no valor de concentração inibitória mínima para várias das associações testadas (BARCHIESI; DI FRANCESCO; SCALISE, 1997). A associação *in vitro* entre propilcafeato, um éster de ácido cafeico, e os fármacos nistatina e fluconazol foi relatada por Sardi e colaboradores (2016), contra a cepa padrão *C. albicans* ATCC 90028 e também contra isolados clínicos de maior virulência. Foram observadas combinações sinérgicas capazes de reduzir o valor de CIM em até 32 vezes. A testagem de sinergismo entre antifúngicos convencionais e extratos vegetais também se faz presente entre os relatos. Em um trabalho realizado por Coimbra e colaboradores (2020), foi testada combinação de anfotericina B com frações do extrato bruto de *Arbutus unedo* e *Crataegus monogyna*, que foi avaliada pelo índice CIF e resultou em interações aditivas ou sinérgicas a depender da fração e da espécie de *Candida spp.* testada. Outro exemplo é a combinação de inibidores de bombas de próton e fluconazol para inibição de *C. albicans* estudada por Lu e colaboradores (2020). A combinação foi avaliada *in vitro* por meio do índice CIF e pelo modelo da independência de Bliss e se mostrou sinérgica, com redução bastante significativa dos valores de MIC de ambos os fármacos. Além disso, o estudo *in vivo* da combinação em modelo *Galleria mellonella* duplicou a taxa de sobrevivência das larvas infectadas pelo fungo. Outra combinação que se mostrou bastante interessante foi entre o antitumoral panobinostat e fluconazol na inibição de células planctônicas e de biofilmes de *C. albicans*. Os valores de CIM foram diminuídos em ambos os casos e os valores de CIF observados para a inibição de células planctônicas foi bastante baixo, indicadores da ocorrência de sinergismo. A sobrevida de

larvas *G. mellonella* infectadas também aumentou e foi observada a inibição da transição levedura-hifa pela combinação (SU et al., 2020).

Em relação ao peptídeo Histatina-5, alguns trabalhos relatam sua associação a antifúngicos convencionais ou a outros peptídeos com atividade antifúngica. Hof e colaboradores (2000) exploraram o efeito sinérgico entre Histatina-5 e alguns análogos e o antifúngico anfotericina B. Os dados mostraram que os peptídeos foram capazes de potencializar a atividade antifúngica do fármaco mesmo quando presentes em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima e a avaliação pelo índice CIF sugeriu a ocorrência de sinergismo para várias das espécies de *C. albicans* testadas. Além disso, os peptídeos análogos, Dhvar4 e Dhvar5, também foram capazes de interagir sinérgicamente com a anfotericina B. Wei e Bobek (2004) estudaram a associação do peptídeo MUC7 12-mer, derivado da mucina salivar humana MUC7, com o peptídeo Histatina-5 12-mer, relativo ao fragmento de A4 à H15 da Histatina-5. A análise pelo valor de CIF indicou um efeito aditivo ou sinérgico entre os peptídeos a depender das espécies testadas. Tanida e colaboradores (2006) associaram o peptídeo Histatina-5 e o peptídeo PEP2 (FKCRRWQWRM) aos fármacos anfotericina B e itraconazol e avaliaram o efeito das combinações na inibição de *C. albicans* e também sob a síntese de ergosterol, glucanas, manana e quitina; sob o efluxo de ATP e permeabilidade de membrana e sob a expressão dos genes de resistência CDR1 e CDR2. Os dados mostraram maior inibição do crescimento do fungo quando expostos às combinações citadas e foi relatado o aumento do efluxo de ATP quando da associação entre os fármacos e os peptídeos. Houve também uma regulação negativa da expressão dos genes avaliados na presença das associações estudadas.

Tais dados mostram que a terapia combinatória e a associação do peptídeo Histatina-5 a fármacos convencionais ou a outros peptídeos com atividade antifúngica podem se mostrar como aliadas na busca e pesquisa de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas e no enfrentamento do atual cenário de resistência a antimicrobianos.

---

## 2 OBJETIVOS

---

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a ocorrência de efeito sinérgico pela associação do peptídeo Histatina-5 com os antifúngicos convencionais fluconazol (Flu) ou nistatina (Nys) na inibição da levedura patogênica *Candida albicans*. Para isso, são propostos os objetivos específicos abaixo:

- Sintetizar o peptídeo 0WHistatina 5 (0WHst5), um análogo do peptídeo Histatina-5, pela metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida;
- Purificar o peptídeo 0WHst5, pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, e caracterizar por espectrometria de massas;
- Determinar a concentração inibitória mínima do Flu e da Nys frente as cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* ATCC 18804;
- Avaliar a ocorrência de sinergismo entre o peptídeo e os fármacos pelo ensaio *checkerboard*;
- Avaliar o perfil temporal de ação das associações do peptídeo com os fármacos pelo ensaio *time-kill*, a fim de prever as melhores combinações.

---

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 0WHistatina-5

O peptídeo 0WHistatina-5 (0WHst5) é um análogo do peptídeo Hst5 que possui um resíduo de triptofano adicionado na extremidade N-terminal de sua sequência primária a fim de facilitar a quantificação desse peptídeo através de técnicas espectrofluorimétricas. Os estudos realizados por Zambom e colaboradores (2019) mostraram que a adição do resíduo de triptofano a esse peptídeo não alterou seu potencial antifúngico. As sequências primárias de ambos peptídeos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 2:** Sequência primária dos peptídeos Histatina-5 e 0WHistatina-5

<b>Histatina-5</b>	<sup>1</sup> DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY <sup>24</sup>
<b>0WHistatina-5</b>	<sup>1</sup> WDSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY <sup>25</sup>

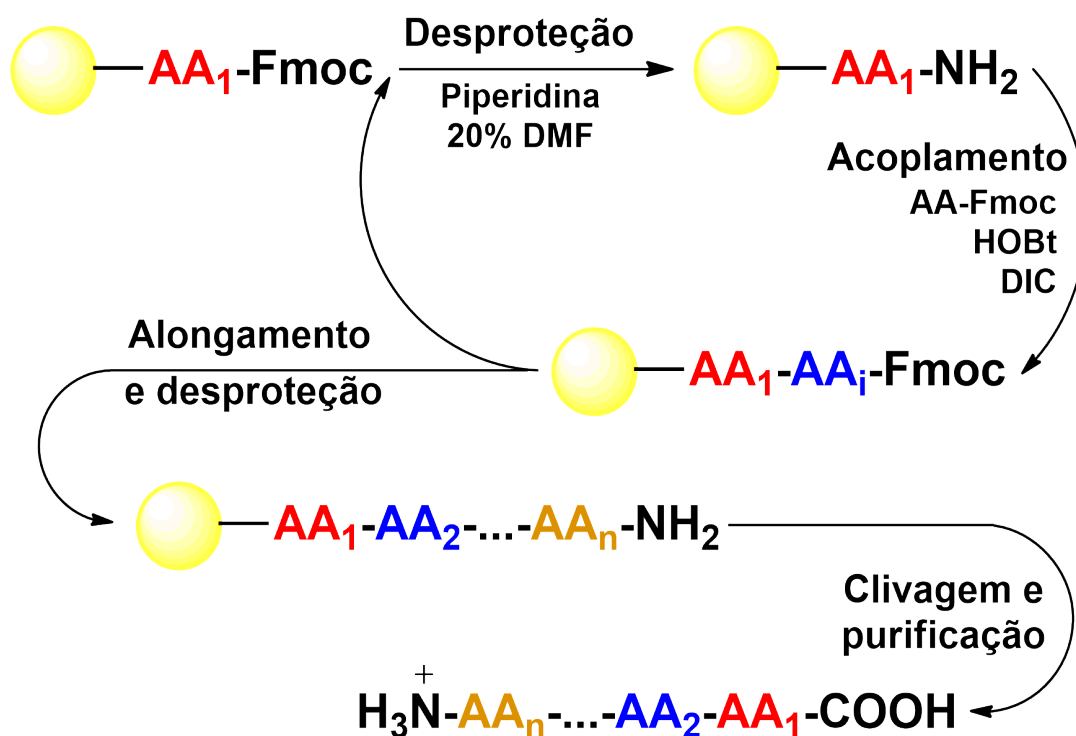
Fonte: elaborado pelo autor

Foi empregada a técnica de síntese em fase sólida de acordo com a estratégia Fmoc/t-Bu. A resina de partida foi uma resina Wang com o resíduo de tirosina 25 previamente incorporado e com grau de substituição de 0,57 mmol g<sup>-1</sup>. Os agentes de condensação utilizados foram DIC e HOBt. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes para o Fmoc-aminoácido (Fmoc-aa) e para os agentes de condensação, em relação à quantidade inicial de resina de partida e de seu grau de substituição. O processo de síntese se desenvolveu em uma mistura equivolúmica de diclorometano e dimetilformamida, com períodos de acoplamento de 2 horas. A eficiência da etapa de acoplamento de cada Fmoc-aa foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando necessário, o processo de reacoplamento foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Após o acoplamento bem-sucedido de um Fmoc-aa, era realizada a remoção do grupo base-lábil Fmoc, pelo uso de uma solução de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em dimetilformamida, durante 20 minutos. Após esse tempo, era testada a eficiência de remoção do grupo Fmoc também pela utilização do teste de ninidrina, prosseguindo-se com os acoplamentos dos demais Fmoc-aminoácidos da sequência.

Após a finalização da cadeia peptídica pretendida, procedeu-se a clivagem da ligação covalente entre o peptídeo e a resina e também a retirada dos grupos protetores

das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Tal processo foi efetuado pelo tratamento da peptidil-resina com uma solução contendo ácido trifluoroacético (95%), água deionizada (2,5%) e triisopropilsilano (2,5%), à temperatura ambiente e sob agitação, por 3 horas. Após esse período, o peptídeo bruto foi precipitado pela adição de éter dietílico gelado. O peptídeo precipitado foi centrifugado, o sobrenadante foi retirado e, por fim, o peptídeo foi dissolvido em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v). Esta solução foi rotaevaporada a fim de eliminar o ácido acético e, finalmente, liofilizada. O processo da síntese de peptídeo em fase sólida é mostrado de forma resumida no esquema da Figura 1.

**Figura 1:** Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida. O círculo amarelo representa o suporte sólido. AA representa um resíduo de aminoácido genérico.



Fonte: elaborado pelo autor.

O peptídeo bruto liofilizado foi purificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, em modo semipreparativo, em uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 µm). A análise qualitativa foi realizada em modo analítico utilizando um 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 5µm). As condições cromatográficas utilizadas em cada modo estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Condições cromatográficas utilizadas nos modos semipreparativo e analítico na purificação do peptídeo 0WHistatina 5.

	<b>Modo semipreparativo</b>	<b>Modo analítico</b>
<b>Solvente A</b>	0,045% TFA•H <sub>2</sub> O	0,045% TFA•H <sub>2</sub> O
<b>Solvente B</b>	0,036% TFA•ACN	0,036% TFA•ACN
<b>Modo de eluição</b>	30-60% de solvente B em 90 minutos	5-95% de solvente B em 30 minutos
<b>Fluxo</b>	5 mL min <sup>-1</sup>	0,6 mL min <sup>-1</sup>
<b>Detecção (λ)</b>	220 nm	220 nm

Fonte: elaborado pelo autor

Por fim, o peptídeo puro foi caracterizado e identificado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI-MS<sup>+</sup>), em um espectrômetro de massas Bruker Amazon com analisador do tipo *ion trap*.

## 3.2 Ensaios de atividade antimicrobiana

### 3.2.1 Preparação dos inóculos

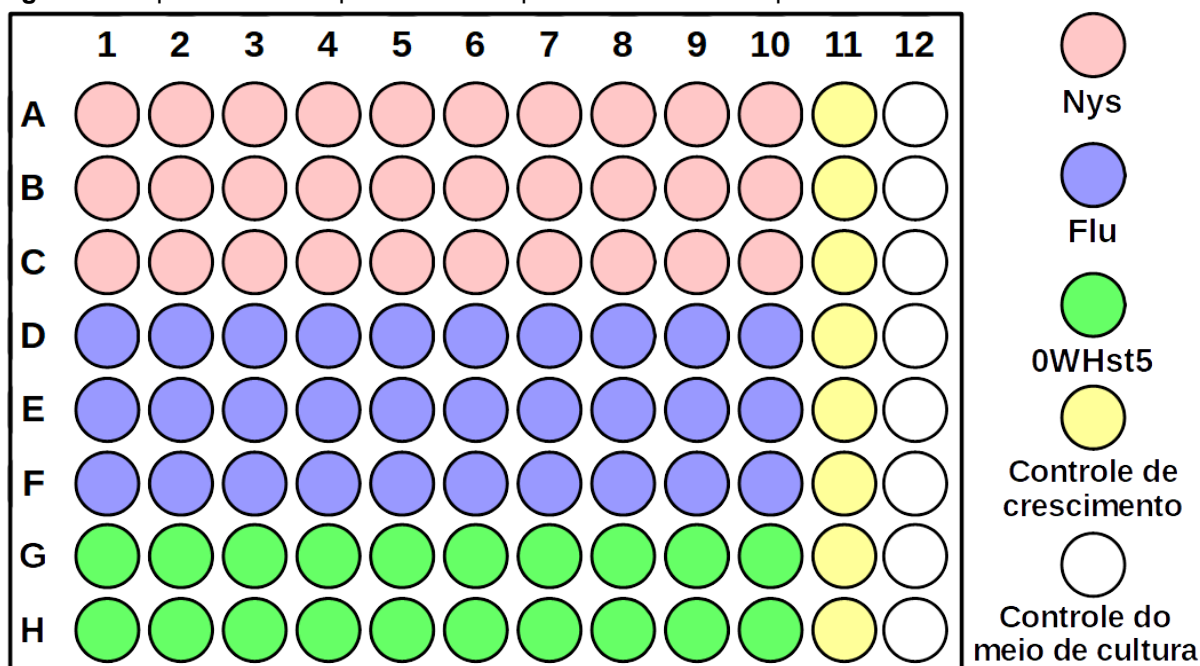
Para os ensaios descritos a seguir, foram utilizadas as cepas *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* ATCC 18804 obtidas por meio de doação pela Fiocruz. Para o preparo dos inóculos das cepas de *C. albicans* testadas, o micro-organismo liofilizado foi inicialmente reativado em caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) e incubado em estufa, a 37 °C, por 24 horas. Em seguida, as leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi®) e incubadas por 48 horas, a 37°C. Por fim, a cultura-estoque obtida foi armazenada em geladeira, a 4 °C, por no máximo 3 meses. Após esse tempo, o processo descrito era repetido.

Para preparar as suspensões padronizadas, algumas colônias das culturas-estoque de *C. albicans* foram semeadas em caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) e incubadas por 24 horas, a 37°C. Após esse período, uma pequena alíquota do inóculo era transferida para caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) estéril a fim de se obter uma suspensão de micro-organismos com densidade ótica (DO), a 530 nm, entre 0,10 e 0,15, indicativa de uma concentração aproximada de 1x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (RODRÍGUEZ-TUDELA et al., 2001). Enfim, diluiu-se a suspensão para se obter uma concentração de 1x10<sup>3</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, que foi utilizada nos testes descritos a seguir.

### 3.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste para determinação da CIM foi realizado pelo método de microdiluição em placa, segundo protocolo adaptado do manual M27-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute). Inicialmente, 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços (Kasvi®). Em seguida, 100 µL de uma solução-padrão da amostra a ser testada foram adicionados ao primeiro poço das linhas de A a F e se procedeu a diluição seriada da coluna 1 à coluna 10. Por fim, foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* nas colunas de 1 a 11 e outros 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®) aos poços da coluna 12. Dessa forma, a coluna 11 foi usada como o controle positivo de crescimento, no qual não houve interferência no crescimento do micro-organismo, e a coluna 12 foi utilizada como o controle de esterilidade do meio de cultura. A faixa de concentração testada para o fármaco fluconazol (Flu) foi de 400-0,82 µmol L<sup>-1</sup>, de 138-0,27 µmol L<sup>-1</sup> para nistatina (Nys) e de 160-2,5 µmol L<sup>-1</sup> para o peptídeo 0WHst5. No esquema da Figura 1 está representada a montagem final da placa.

Figura 2: esquema da microplaca montada para o teste de susceptibilidade.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

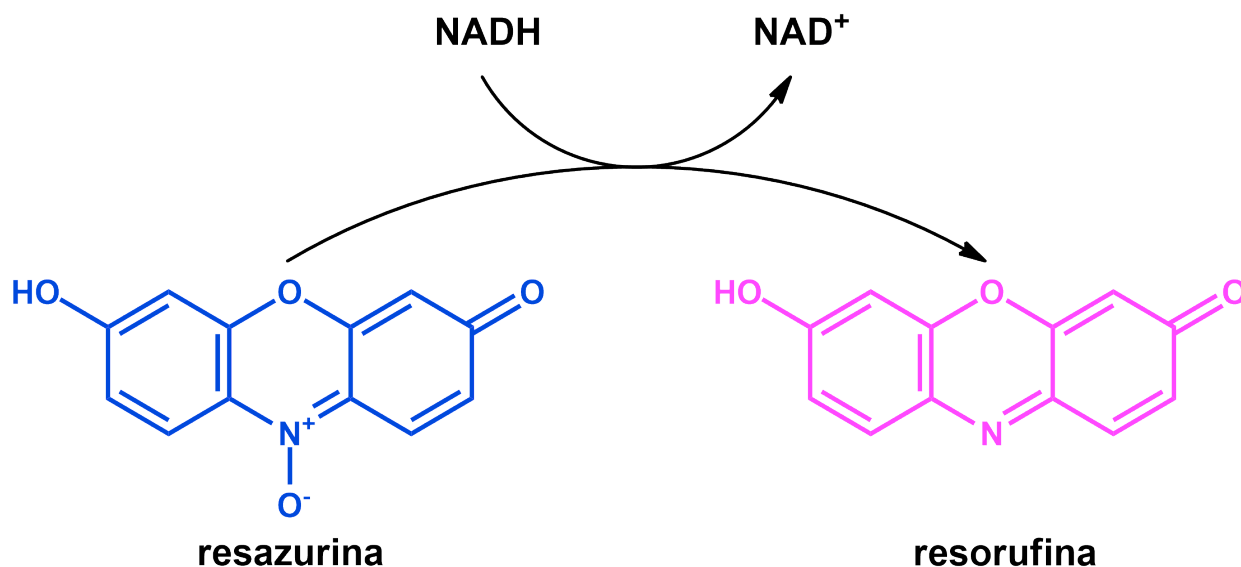
Após a montagem, as placas foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C. Ao fim desse período, a DO em cada poço foi lida em um espectrofotômetro de microplacas

(Biotek Epoch) a 570 nm. O teste foi realizado em duplicata para cada uma das cepas, a média das DOs foi calculada e a inibição do crescimento do micro-organismo produzida pelas diferentes concentrações de cada fármaco e do peptídeo foi determinada pela Equação 2.

$$\% \text{ inibição} = \left( 1 - \left( \frac{DO_{\text{poço}} - DO_{\text{meio de cultura}}}{DO_{\text{controle positivo}} - DO_{\text{meio de cultura}}} \right) \right) \times 100\% \quad (2)$$

Após a leitura da DO, foram adicionados 20 µL de resazurina 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, anteriormente filtrada em membrana 0,22 µm. A resazurina é um indicador de viabilidade celular, de coloração azul, que na presença de células metabolicamente ativas, sofre redução e é convertida à resorufina, que possui coloração rosa, como esquematizado na Figura 3. As placas foram incubadas durante uma hora e após esse período foi verificada a mudança de coloração do indicador de respiração celular, de azul para rosa, indicativa de viabilidade celular (SITTAMPALAM et al., 2004). Considerou-se que houve inibição do crescimento nos poços que apresentaram coloração equivalente à da coluna de controle do meio de cultura.

Figura 3: Conversão da resazurina à resorufina por células viáveis.

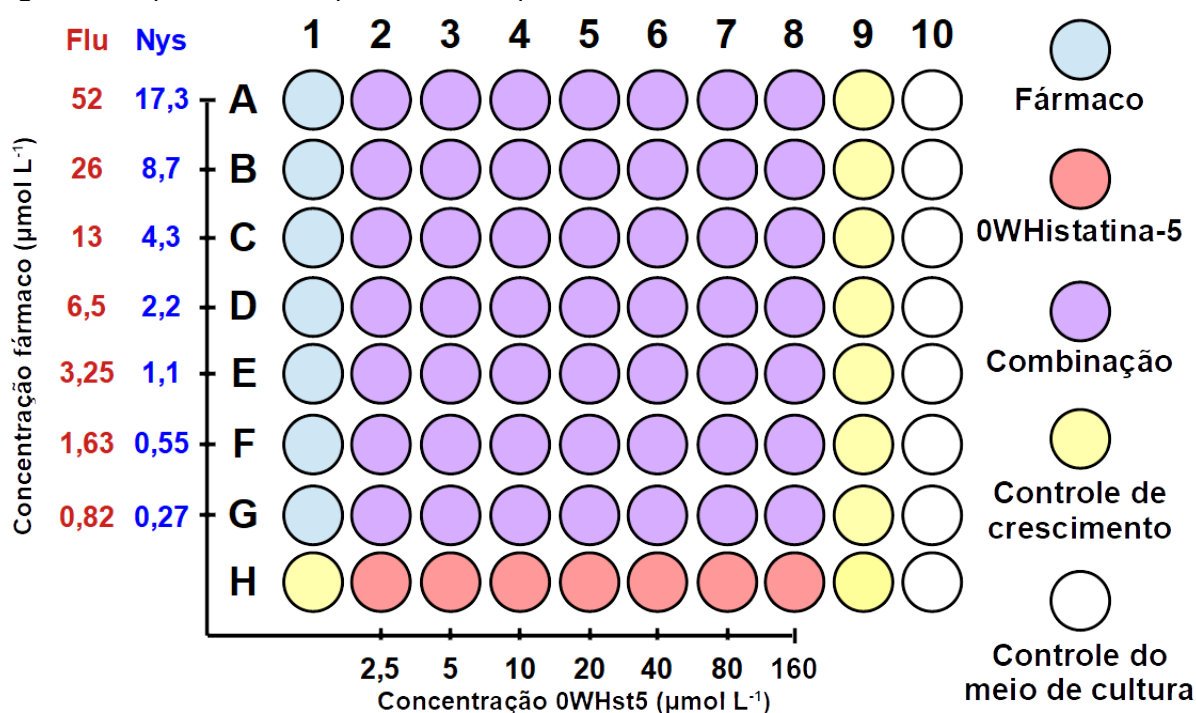


Fonte: adaptado de Riss et al., 2004.

### 3.2.3 Ensaio *checkerboard* para avaliação de efeito sinérgico

Inicialmente, foram preparadas soluções-padrão de cada uma das amostras a serem testadas. A uma microplaca, 50  $\mu\text{L}$  de cada concentração do peptídeo foram adicionados aos poços das colunas 2 a 8 e 50  $\mu\text{L}$  de cada concentração de fármaco foram adicionados aos poços das linhas A a G. Por fim, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de inóculo a cada poço das placas e os poços da coluna 1 e da linha H foram completados com 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. A faixa de concentração testada para o fármaco fluconazol (Flu) foi de 52-0,82  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , de 17,3-0,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para nistatina (Nys) e de 160-2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o peptídeo 0WHst5. O esquema final da montagem das placas está representado na Figura 4.

**Figura 4:** Esquema da microplaca montada para o ensaio checkerboard.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.2.4 Ensaio *time-kill* para identificação da melhor combinação

Inicialmente, foram preparadas soluções-padrão de cada uma das amostras a serem testadas, a uma concentração quatro vezes acima das concentrações finais pretendidas. Para o teste das combinações, os poços foram preenchidos com 50  $\mu\text{L}$  de solução do peptídeo, 50  $\mu\text{L}$  de solução dos fármacos e 100  $\mu\text{L}$  de inóculo padronizado a uma concentração de  $1 \times 10^3$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Para os controles do peptídeo e dos fármacos isolados, os poços foram preenchidos com 50  $\mu\text{L}$  de solução da amostra, 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura

Sabouraud Dextrose e 100 µL de inóculo. As concentrações testadas para os fármacos foram 6,5, 3,25 e 1,63 µmol L<sup>-1</sup> para fluconazol; 2,2, 1,1 e 0,55 µmol L<sup>-1</sup> para nistatina e 80, 40 e 20 µmol L<sup>-1</sup> para o peptídeo, sendo que todas as concentrações dos fármacos foram combinadas a todas as concentrações do peptídeo. As placas foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C, e a DO a 530 nm foi lida nos tempos de 2, 3, 6, 12, 24, 30 e 48 horas de incubação. O teste foi realizado em duplicata e o crescimento relativo foi calculado de acordo com a Equação 3.

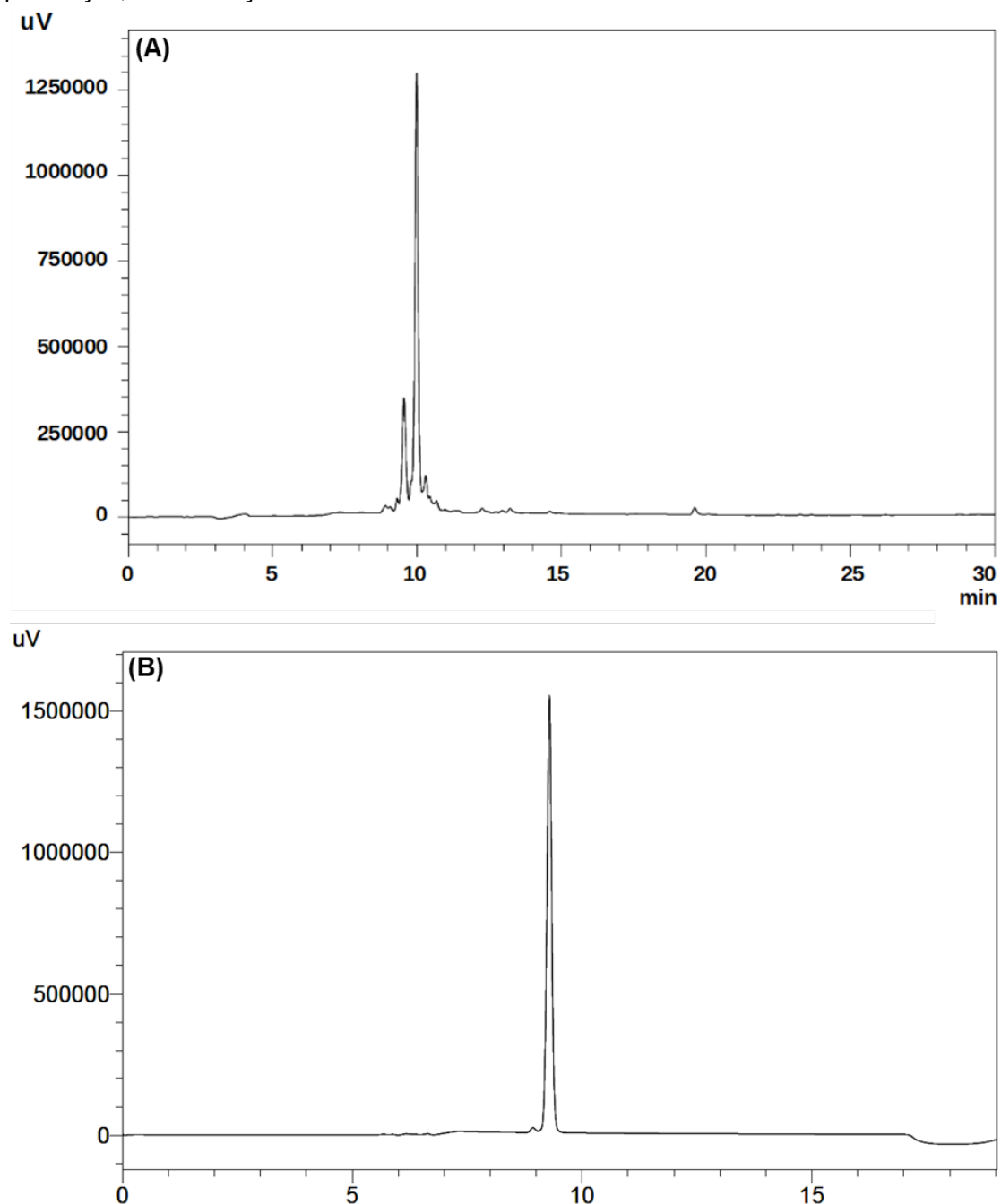
$$\% \text{ crescimento} = \left( \frac{DO_{\text{amostra no tempo t}} - DO_{\text{meio de cultura após 48h}}}{DO_{\text{controle positivo após 48h}} - DO_{\text{meio de cultura após 48h}}} \right) \times 100 \% \quad (3)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo 0WHistatina-5

A Figura 5 mostra os perfis cromatográficos obtidos em modo analítico para o peptídeo bruto e o peptídeo purificado.

Figura 5: Cromatogramas obtidos em modo analítico para o peptídeo 0WHistatina-5 antes (A) e após (B) purificação, com detecção em 220 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

A Figura 5A mostra o cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução do peptídeo 0WHst5 obtido após o processo de clivagem. É possível observar um pico majoritário com tempo de retenção próximo de 10 minutos e alguns picos de menor intensidade. O cromatograma obtido após a etapa de purificação é mostrado na Figura 5B e é possível observar um único pico referente ao peptídeo 0WHst5, o que indica que a purificação foi satisfatória e possibilitou a obtenção do peptídeo a um nível de pureza adequado para realização dos ensaios biológicos. Nota-se um pequeno deslocamento no tempo de retenção do peptídeo no segundo cromatograma em relação ao primeiro e isso pode ter sido causado por ligeiras mudanças na composição dos solventes da fase móvel.

A massa de peptídeo bruto obtida ao final da síntese, clivagem e liofilização foi 541 mg. A massa do peptídeo 0WHst5 obtida ao final do processo de purificação foi 161 mg. Baseado nesse dado, no grau de substituição e na massa inicial de resina, foi possível calcular o rendimento final da síntese que foi de 29%.

Em seguida, o peptídeo puro foi submetido à caracterização por espectrometria de massas, a fim de confirmar sua identidade. Teoricamente, o peptídeo possui massa molecular de  $3222,5 \text{ g mol}^{-1}$ . A partir dessa informação, é possível calcular os sinais referentes às razões massa/carga ( $m/Z$ ) que se espera observar no espectro de massas do peptídeo, basta somar a massa molecular do peptídeo com a carga teórica, sendo que cada carga é referente a um próton ( $\text{H}^+$ ), e então dividir pelo valor da carga. Outro cálculo possível é o da massa do peptídeo, a partir das razões  $m/Z$  observada no espectro de massas. Para esse cálculo, só é necessário fazer o caminho reverso do cálculo descrito anteriormente. Algumas dessas razões  $m/Z$  teóricas são apresentadas na Tabela 4 e relacionadas aos sinais mostrados na Figura 6 e às massas calculadas a partir desses sinais  $m/Z$ .

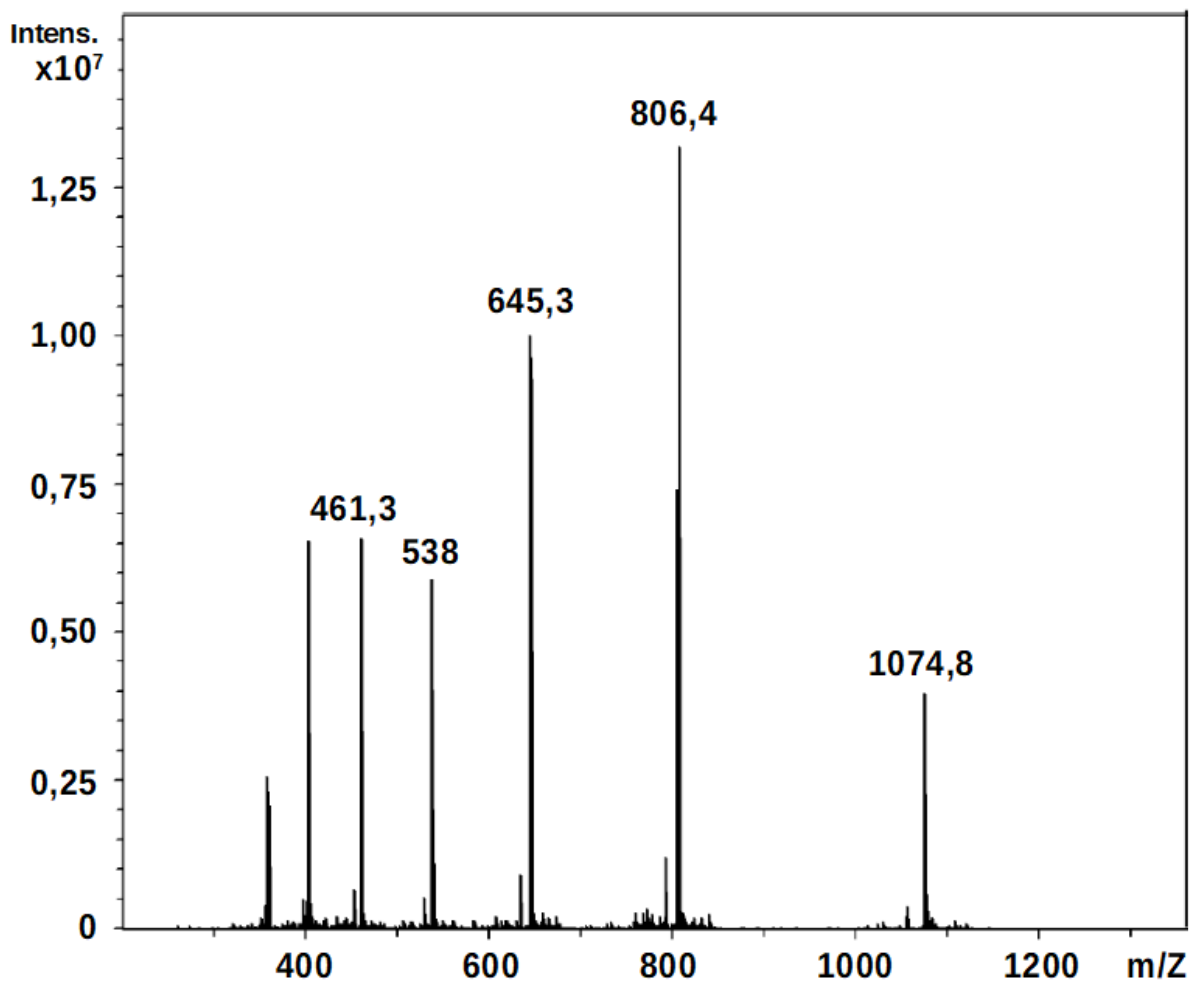
**Tabela 4:** Razões  $m/Z$  esperadas para o peptídeo 0WHistatina-5 para cargas entre +3 e +7 e relação com as massas calculadas a partir do espectro de massas.

<b>Carga (Z)</b>	<b>Razão massa/carga teórica (m/Z)</b>	<b>Razão massa/carga observada (m/Z)</b>	<b>Massa calculada a partir da m/Z observada (g mol<sup>-1</sup>)</b>
+3	1074,2	1074,8	3224,4
+4	805,6	806,4	3225,6
+5	644,5	645,3	3226,5
+6	537,1	538,0	3228
+7	460,4	461,3	3229,1

**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2019.

Uma comparação entre as razões  $m/Z$  teóricas e os sinais confirma que o peptídeo obtido através da síntese química foi de fato 0WHst5. Os sinais observados no espectro de massas são referentes aos níveis de ionização entre +3 ( $m/Z=1074,8$ ;  $[0WHst5+3H^+]^{3+}$ ) e +7 ( $m/Z=461,3$ ;  $[0WHst5+7H^+]^{7+}$ ). É possível observar também que os valores de massa do peptídeo estimados a partir dos sinais observados no espectro de massas são bastante similares ao valor teórico, desconsiderando os prótons relativos a cada estado de ionização do fragmento detectado.

Figura 6: Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 puro.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

## 4.2 Ensaios de atividade antimicrobiana

### 4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foi determinado, para o peptídeo 0WHst5 e para os fármacos, os valores de CIM, a concentração capaz de produzir inibição mínima de 90% no crescimento de *C. albicans* no período de 48 horas.

Pela leitura da DO, no comprimento de onda de 570 nm, o valor de CIM para o peptídeo foi de 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para as três cepas testadas. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 apresenta um perfil de resistência ao fluconazol e, portanto, o fato de o valor de CIM do peptídeo ser o mesmo para ela e para as cepas não-resistentes se torna bastante interessante do ponto de vista de combate às cepas que apresentam resistência a antifúngicos comerciais. O valor de CIM obtido para o peptídeo se encontra dentro da faixa de concentrações relatada por Moffa e colaboradores (2015) e é bastante semelhante ao relatado por Zambom e colaboradores (2019).

Para Nys, os valores de CIM obtidos foram 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *C. albicans* ATCC 10231 e para *C. albicans* ATCC 90028. Já para a cepa *C. albicans* ATCC 18804, o valor obtido foi de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados foram concordantes para o método de leitura de DO e para o método da resazurina e os valores são muito semelhantes aos relatados por Sardi e colaboradores (2016) para a cepa *C. albicans* ATCC 90028. Para Flu, pelo método de leitura de DO não foi possível observar inibição de 90% do crescimento de nenhuma das cepas no intervalo de concentrações testado. Porém, pelo método de resazurina, foi possível determinar um valor de CIM 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a cepa *C. albicans* ATCC 90028. Os valores são próximos aos relatados por Sardi e colaboradores (2016). Para as demais cepas, o método da resazurina não indicou inibição significativa para nenhuma concentração de Flu, ou seja, o valor de CIM foi  $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tal observação já era esperada para a cepa *C. albicans* ATCC 10231 que, como destacado anteriormente, apresenta um perfil de resistência ao fluconazol. Os dados estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima determinada para as diferentes cepas de *C. albicans*. Os valores de CIM estão representados em  $\mu\text{mol L}^{-1}$

	0WHst5	Nys	Flu
<b><i>C. albicans</i> ATCC 90028</b>	80	4,3	13
<b><i>C. albicans</i> ATCC 18804</b>	80	2,2	>400
<b><i>C. albicans</i> ATCC 10231</b>	80	4,3	>400

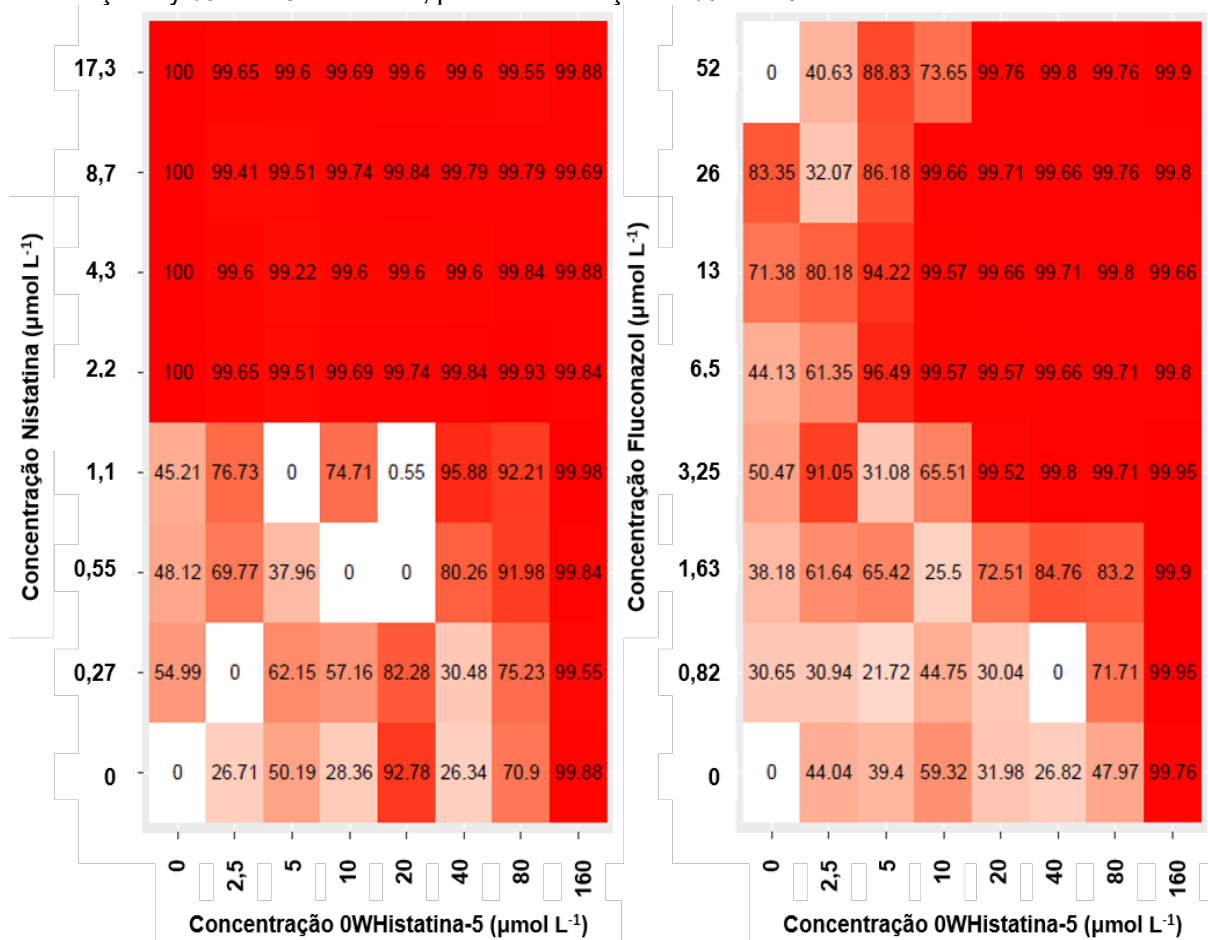
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.2 Ensaio *checkerboard* para avaliação de efeito sinérgico

As matrizes de inibição obtidas através da média das duplicatas do método *checkerboard* para cada combinação estão representadas na Figura 7.

Inicialmente, a partir das matrizes de inibição, foi calculado a concentração inibitória fracionária (CIF). Para esse cálculo, foi utilizada a menor combinação de concentrações fármaco/peptídeo que promoveu inibição maior ou igual a 90% (CIM) e a CIM dos fármacos e do peptídeo agindo individualmente, anteriormente relatadas. Para a combinação 0WHst5/Nys, a condição de 90% de inibição foi satisfeita pela combinação 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ /1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que resulta em um valor de CIF igual a 0,75. Para a combinação 0WHst5/Flu, a condição de 90% de inibição foi satisfeita pela combinação 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ /1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que resulta em um valor de CIF igual a 0,5. O valor obtido para ambas as combinações é indicativo de um efeito aditivo entre o peptídeo e cada um dos fármacos (SOARES et al., 2014).

Figura 7: Matrizes de inibição média obtidas no ensaio *checkerboard*. À esquerda, resultados para a associação Nys/0WHst5 e à direita, para a associação Flu/0WHst5.



Fonte: Elaborado pelo autor na plataforma SynergyFinder, 2019.

Os dados foram inseridos na plataforma Synergy Finder e os valores obtidos para a combinação 0WHst5/Flu e 0WHst5/Nys por cada um dos modelos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Pontuação média calculada para as combinações peptídeo/fármaco pelos diferentes modelos.

Método	Combinação	
	0WHst5/Nys	0WHst5/Flu
HSA	-5,31	27,62
Bliss	-6,19	27,38
Loewe	-77,04	19,51
ZIP	-1,37	29,75

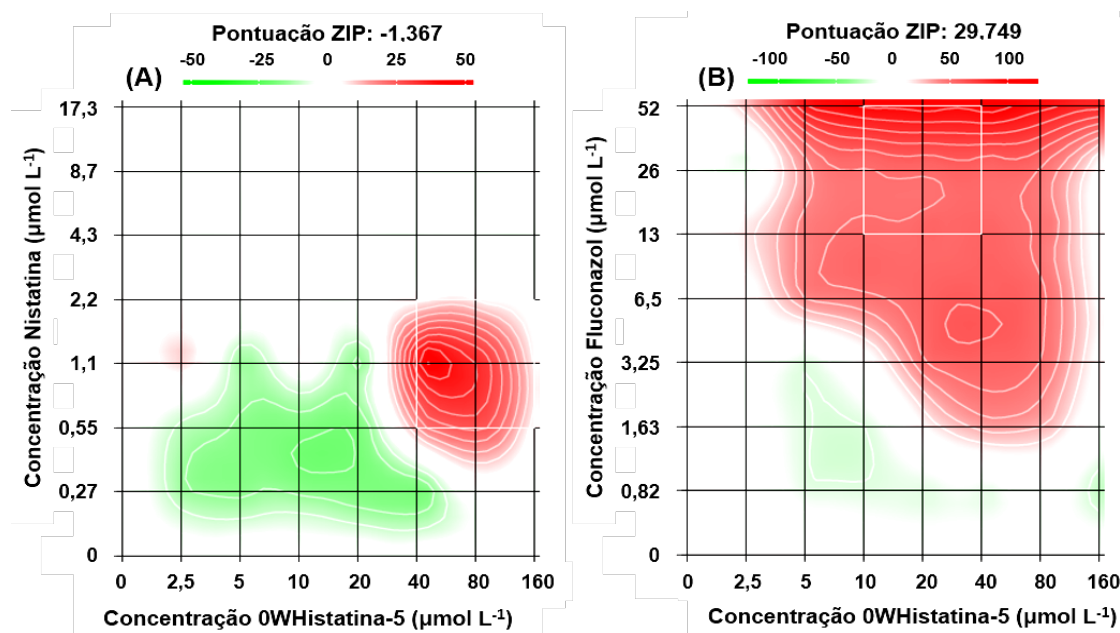
Fonte: Elaborado pelo autor

Pontuações acima de +10 sugerem a ocorrência de interação sinérgica para as combinações testadas, pontuações abaixo de -10 sugerem a ocorrência de antagonismo e pontuações intermediárias indicam aditividade. Pelos valores relatados na Tabela 6, nota-se que todos os métodos indicam a ocorrência de sinergismo para a combinação do peptídeo ao antifúngico fluconazol, com valores de pontuação bastante próximos. Já para a combinação com a nistatina, três modelos sugerem a ocorrência do fenômeno de aditividade, enquanto o modelo de Loewe sugere que ocorre antagonismo.

A partir dos cálculos realizados pela plataforma também é gerado um mapa de contorno que relaciona a pontuação de sinergismo para cada uma das combinações fármaco/peptídeo. Esse gráfico está representado na Figura 8 e nele é possível visualizar as combinações mais sinérgicas.

Na Figura 8A, na qual está representada a combinação 0WHst5/Nys, apesar da pontuação média indicativa de antagonismo, é possível observar uma região de sinergismo centrada na CIM do peptídeo e na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Nys. Para a combinação 0WHst5/Flu, na Figura 8B, a região de maior sinergismo se encontra em valores acima da CIM do fármaco. Porém, mesmo fora dessa região, ainda foram observadas pontuações de sinergismo bastante significativas, como a observada para a combinação de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Flu com  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  do peptídeo.

Figura 8: Mapa de contorno representando os diferentes valores de  $\delta$  obtidos no ensaio checkerboard avaliado pelo modelo ZIP. Na Figura 8A, resultados para a associação 0WHst5/Nys. Na Figura 8B, para a associação 0WHst5/Flu.



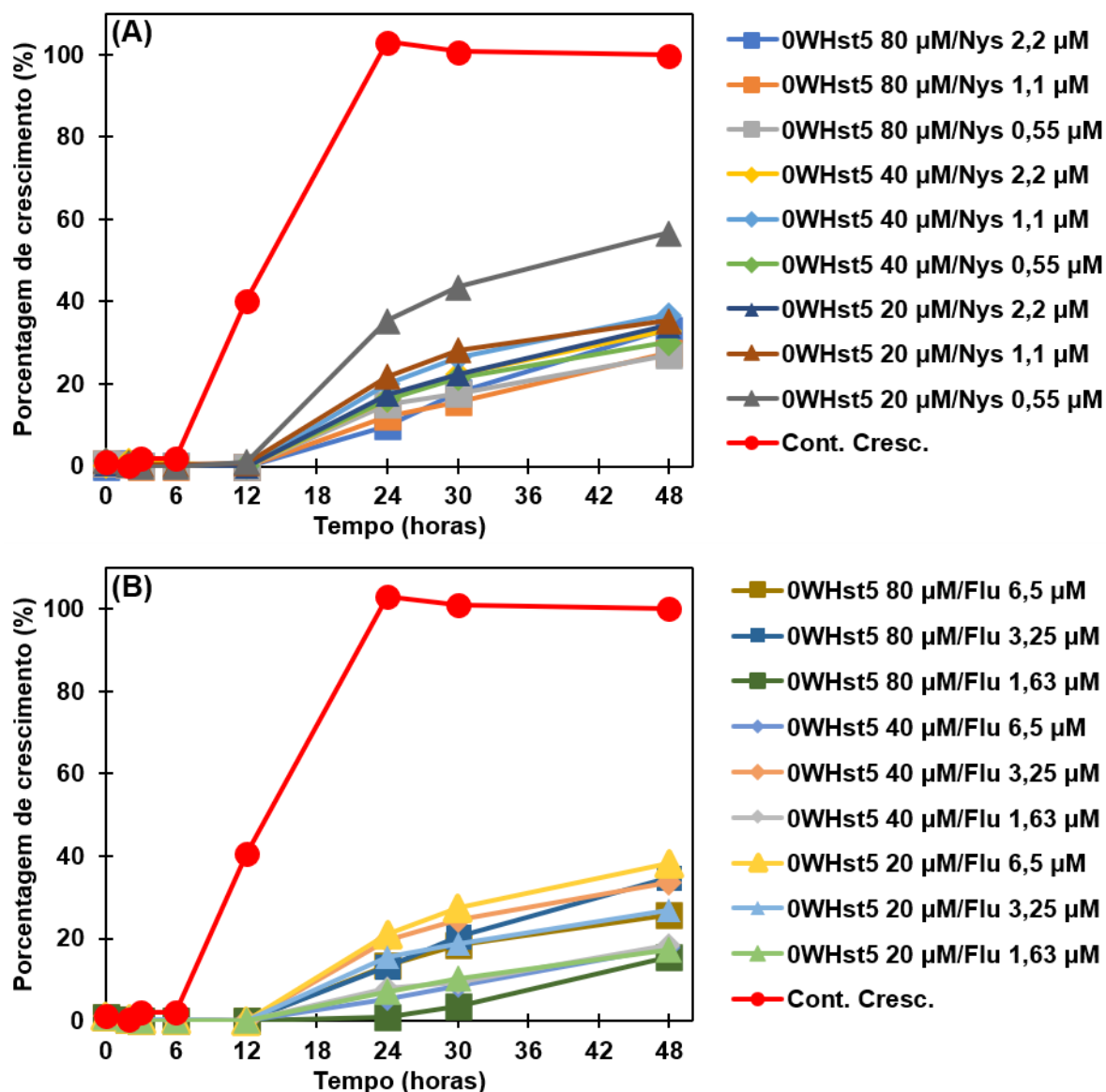
Fonte: Elaborado pelo autor na plataforma SynergyFinder, 2019.

#### 4.2.3 Ensaio *time-kill* para identificação da melhor combinação

O ensaio *checkerboard* dá informações sobre a ação combinada do peptídeo e dos fármacos após o tempo fixo de 48 h. A partir da observação dos resultados obtidos nesse ensaio, foi proposta a realização do ensaio *time-kill* para possibilitar a observação da ação das combinações em função do tempo. Além disso, também foram feitos controles do peptídeo e fármacos isolados, para possibilitar uma comparação entre esses dados e a eficiência das combinações.

Como mencionado anteriormente, nesse ensaio foram utilizadas três cepas: *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* ATCC 10231. Para analisar os resultados obtidos para cada cepa, os dados foram sistematizados em três gráficos: os dois primeiros contêm as informações referentes às combinações 0WHst5/Nys e 0WHst5/Flu, com o objetivo de determinar qual a combinação de concentrações mais eficiente em cada um dos casos, ou seja, aquela para a qual se observou um menor crescimento do micro-organismo. A partir dessa informação, foi plotado o terceiro gráfico, a fim de comparar a resposta gerada pelas melhores combinações com as respostas geradas pelo peptídeo e fármacos isolados nas mesmas concentrações. Na Figura 9 estão representados os dados para *C. albicans* ATCC 90028.

Figura 9: Representação gráfica dos resultados do ensaio time-kill para a cepa *C. albicans* ATCC 90028. O gráfico 9A se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco nistatina (Nys). O gráfico 9B se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco fluconazol (Flu).



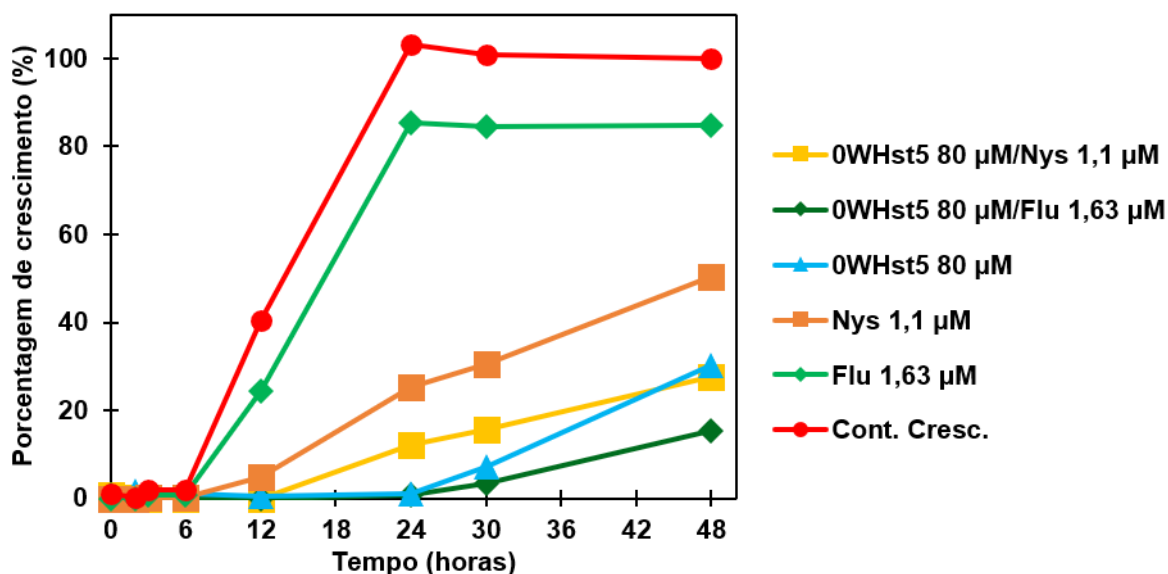
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Os resultados referentes à associação 0WHst5/Nys estão representados na Figura 9A. As combinações testadas apresentaram perfis de ação semelhantes, com crescimentos relativos ao controle que variaram entre 27% e 57% ao final do ensaio. Duas combinações apresentaram inibição similar após 48 horas, sendo elas 0WHst5 80 µM/Nys 1,1 µM (■) e 0WHst5 80 µM/Nys 0,55 µM (■), para as quais foi observado uma inibição aproximada de 73% do crescimento em relação ao controle. Ao analisar o perfil de ação temporal de ambas as combinações, considerou-se que a primeira foi mais eficiente, uma vez que foi capaz de manter o crescimento em um nível

ligeiramente mais baixo que a combinação 0WHst5 80  $\mu$ M/Nys 0,55  $\mu$ M (■) ao decorrer do experimento.

Para a associação 0WHst5/Flu também foi observado um perfil de ação semelhante para as diversas combinações testadas frente a cepa *C. albicans* ATCC 90028 e os resultados estão representados na Figura 9B. O crescimento do micro-organismo variou entre 15,5% e 38% em relação ao controle. Na associação 0WHst5/Flu foi possível observar três combinações com inibições semelhantes após 48 h, porém a combinação que exibiu maior capacidade de inibição ao se considerar todo o período do ensaio foi a combinação 0WHst5 80  $\mu$ M/Flu 1,63  $\mu$ M (■). A partir desses dados sobre ambas as associações, foi plotado o gráfico da Figura 10 para comparar a ação combinada e individual do peptídeo e dos fármacos.

Figura 10: Comparação entre a eficiência das melhores combinações e a eficiência individual do peptídeo e fármacos frente a *C. albicans* ATCC 90028.

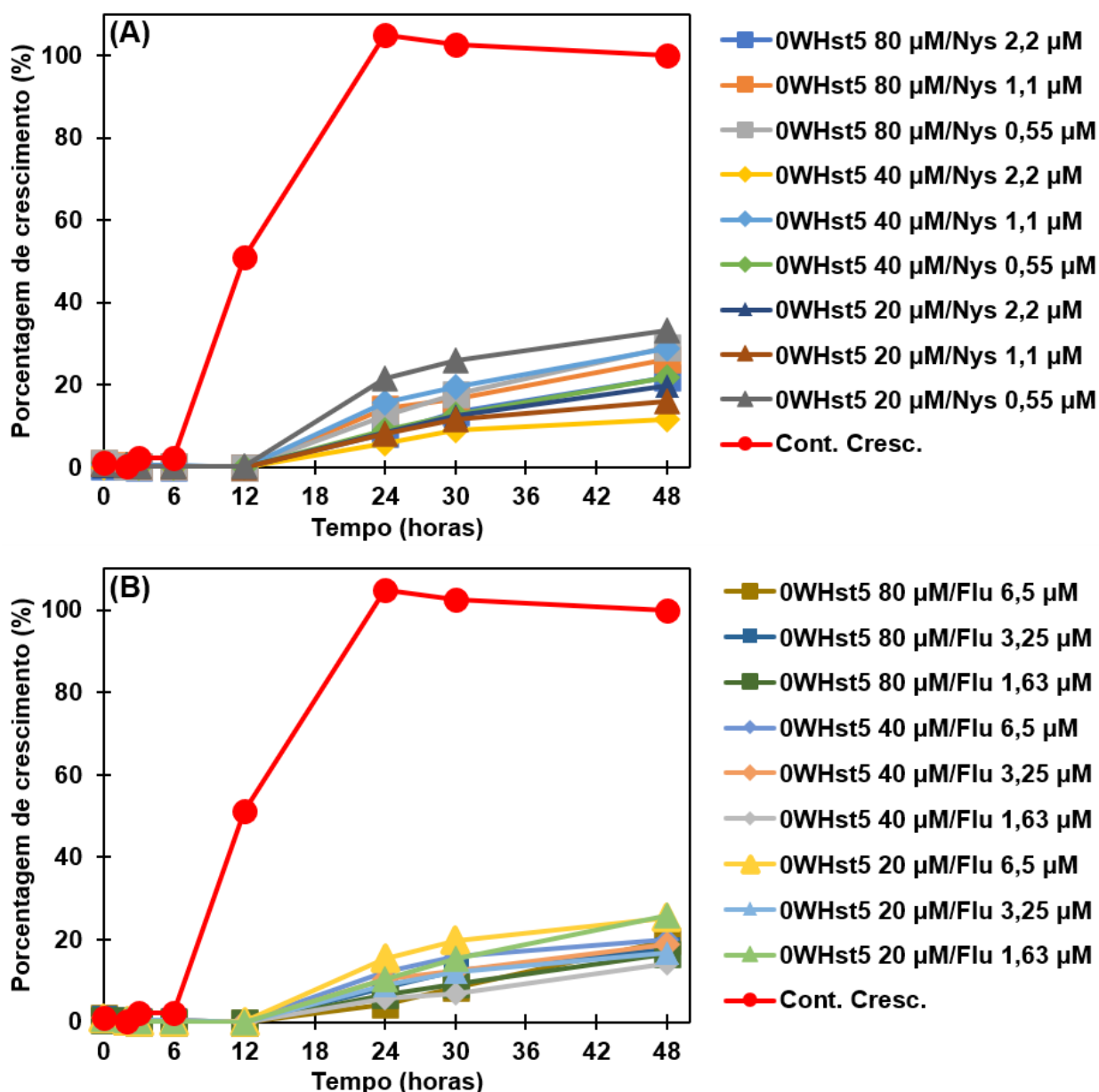


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Em relação à associação 0WHst5/Nys, é possível observar que a curva referente à combinação com o peptídeo (■) apresentou uma inibição do crescimento intermediária às curvas do peptídeo (▲) e da nistatina (■) agindo separadamente ao longo do ensaio. Ao final das 48 h, o crescimento do micro-organismo tratado com a combinação foi ligeiramente menor que o crescimento observado para o micro-organismo tratado apenas com o peptídeo. Para a associação 0WHst5/Flu, foi possível observar uma grande diferença entre a curva referente à combinação com o peptídeo (◆) e a curva do fármaco agindo individualmente (◆). Ao final das 48 h, enquanto Flu apresenta uma inibição do crescimento próxima de 20%, a combinação possibilitou aproximadamente 85% de

inibição. É interessante observar que a curva da combinação (◆) tem um perfil bastante parecido com a curva do peptídeo ao agir individualmente (▲), porém apresenta um controle maior do crescimento do micro-organismo a partir das 30 h de experimento. A diferença mais significativa para a associação 0WHst5/Flu comparada à associação 0WHst5/Nys, está de acordo com os resultados obtidos no ensaio *checkerboard*, que mostrou maiores valores de pontuação de sinergismo para 0WHst5/Flu.

Figura 11: Representação gráfica dos resultados do ensaio time-kill para a cepa *C. albicans* ATCC 18804. O gráfico 11A se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco nistatina (Nys). O gráfico 11B se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco fluconazol (Flu).

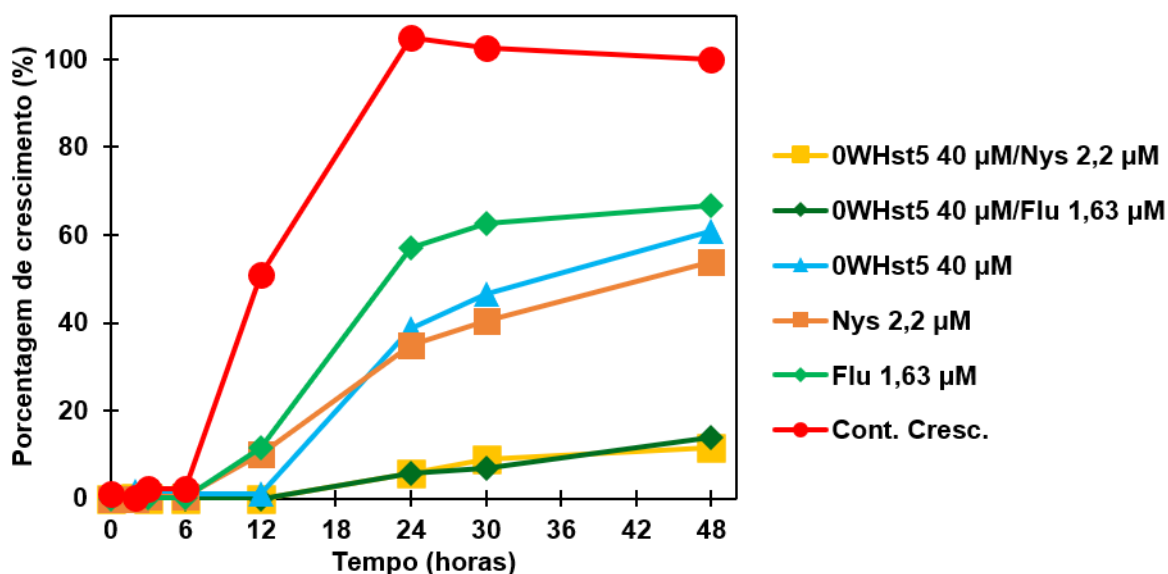


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 11 estão representados os dados do ensaio *time-kill* para *C. albicans* ATCC 18804. Os resultados obtidos para a associação 0WHst5/Nys estão representados na Figura 11A e os crescimentos relativos ao controle variaram entre 12% e 33% ao final do ensaio. A combinação que apresentou o melhor perfil de ação foi 0WHst5 40  $\mu$ M/Nys 2,2  $\mu$ M (◆), tanto ao longo do ensaio, quanto ao final das 48 horas. Para a associação 0WHst5/Flu, os perfis de ação observados para as combinações testadas foram semelhantes entre si, com valores de crescimento que variaram entre 14 e 26%. Os resultados estão representados na Figura 11B. A combinação que exibiu maior capacidade de inibição ao longo do ensaio foi a 0WHst5 40  $\mu$ M/Flu 1,63  $\mu$ M (◆).

O gráfico apresentado na Figura 12 permite comparar a ação combinada e individual do peptídeo e dos fármacos.

Figura 12: Comparação entre a eficiência das melhores combinações e a eficiência individual do peptídeo e fármacos frente a *C. albicans* ATCC 18804.

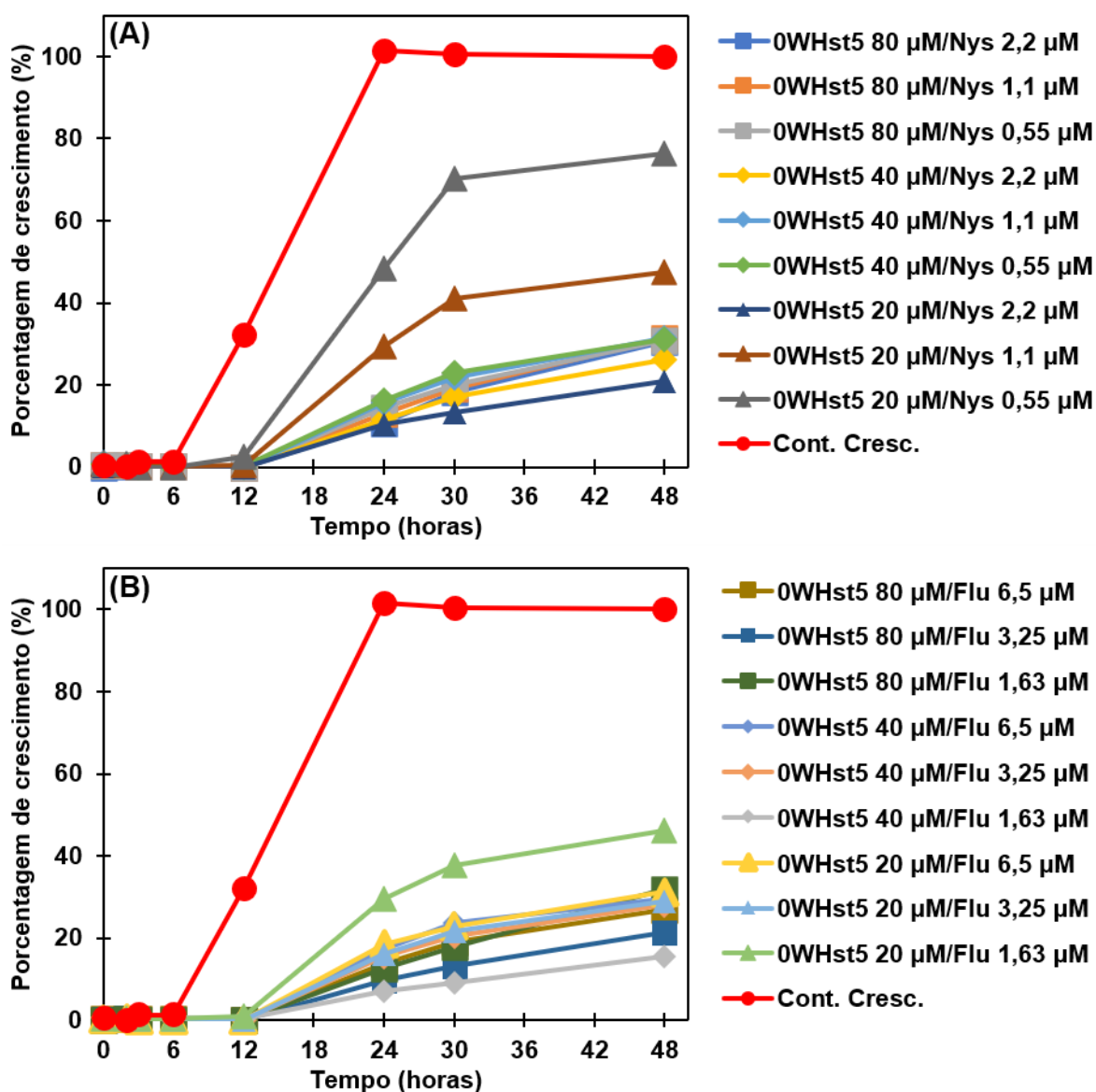


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Para a cepa *C. albicans* ATCC 18804, os resultados observados também estão de acordo com os resultados do ensaio *checkerboard*, com uma maior diferença de eficiência para a associação 0WHst5/Flu que para 0WHst5/Nys ao se comparar com as ações individuais. Para 0WHst5/Nys, é possível observar que a associação (■) apresentou aproximadamente 88% de inibição do crescimento ao fim do experimento, enquanto o peptídeo (▲) e a nistatina (■) agindo separadamente, inibiram em 39% e 46%, respectivamente.

Para a associação 0WHst5/Flu, a curva referente à combinação com o peptídeo (◆) mostrou maiores valores de inibição do crescimento que as curvas do peptídeo (▲) e do fármaco (◆) agindo individualmente. Ao final das 48 h, Flu apresentou uma inibição do crescimento próxima de 33%; o peptídeo, 39%; e a combinação mostrou inibição de 86%. É interessante ressaltar os resultados observados foram obtidos a partir da combinação de concentrações abaixo da CIM tanto do fluconazol, quanto do peptídeo.

Figura 13: Representação gráfica dos resultados do ensaio time-kill para a cepa *C. albicans* ATCC 10231. O gráfico 13A se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco nistatina (Nys). O gráfico 13B se refere à combinação entre o peptídeo e o fármaco fluconazol (Flu).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

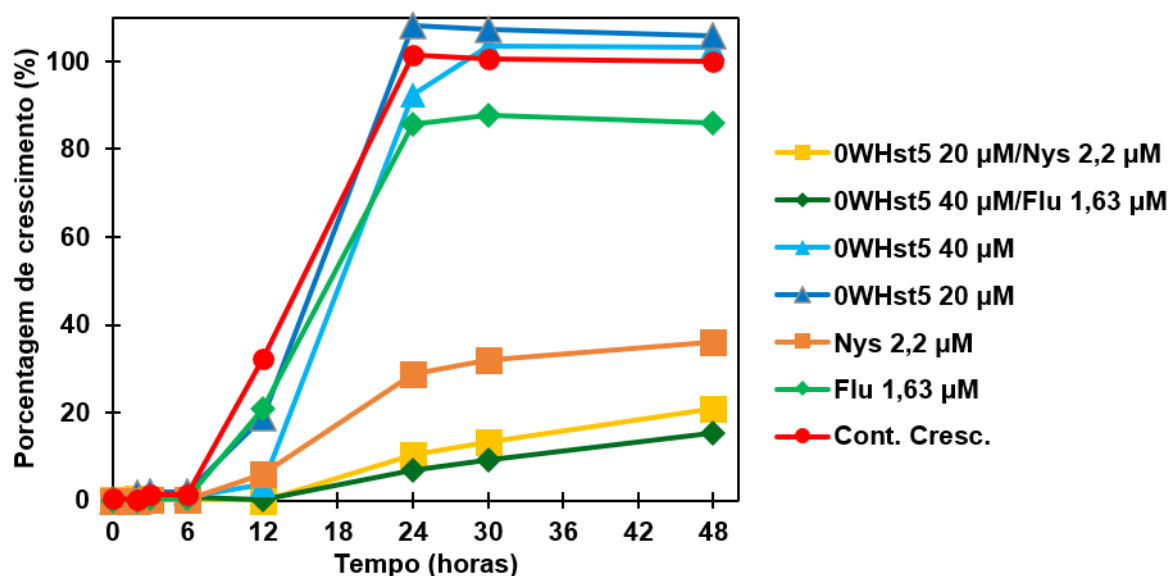
Os dados obtidos para pelo ensaio *time-kill* para *C. albicans* ATCC 10231 estão representados na Figura 13.

Para a combinação 0WHst5/Nys, representada na Figura 13A, os valores de crescimento relativo ao controle variaram entre 21% e 76%, com o melhor resultado observado para a combinação 0WHst5 20  $\mu$ M/Nys 2,2  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), que exibiu maior inibição do crescimento ao longo de todo o experimento.

Para a associação 0WHst5/Flu muitas das combinações mostraram um perfil de ação semelhante. O crescimento do micro-organismo variou entre 15,5% e 46% em relação ao controle e os resultados são apresentados na Figura 13B. A combinação que exibiu maior capacidade de inibição foi 0WHst5 40  $\mu$ M/Flu 1,63  $\mu$ M ( $\blacklozenge$ ).

O gráfico da Figura 14 mostra as curvas referentes à melhor combinação para cada associação e à ação individual do peptídeo e dos fármacos.

Figura 14: Comparação entre a eficiência das melhores combinações e a eficiência individual do peptídeo e fármacos frente a *C. albicans* ATCC 10231.



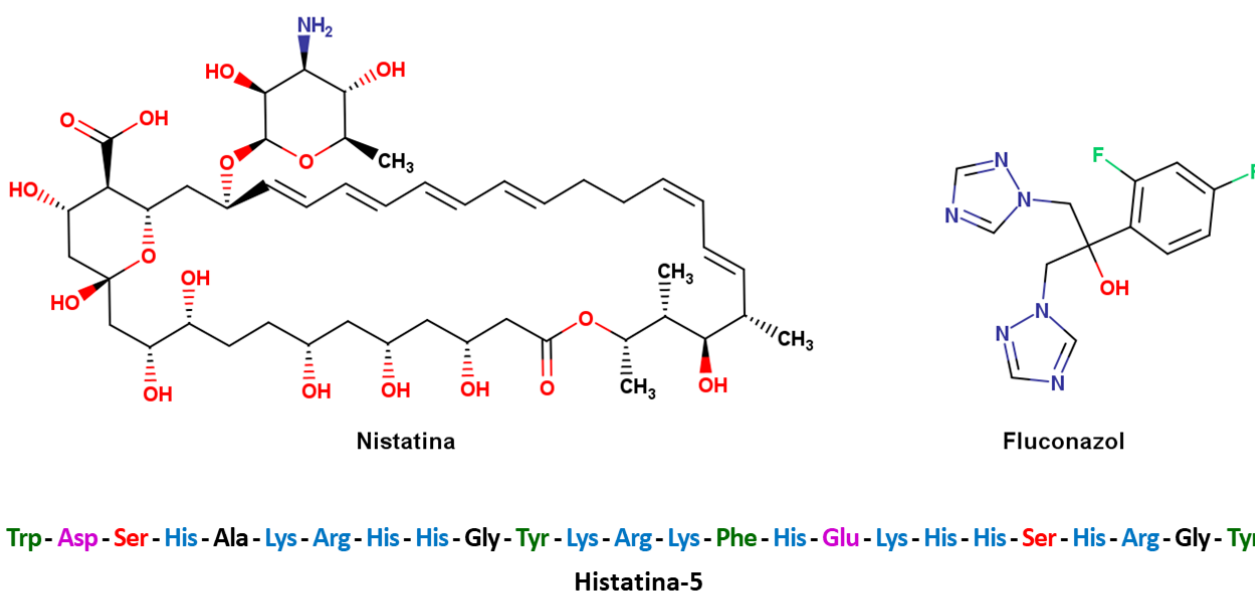
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Em relação à associação 0WHst5/Nys, a curva referente à combinação com o peptídeo ( $\blacksquare$ ) apresentou valores de crescimento bastante abaixo daqueles observados para o peptídeo agindo isoladamente ( $\blacktriangle$ ) e significativamente mais baixos que os observados para a nistatina ( $\blacksquare$ ). Ao final das 48 h, o crescimento para 0WHst5 a 40  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ) foi comparável ao do controle de crescimento, mostrando que somente o peptídeo nesta concentração não é capaz de inibir o crescimento do micro-organismo. Para Nys 2,2  $\mu$ M ( $\blacksquare$ ), o crescimento relativo foi 36%, o que mostra uma boa eficiência do fármaco nesta concentração testada. No entanto, para a associação 0WHst5 20  $\mu$ M/Nys 2,2  $\mu$ M ( $\blacksquare$ ), observou-se uma porcentagem de crescimento na ordem

de 21%, o que é menor que a observada para o fármaco isolado. Para a associação 0WHst5/Flu, foi observada uma grande diferença entre a curva referente à combinação com o peptídeo (◆) e as curvas do peptídeo (▲) e do fármaco (◆) agindo individualmente. Ao final das 48 h, enquanto foi observada inibição do crescimento próxima de 15% para fluconazol e crescimento comparável ao controle para o peptídeo, a combinação resultou em aproximadamente 84% de inibição. Mais uma vez, foi observada uma diferença mais significativa para a associação 0WHst5/Flu que para a associação 0WHst5/Nys em comparação às atividades individuais, resultado que vai de encontro ao observado no ensaio *checkerboard*.

Frente as observações realizadas ao longo do trabalho, foram propostas algumas hipóteses baseadas nas estruturas químicas e mecanismos de ação de cada uma das moléculas presentes nas combinações avaliadas neste trabalho.

Figura 15: Estruturas moleculares da nistatina e do fluconazol e sequência primária do peptídeo 0WHistatina-5.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 15, é possível observar a estrutura da nistatina, a qual é composta por um macrociclo anfifílico, com uma face hidroxilada polar e uma face hidrocarbônica apolar, além dos substituintes aminoglicosídico e carboxílico. Quanto ao fluconazol, tem-se uma estrutura composta por dois anéis triazólicos e um anel difluorbenzênico. A primeira hipótese proposta para explicar os menores valores de pontuação de sinergismo observadas para a combinação 0WHst5/Nys em comparação à combinação 0WHst5/Flu foi baseada nas possíveis interações intermoleculares que poderiam existir entre o

peptídeo e os fármacos, de modo a dificultar que os alvos celulares fossem atingidos. O fluconazol é uma molécula pequena com grupos que possuem menor chance de interações com o peptídeo, enquanto a nistatina é uma molécula maior que possui uma face rica em substituintes hidroxila, que podem funcionar como receptores e/ou doadores de ligações de hidrogênio para as ligações peptídicas e para as cadeias laterais dos aminoácidos ácidos e básicos presentes na OWHistatina-5.

Em relação ao impacto dos mecanismos de ação dos fármacos nos resultados observados, estudos indicaram que a anfotericina B, um fármaco que pertence à mesma classe que a nistatina, pode impactar na estabilidade e funcionalidade de proteínas de membrana pelo sequestro do ergosterol presente na membrana celular fúngica (MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O, 2012). Dessa forma, levantou-se a hipótese de que o sequestro de ergosterol pela nistatina pode ter impactos na estabilidade e funcionalidade das proteínas de membrana, Dur3 e Dur31, que são transportadores de poliaminas envolvidos na internalização do peptídeo.

Por fim, quanto ao ganho de atividade observado para o fluconazol, principalmente frente a cepa *C. albicans* ATCC 10231, inferiu-se que o peptídeo pode atuar de forma a inibir ou competir pela ação de alguns dos fatores associados à resistência ao fluconazol. Um exemplo seria a bomba de efluxo Flu1, relacionada à resistência aos azóis pela exposição prolongada a esses fármacos, mas que também já foi relatada como sendo capaz de impedir o acúmulo do peptídeo Histatina-5 nas células de *C. albicans* (LI et al., 2013; HAMPE et al., 2017).. Portanto, em caso de uma afinidade maior da bomba de efluxo pelo peptídeo, o fármaco teria uma maior possibilidade de atingir seu alvo molecular e exercer o efeito esperado.

---

## 5 CONCLUSÃO

---

O trabalho aqui desenvolvido teve como proposta central avaliar a ocorrência de efeito sinérgico do peptídeo 0WHistatina-5, um peptídeo derivado da Histatina-5 que apresenta a mesma capacidade antifúngica frente a *Candida albicans*, quando associado aos antifúngicos comerciais fluconazol e nistatina para inibição deste micro-organismo.

O ensaio *checkerboard* permitiu uma primeira observação quanto aos efeitos da associação do peptídeo aos fármacos convencionais. Através da avaliação dos dados gerados pelos modelos matemáticos propostos, foi possível sugerir uma interação sinérgica entre o peptídeo 0WHistatina-5 e fluconazol em uma ampla faixa de concentrações, inclusive abaixo da concentração inibitória mínima do peptídeo. Para a combinação com a nistatina, foi observado sinergismo para uma faixa menos ampla de concentrações, tendo o efeito de aditividade como modelo de interação majoritária.

Estes resultados motivaram a realização do ensaio *time-kill* a partir das combinações que se mostraram mais eficientes, a fim de observar o potencial antifúngico das combinações em função do tempo e também as mudanças no perfil de ação dessas combinações, quando comparado à ação individual das moléculas testadas.

O ensaio *time-kill* foi desenvolvido utilizando três cepas diferentes: *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* ATCC 10231, sendo que a última apresenta perfil de resistência ao fluconazol. Os resultados obtidos para *C. albicans* ATCC 90028 revelaram que as combinações 0WHst5 80 µM/Nys 0,55 µM e 0WHst5 80 µM/Flu 1,63 µM foram as que apresentaram maior inibição dessa cepa de micro-organismo. Para a cepa *C. albicans* ATCC 18804, as combinações 0WHst5 40 µM/Nys 2,2 µM e 0WHst5 40 µM/Flu 1,63 µM foram as que tiveram destaque no controle desta cepa de micro-organismo. Para *C. albicans* ATCC 10231, as combinações 0WHst5 20 µM/Nys 22 µM e 0WHst5 40 µM/Flu 1,63 µM apresentaram os melhores resultados de inibição dessa cepa.

Para as três cepas testadas observou-se uma diferença bastante significativa entre a ação individual do fluconazol e a ação da combinação 0WHst5/Flu, tanto ao final, quanto ao longo do ensaio. Para a combinação com Nys também foi observado melhores perfis temporais para a associação, porém as mudanças em relação ao perfil individual foram menos acentuadas, o que já era esperado pelos resultados obtidos no ensaio *checkerboard*.

As observações com relação à associação ao fluconazol são bastante interessantes, uma vez que o sinergismo foi observado de forma bastante significativa para as três diferentes cepas testadas, tendo valores de inibição de crescimento de 85% para *C. albicans* ATCC 90028, 86% para *C. albicans* ATCC 18804 e 84% para *C. albicans* ATCC 10231. É importante destacar que até mesmo para a cepa *Candida albicans* ATCC 10231, que apresenta um perfil de resistência ao fluconazol, a combinação do peptídeo com fluconazol permitiu inibição superior a 80%, que é muito superior à inibição apresentada individualmente pelo fármaco, a qual foi somente 15%.

A fim de explicar os resultados observados, foram propostas hipóteses baseadas nas estruturas moleculares e nos mecanismos de ação e de resistência conhecidos para os fármacos e o peptídeo, de modo a apontar os caminhos para futuras investigações acerca das combinações investigadas.

Estes resultados indicam que explorar mais as potencialidades da associação de peptídeos antifúngicos derivados da Histatina-5 com fármacos já utilizados para o tratamento de infecções fúngicas pode ser uma alternativa promissora ao tratamento de infecções fúngicas provocadas por diferentes espécies do gênero *Candida*.

## REFERÊNCIAS

ALLERT, S. et al. *Candida albicans*-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. **mBio**, v. 9, n. 3, 1 maio 2018.

AMBLARD, M. et al. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239–254, jul. 2006.

ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia. Susceptibility and Epidemiology. **Danish medical journal**, v. 60, n. 11, p. B4698, nov. 2013.

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, set. 2002.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L. F.; SCALISE, G. In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 8, p. 1812–1814, 1997.

BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 10, p. 237–245, 31 jul. 2017.

BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 3, p. 345–358, 1 set. 2019.

CALDERONE, R. A.; CLANCY, C. J. (ed.). **Candida and Candidiasis**. 2. ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2011.

CANELA, H. M. S. et al. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 1 jan. 2018.

CLEVELAND, A. A. et al. Changes in Incidence and Antifungal Drug Resistance in Candidemia: Results from Population-Based Laboratory Surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 10, p. 1352–1361, nov. 2012.

COIMBRA, A. T. et al. Phytochemical Characterization, Bioactivities Evaluation and Synergistic Effect of *Arbutus unedo* and *Crataegus monogyna* Extracts with Amphotericin B. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2143–2154, 1 set. 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, 15 ago. 2017.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, 1 jul. 2015.

CUI, J. et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 19 maio 2015.

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, 1 abr. 2018.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Fenbendazole controls in vitro growth, virulence potential, and animal infection in the *Cryptococcus model*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, 1 jun. 2020.

DIAMOND, G.; RYAN, L. Beta-defensins: what are they REALLY doing in the oral cavity? **Oral Diseases**, v. 17, n. 7, p. 628–635, 1 out. 2011.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PÉREZ, M.-G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 6, n. 5, p. e576-82, dez. 2014.

GAUR, N. K.; SMITH, R. L.; KLOTZ, S. A. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* Expressing ALA1/ALS5 Adhere to Accessible Threonine, Serine, or Alanine Patches. **Cell Communication & Adhesion**, v. 9, n. 1, p. 45–57, jan. 2002.

GROGAN, J. et al. Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. **FEBS Letters**, v. 491, n. 1–2, p. 76–80, 23 fev. 2001.

GUSMAN, H. et al. Is salivary histatin 5 a metallopeptide? **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1545, n. 1–2, p. 86–95, 9 fev. 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, 27 set. 2017.

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, 12 mar. 1999.

HELMERHORST, E. J. et al. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061–1070, dez. 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 of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14637–14642, 4 dez. 2001.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N. et al. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 5, p. 900–910, set. 2013.

HOF, W. van't et al. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 163–169, 2000.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 1 mar. 2016.

IANEVSKI, A. et al. SynergyFinder: A web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. **Bioinformatics**, v. 33, n. 15, p. 2413–2415, 2017.

IANEVSKI, A.; GIRI, A. K.; AITTOKALLIO, T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W488–W493, 2 jul. 2020.

JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724–2739, 2016.

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

- JARADAT, D. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. **Amino Acids**, v. 50, n. 1, p. 39–68, 1 jan. 2018.
- KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1 abr. 1970.
- KHAN, S. A. et al. Impaired histatin-5 levels and salivary antimicrobial activity against *C. albicans* in HIV infected individuals. **Journal of AIDS and Clinical Research**, v. 4, n. 2, fev. 2013.
- KHURSHID, Z. et al. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 1, p. 25–31, 1 jan. 2017.
- KIRKPATRICK, C. H. et al. Inhibition of Growth of *Candida Albicans* by Iron-Unsaturated Lactoferrin: Relation to Host-Defense Mechanisms in Chronic Mucocutaneous Candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 124, p. 539–544, 1971.
- KRAGELUND, C. Exploiting new knowledge of Candidal infection for future antifungal combat. **Oral Diseases**, v. 23, n. 5, p. 543–547, jul. 2017.
- 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, 1 abr. 2013.
- LIN, L. et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 12, dez. 2009.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2020.
- LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 134–140, jan. 2017.
- LU, M. et al. Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2020.
- MARTEL, C. M. et al. Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4527–4533, 1 nov. 2010.

- MEILLER, T. F. et al. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: Proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 7 abr. 2009.
- MELINO, S. et al. Histatins: Salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: Perspectives for biomedical applications. **FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 657–672, 2014.
- 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, 1 jul. 1963.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, AUG, 2012.
- MOFFA, E. B. et al. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 885, 28 ago. 2015.
- MURCIANO, C. et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, mar. 2012.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 104–112, 1 dez. 2017.
- NIKAWA, H. et al. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Archives of Oral Biology**, v. 38, n. 12, p. 1057–1063, 1993.
- OPPENHEIM, F. G. et al. Histatins, a Novel Family of Histidine-rich Proteins in Human Parotid Secretion. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 263, n. 16, p. 7472–7477, 1988.
- OSHIRO, K. G. N. et al. Bioactive Peptides Against Fungal Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2169, 4 out. 2019.
- PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. Major Facilitator Superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 1–34, 1 mar. 1998.
- PARK, S. et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* spp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264–3273, ago. 2005.
- PARKER, J. E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 143–161, 2 out. 2014.

- PATHIRANA, R. U. et al. Fluconazole-resistant *Candida auris* is susceptible to salivary histatin 5 killing and to intrinsic host defenses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, 1 fev. 2018.
- PATIL, S. et al. Oropharyngeal candidosis in HIV-infected patients-an update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 980, 15 maio 2018.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 1 set. 2017.
- PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515–521, fev. 2008.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.
- PRASAD, R.; GOFFEAU, A. Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 39–63, 13 out. 2012.
- 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. 752–763, 30 out. 2015.
- PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 958–64, 1 ago. 2014.
- REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, 1 out. 2018.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753–775, 8 set. 2017.
- RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2513–7, jul. 2001.
- SANGLARD, D. et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 241–253, 1 fev. 1998.

SARDI, J. de C. O. et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 387–391, 1 dez. 2016.

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

SHAGAGHI, N. et al. Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 62, 12 abr. 2018.

SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

SINGH-BABAK, S. D. et al. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, maio 2012.

SITTAMPALAM, G. S. et al. **Assay Guidance Manual**. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

SOARES, L. A. et al. Anti- Trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 957860–957860, 18 jun. 2014.

SU, S. et al. Antifungal Activity and Potential Mechanism of Panobinostat in Combination With Fluconazole Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1584, 16 jul. 2020.

SULTAN, A. S. et al. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006719, jan. 2018.

SUN, J. N. et al. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1246–1260, 1 dez. 2008.

SWIDERGALL, M.; ERNST, A. M.; ERNST, J. F. *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3917–3922, 2013.

SWIDERGALL, M.; FILLER, S. G. Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2017.

- TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What Is Synergy? The Saariselka Agreement Revisited. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 181, 2015.
- TANIDA, T. et al. Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 94–103, 1 jan. 2006.
- TATI, S. et al. Histatin 5 Resistance of *Candida glabrata* Can Be Reversed by Insertion of *Candida albicans* Polyamine Transporter-Encoding Genes DUR3 and DUR31. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61480, 22 abr. 2013.
- TAY, W. M. et al. A plausible role of salivary copper in antimicrobial activity of histatin-5-Metal binding and oxidative activity of its copper complex. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 23, p. 6709–6712, 1 dez. 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TSAI, P.-W. et al. Human Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits Adhesion of *Candida albicans* by Interacting with Yeast Cell-Wall Carbohydrates. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17755, 14 mar. 2011.
- TSUI, C.; KONG, E.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* Biofilm. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 4, 2016.
- VERMA-GAUR, J.; TRAVEN, A. Post-transcriptional gene regulation in the biology and virulence of *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 800–806, 1 jun. 2016.
- VILA, T. et al. The power of saliva: Antimicrobial and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 11, 2019.
- VINCENT, B. M. et al. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. **PLoS Biology**, v. 11, n. 10, p. e1001692, 29 out. 2013.
- WÄCHTLER, B. et al. *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36952, 14 maio 2012.
- WARRILOW, A. G. S. et al. Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14- $\alpha$  demethylase (CaCYP51). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4235–4245, out. 2010.

WEI, G. X.; BOBEK, L. A. In vitro synergic antifungal effect of MUC7 12-mer with histatin-5 12-mer or miconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 750–758, 1 maio 2004.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440–464, 2010.

WIRSCHING, S.; MICHEL, S.; MORSCHHÄUSER, J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: The role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 856–865, 1 maio 2000.

WOONG, S. J. et al. The P-113 fragment of histatin 5 requires a specific peptide sequence for intracellular translocation in *Candida albicans*, which is independent of cell wall binding. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 497–504, fev. 2008.

WUNDER, D. et al. Human Salivary Histatin 5 Fungicidal Action Does Not Induce Programmed Cell Death Pathways in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 110–115, jan. 2004.

XU, H. et al. *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1602–1617, nov. 2017.

YADAV, B. et al. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 13, p. 504–13, 2015.