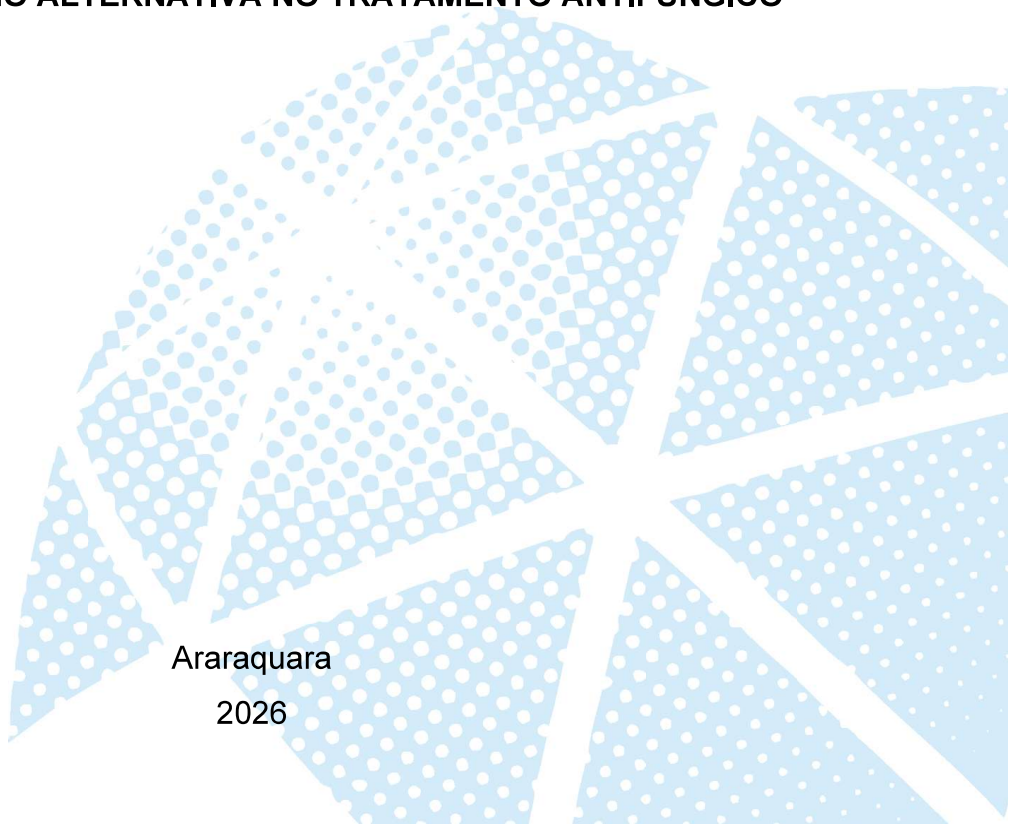


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

MARIANA DE MELO FACETO PORTELLA

**SÍNTESE DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DO DOMÍNIO FUNCIONAL DA
HISTATINA-5 COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO**



Araraquara
2026

MARIANA DE MELO FACETO PORTELLA

**SÍNTESE DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DO DOMÍNIO FUNCIONAL DA
HISTATINA-5 COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Kelly Ishida

Araraquara

2026

P843s Portella, Mariana de Melo Faceto
Síntese de peptídeos provenientes do domínio funcional da
histatina-5 como alternativa antifúngica / Mariana de Melo Faceto
Portella. -- Araraquara, 2026
63 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Saulo Santesso Garrido
Coorientadora: Kelly Ishida

1. Candida albicans. 2. Antibióticos peptídicos. 3. Peptídeos
catiônicos antimicrobianos. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Infecções fúngicas tem se tornado uma preocupação à saúde pública devido seu tratamento limitado e aumento de resistência dos microrganismos perante tais medicações. Pensando em alternativas no tratamento antifúngico, este trabalho foi idealizado e desenvolvido, atuando em conjunto com a meta 3 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pela Organização das Nações Unidas em 2015 que preza pela garantia do acesso à saúde de qualidade e por promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Fungal infections have become a threat to public health due to limited treatment and the emerging of fungal resistance toward existing classes of antifungal drugs. Considering new options for antifungal treatment, this research was idealized and developed, acting in accordance to the United Nations Sustainable Development Goals – Goal 3 from 2015 – which ‘Ensures healthy lives and promote well-being for all at all ages’.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese de Peptídeos Provenientes do Domínio Funcional da Histatina-5 como Alternativa no Tratamento Antifúngico

AUTORA: MARIANA DE MELO FACETO PORTELLA

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

COORDINADOR: COORDINADORA: KELLY ISHIDA

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

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

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dr.^a CRISTINA DE CASTRO SPADARI (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia / Instituto de Ciências Biomédicas - USP - São Paulo

Araraquara, 30 de março de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **SAULO SANTESSO GARRIDO**
Data: 30/03/2026 13:43:21-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	MARIANA DE MELO FACETO PORTELLA 23/11/1998
Nacionalidade	Brasileira
Nome em citações bibliográficas:	PORTELLA, Mariana De Melo Faceto Melo Faceto Portella, M. d. PORTELLA, M. M. F.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 3301-9822
Currículo Lattes	Lattes
ORCID	ORCID
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2024/2026	Mestre em Biotecnologia Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara
2018/2024	Bacharel em Química Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
PORTELLA, M. M. F.; ISHIDA, K.; GARRIDO, S. S.. Synthesis of peptides from Histatin-5 functional domain as na alternative strategy against <i>Candida albicans</i>. 54^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2025, Águas de Lindóia. Livro de Resumos Parte 1. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2025. p. 362. Disponível em: 54^a SBBq - Livro de Resumos - Parte 1. Zambom, C. R. <i>et al.</i>. Reducing Functional Domain of Histatin 5 Improves Antifungal Activity and Prevents Proteolytic Degradation. Microorganisms, v. 13, n. 5, 8 may 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13051091.	

PORTELLA, M. M. F.. Avaliação do Potencial Antifúngico do Peptídeos 8WHst-5Duo contra *Candida albicans*. 2023. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2023.

TÉO, Larissa Caroline Borges *et al.*. Como divulgar a ciência produzida na própria universidade? Um relato na produção de TDC no âmbito do grupo PET. VII Encontro dos Grupos PET da UNESP, 2021, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal, 2021. Disponível em: Anais VII Encontro dos Grupos PET da UNESP. DOI: 10.29327/1312202

MAESTRINER, E. R. *et al.*. O que é MOF? E o que essas três letras representam para anti-falsificação?. 2021. 8 f. Texto de Divulgação Científica – PET Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021. Disponível em: Texto de Divulgação Científica.

LIMA, LARISSA C. *et al.*. Futuras Cientistas. VI Encontro dos Grupos PET da UNESP, 2019, Bauru. Anais. Bauru, 2019.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

X Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada, 2025, São Paulo. Atividade Prática: “EFG1: Um regulador transcricional da morfogênese de *Candida albicans*”. 2025. (Seminário e Aula Prática).

54ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2025, Águas de Lindóia. Synthesis of peptides from Histatin-5 functional domain as na alternative strategy against *Candida albicans*. 2025. (Poster).

Workshop de Férias em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica, 2023, São Paulo. Mini-curso: Desenvolvimento de biofármacos. 2023. (Seminário).

XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2023, Araraquara. Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra *Candida albicans*. 2023. (Poster).

VIII Semana da Engenharia Química, 2023, Araraquara. Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra *Candida albicans*. 2023. (Poster).

I Curso de inverno em Biociências e Biotecnologia, 2023, Araraquara. Avaliação do potencial antifúngico do peptídeo 8WHst-5Duo contra *Candida albicans*. 2023. (Poster).

Dedico este trabalho à quem, mesmo na
ausência, não deixou de existir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Luana, por todo incentivo durante o mestrado, pelas revisões de todas as minhas versões de escrita, quer fosse um poster ou a versão final deste documento escrito. Tenha sido a versão em português ou a versão em inglês. Obrigada por passar horas lendo, relendo e transcrevendo o que muitas vezes estava claro na mente mas não no texto.

Agradeço ao meu pai, Vanderlei, por todas as vezes em que me perguntou como estavam os experimentos quando eu chegava em casa no final do dia, cada vez que tentou entender sobre o que minha pesquisa se tratava, por toda torcida silenciosa que foi transmitida claramente por cada carona no final de semana para realização de experimento, ou em cada alimento feito com carinho quando eu estava tão atarefada que me esquecia de comer.

Agradeço à minha irmã, Laura, pela tentativa de me animar cada vez que eu estive chateada. Agradeço por cada planner que você me fez, pelos docinhos e Cup Noodles® de curry que me trouxe quando eu estava borocoxô, por ouvir meus desabafos que, por si só, fez com que fosse possível continuar. Agradeço à minha avó, Maria, por cada incentivo no decorrer desses anos, e por cada olhar orgulhoso que me direcionou quando conquistei momentos importantes.

Agradeço à minha família, por toda paciência quando eu estive irritada por noites sem dormir, por terem me incentivado até aqui, pelos momentos em que tentaram me auxiliar mesmo não sendo da área, na troca de conhecimento, assistindo prévias das minhas apresentações, fossem elas de congresso ou até mesmo de grupo. Obrigada por caminharem comigo nessa trajetória acadêmica que nunca se mostrou fácil.

Agradeço às famílias Faceto e Portella por toda torcida, disponibilidade em me receber em casa para que eu não passasse horas no trânsito de São Paulo e por cada momento em que cada um de vocês se interessou pela minha pesquisa e me incentivavam dizendo “eu não entendo, mas parece que está dando certo/é importante para você, então fico feliz que esteja empolgada”.

Agradeço ao meu orientador, professor Saulo Santesso Garrido, que prontamente me recebeu de braços abertos em 2022 e, desde então, me apaixonei pela área, fiquei para a pós-graduação e me aprofundei ainda mais nesse meio no decorrer desses dois anos.

Agradeço à minha coorientadora, professora Kelly Ishida, por ter me recebido em seu laboratório para a realização dos experimentos microbiológicos, ter cedido a linhagem *C. albicans* ATCC 10231 para os experimentos, por toda a paciência e suporte no processo de escrita deste documento e por todos os ensinamentos que recebi nos últimos 9 meses.

Agradeço ao grupo de pesquisa de Síntese, Estrutura e Aplicações de Peptídeos e Proteínas, pelos colegas de laboratório que tive durante esse tempo. Agradeço ao Crusca pelo suporte na parte de purificações e caracterizações dos peptídeos, à Gabriela Zolin pela ajuda na idealização do projeto, à Naiara Maia pelas sugestões experimentais e suporte com minhas purificações, às ICs Alícia Vendramini, Luísa Negreiros e Vitória Nozela que alegraram os meus dias trazendo mais energia ao laboratório. Agradeço também aos membros que hoje não estão mais presentes, mas fizeram parte da minha história no grupo: Gregório, Fauller, Isadora, Giovanna e Carolina, a pessoa que sugeriu o trabalho com duplicação pelo qual me apaixonei logo de cara.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Quimioterapia Antifúngica, pelo acolhimento e cada ensinamento que cada um me possibilitou aprender. Por cada confraternização, almoço no RU, cada ida ao Beco e cada bolo da empatia. Agradeço ao Daniel Freitas, não somente por ter sido minha banca na quali, mas por cada ensinamento enquanto estive no Brasil; à Cristina Spadari, por cada ensinamento, ajuda com o Prisma e com a microbiologia; à Larissa Dunkl, por cada almoço em lugar diferente, cada acolhimento no momento de surto, cada auxílio em discussões quando eu começava a falar sozinha enquanto tratava dados e por cada curva que você salvou; à Nathalia Lopes, por cada ida à Uehara atrás de um liptint, cada abraço quando eu estava precisando, cada ajuda e companhia quando estava insegura para o experimento que nunca tinha feito; à Andriéli Bacega, pelas palavras de conforto nesses últimos meses, por toda preocupação que demonstrou e pela torcida genuína.

Agradeço à Tatiana Reis, que foi tão importante nesses últimos 9 meses para que esse trabalho pudesse ser concluído. Além de ter aceitado ser minha suplente, agradeço por cada *reels* enviado, cada abraço recebido, cada palavra de acalento, cada vez que a cabra foi apertada, cada lembrança de que já estava acabando. Não tenho como mensurar como você foi importante para que esse trabalho e eu chegássemos até aqui.

Além dos nomes já citados que tiveram uma participação em grande escala ao longo desses últimos meses, agradeço às ICs Gabrielle e Fernanda, aos mestrandos Alex e Eunice, aos doutorandos Sabrina, Thayná, Letícia, Gislaine, Yuri, Murilo e Henrique, todos vocês fizeram parte em cada discussão aqui. Pude desenvolver este trabalho graças ao conhecimento microbiológico adquirido nesse laboratório, além de toda ajuda que recebi em cada análise estatística, cada reunião de grupo, cada dica referente ao procedimento experimental e, mais importante, por cada participação na prévia de minha apresentação. Toda discussão e levantamento agregou, e muito, para meu preparo, formação e capacitação profissional.

Agradeço aos meus amigos do ensino fundamental Ana Serafim, Edwin Renck, Thailiny Costa e Vitoria Cristina, aos meus amigos de ensino médio Luís Divino e Maria Fernanda, aos meus amigos de faculdade Fabio Diniz, Jaqueline Molina, Laura Dias e Pedro Franco, aos meus afilhados Gabriel Eugênio, Jean Dominique e Vinícius Miquelin, às alunas da 019, Gyovanna Marineli, e da 022, Manuella Dias. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental ao longo desses anos, independente da distância ou lugar em que cada um esteja, vocês continuam atuando de forma direta ou indireta em minha vida me dando forças nas minhas decisões!

Agradeço, em especial, ao Lucas de Oliveira, minha dupla desde 2018 na graduação e meu professor de orgânica nas horas vagas e nas horas não tão vagas assim. Obrigada por cada saída para tomar um sorvete quando estava desanimada e precisava relaxar mas não enxergava tempo para isso. Você, mais do que todos que estão presentes nesses agradecimentos, viu de perto cada etapa e cada processo até chegar nesse momento final. Sou imensamente grata por todo suporte, ajuda com ideias, opiniões na forma de escrita e de exposição de resultado. Nem se eu usasse o espaço completo para agradecimentos seria suficiente para representar o quanto eu sou grata por todos esses anos em que você foi minha companhia e a parte abstrata do meu cérebro amante de números.

Agradeço à minha banca, Cristina de Castro Spadari, por ter se disponibilizado para a avaliação deste trabalho, e professor Norival Alves Santos Filho, por novamente ter aceitado meu convite e estar presente, dessa vez, na avaliação de minha defesa de mestrado.

Agradeço à professora Fernanda Zanolli pela orientação e disponibilidade para ideias e sugestões referentes ao meu projeto.

Agradeço ao professor Reinaldo Marchetto pela disponibilidade em me ajudar quando estava com dificuldades referente à síntese de peptídeos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP Araraquara e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por ter me recebido como aluna e ter me permitido usufruir dos benefícios concedidos para seus estudantes.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Química pela manutenção e conservação do Instituto e aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas tanto pela manutenção e conservação do Instituto quanto pelos treinamentos ministrados aos novos alunos.

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

RESUMO

Dentre os fungos que se apresentam como patógeno humano, o gênero *Candida* se faz presente com aumento de número de casos de infecções que vão desde superficiais à sistêmicas, resultando em morte do hospedeiro. Por ser um agente colonizador de áreas mucocutâneas, *Candida albicans* assume sua forma patogênica ao menor sinal de alterações na homeostase do seu hospedeiro. Algumas linhagens desse microrganismo apresentam resistência ao fluconazol, medicamento amplamente utilizado no tratamento de suas infecções, dificultando assim seu combate. A fim de obter uma alternativa no tratamento antifúngico contra candidíase oral, o uso de peptídeos antimicrobianos apresenta-se como uma abordagem terapêutica. A histatina-5 é um peptídeo presente na saliva humana e possui atividade inibitória contra *Candida albicans*, contudo, é exposta a degradação proteolítica e pode perder sua eficácia. Utilizando então estudos que relatam a melhora na atividade antifúngica ao duplicar fragmentos da histatina-5 que contenham parte de seu domínio funcional, quatro peptídeos análogos a histatina-5 foram sintetizados e testados a fim de avaliar a sensibilidade de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231 frente a cada um. A síntese de cada peptídeo foi realizada em fase sólida, cada sequência foi purificada e caracterizada e sua atividade antimicrobiana foi avaliada. A CIM₉₀ obtida para *C. albicans* ATCC 90028 foi 80 µM, 80 µM e 15,6 µM; ATCC 18804 foi 160 µM, 80 µM e 31,2 µM e ATCC 10231 foi 80 µM, 40 µM e 15,6 µM para 0WHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 8WYKDimHst-5, respectivamente. A sequência 8WYKHst-5 não apresentou inibição nos ensaios. Os ensaios de cinética de crescimento demonstraram que, após 48 h, a sequência 0WHst-5 mantém 50% de inibição frente a *C. albicans* ATCC 18804 com 40 µM, 8WYKDuoHst-5 mantém aproximadamente 100% de inibição contra ATCC 10231 com 40 µM e 8WYKDimHst-5 mantém quase 100% de inibição contra ATCC 90028 e ATCC 10231 com 31,2 µM. Os três peptídeos também apresentaram capacidade de reduzir a atividade metabólica e a biomassa do biofilme de *C. albicans* em formação para as três linhagens estudadas. Como conclusão, o peptídeo 8WYKDimHst-5 demonstrou melhores resultados se comparado aos outros, em específico para a linhagem resistente a fluconazol, mostrando-se uma alternativa no combate a infecções resistentes.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Antibióticos peptídicos; Peptídeos catiônicos antimicrobianos.

ABSTRACT

Among the fungi that are human pathogens, *Candida* spp. is present with an emerging number of cases of infections ranging from superficial to systemic, resulting in host's death. As a colonizer agent of mucocutaneous areas, *Candida albicans* assumes its pathogenic form at the slightest sign of changes in the homeostasis of its host. Some strains of this microorganism are resistant to fluconazole, a drug widely used to treat its infections, thus making it difficult to combat. Pursuing an alternative in the antifungal treatment against oral candidiasis, the use of antimicrobial peptides is presented as a therapeutic approach. Histatin-5 is a peptide present in human saliva and has inhibitory activity against *Candida albicans*; however, it is exposed to proteolytic degradation and may lose its effectiveness. Considering studies that exhibit enhanced antifungal activity by duplicating histatin-5 fragments that contain part of its functional domain, four histatin-5-analog peptides were synthesized and tested to evaluate the sensitivity of *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804, and ATCC 10231 to each one. The synthesis of each peptide was performed in the solid phase, each sequence was purified and characterized, and its antimicrobial activity was evaluated. The MIC₉₀ obtained for *C. albicans* ATCC 90028 was 80 µM, 80 µM, and 15.62 µM; ATCC 18804 was 160 µM, 80 µM, and 31.25 µM; and ATCC 10231 was 80 µM, 40 µM, and 15.62 µM for 0WHst-5, 8WYKDuoHst-5, and 8WYKDimHst-5, respectively. The 8WYKHst-5 sequence showed no inhibition in the assays. Growth kinetics assays demonstrated that, after 48 h, the 0WHst-5 sequence maintains 50% inhibition against *C. albicans* ATCC 18804 with 40 µM, 8WYKDuoHst-5 maintained approximately 100% inhibition against ATCC 10231 with 40 µM, and 8WYKDimHst-5 maintained almost 100% inhibition against ATCC 90028 and ATCC 10231 with 31.2 µM. The three sequences also presented the ability to reduce the metabolic activity and the biomass of the *C. albicans* biofilm in formation for the three studied strains. To conclude, the 8WYKDimHst-5 peptide demonstrated better results if compared to the others, especially for the fluconazole-resistant strain, proving to be an alternative in combating resistant infections.

Keywords: *Candida albicans*; Antibiotic peptides; Antimicrobial cationic peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fungos classificados como prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde.....	16
Figura 2: Sítios de atuação de medicamentos e agentes antifúngicos atuais.	18
Figura 3: Linha do tempo na descoberta dos agentes antifúngicos utilizados na atualidade.....	20
Figura 4: Efeito do uso de antifúngicos na microbiota humana.	20
Figura 5: Reação de acoplamento.	25
Figura 6: Reação do Teste de Ninidrina.	27
Figura 7: Fluxograma do processo de síntese.	30
Figura 8: Cromatogramas dos peptídeos brutos e purificados.	39
Figura 9: Espectro de massas dos peptídeos purificados.	40
Figura 10: Microscopia de fluorescência de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 após exposição aos compostos.	43
Figura 11: Porcentagem de inibição dos peptídeos sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> obtidos por meio dos ensaios de susceptibilidade antifúngica realizadas com caldo SDB.	46
Figura 12: Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5.....	49
Figura 13: Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 18804 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5.....	50
Figura 14: Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5.....	51
Figura 15: Comparação da biomassa dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> em caldo Sabouraud dextrose após crescimento estático e em agitação.	52
Figura 16: Atividade metabólica dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> em formação expostos aos peptídeos análogos a histatina-5.....	53
Figura 17: Biomassa dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> em formação após exposição aos peptídeos análogos a histatina-5.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre a massa molar teórica e massa molar experimental para cada peptídeo. Os resultados estão expressos em g/mol.	40
Tabela 2: Susceptibilidade de linhagens <i>Candida albicans</i> aos peptídeos análogos a histatina-5 avaliados em RPMI. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ e $\mu\text{g/mL}$	44
Tabela 3: Susceptibilidade de linhagens de <i>Candida albicans</i> aos peptídeos análogos a histatina-5 avaliados em caldo Sabouraud dextrose. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ e $\mu\text{g/mL}$	45
Tabela 4: Classificação fungicida ou fungistática dos análogos avaliados em caldo Sabouraud Dextrose com base nas concentrações inibitórias e fungicidas mínimas.	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estrutura da histatina-5, seu domínio funcional P-113 e estruturas análogas a histatina-5.....	23
Quadro 2: Intervalos de concentração dos peptídeos e do fluconazol utilizados nos ensaios.	32
Quadro 3: Concentrações das substâncias avaliadas no ensaio de cinética de crescimento fúngico.	36
Quadro 4: Concentrações das substâncias avaliadas no ensaio de tratamento do biofilme de <i>C. albicans</i> em formação.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AFPs	<i>Antifungal peptides</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection®</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
C _i	Concentração inicial
CI ₅₀	Menor concentração para inibição de 50%
CI ₉₀	Menor concentração para inibição de 90%
C _f	Concentração final
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute®</i>
DCM	Diclorometano
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI-MS	<i>Eletron Spray ionization-Mass spectrometry</i>
FLC	Fluconazol
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
g	Grama
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
L	Litros
M	Molar (mol/L)
MM	Massa Molar (g/mol)
mg	Miligramas
mL	Mililitros
min	Minutos

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
nm	Nanômetros
OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
SDB	Caldo Sabouraud Dextrose
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
spp.	Espécies
T.A	Temperatura Ambiente
tBu	terc-Butil
TFA	Ácido Trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
UFC	Unidade formadora de colônia
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v	Volume
x	Veze

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
$\sim$	Aproximadamente
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ	Micro (10^{-6})
%	Porcentagem
®	Registrado
TM	<i>Trade Mark</i>

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	FUNGOS	15
1.1.1	<i>Candida albicans</i>	17
1.2	TRATAMENTO ANTIFÚNGICO	18
1.3	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	21
1.3.1	Histatina-5 e derivados	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS	24
3.1.1	Síntese de Peptídeos	24
3.1.2	Clivagem peptil-resina	28
3.1.3	Caracterização e Purificação de Peptídeos	30
3.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	31
3.2.1	Ensaio de Sensibilidade Antifúngica.....	31
3.2.1.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....</i>	32
3.2.1.1.1	<i>Preparo das Soluções Teste</i>	32
3.2.1.1.2	<i>Padronização do Inóculo Fúngico.....</i>	34
3.2.1.1.3	<i>Montagem dos Ensaios</i>	34
3.2.1.2	<i>Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....</i>	35
3.2.1.3	<i>Microscopia de Fluorescência.....</i>	35
3.2.2	Cinética de inibição de crescimento fúngico	36
3.2.3	Avaliação antifúngica dos peptídeos sobre do biofilme em formação de <i>Candida albicans</i>	37
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS	38
4.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	41
4.2.1	Atividade antifúngica dos peptídeos	41
4.2.2	Cinética de Inibição de Crescimento Fúngico.....	47
4.2.3	Atividade dos peptídeos sobre a formação dos biofilmes.....	52

5	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	57
	Anexo A – Estruturas Químicas dos Compostos Utilizados na Síntese e obtenção de Peptídeos	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS

Fungos são organismos eucariotos que podem ser classificados como bolores, cogumelos ou leveduras. São responsáveis por papéis fundamentais que se estendem desde a restauração de nutrientes ambientais a produtores de antibióticos na indústria farmacêutica (Madigan *et al.*, 2016; Case *et al.*, 2025; van Rhijn; Rhodes, 2025).

Os fungos, estimados em 2019 como aproximadamente 12 milhões de espécies, são diversos e apresentam capacidade de sobrevivência em condições variadas (Lopes; Lionakis, 2022; Wu *et al.* 2019). Dentre os membros do reino Fungi, cerca de 600 espécies são frequentemente identificadas como agente causador de infecções humanas, sendo responsáveis por cerca de 6,5 milhões de infecções invasivas por ano, além de 68% das mortes anuais (~2,5 milhões) (Brown *et al.*, 2024; Denning, 2024).

Nas últimas décadas houve o aumento na quantidade de fungos patógenos e, por mais que sejam apenas algumas centenas se comparado a existência de milhares de espécies fúngicas, o aumento da exposição humana a esses agentes virulentos tem se tornado uma preocupação de saúde pública (Brown *et al.*, 2024; Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023; Lopes; Lionakis, 2022).

Considerando a ameaça crescente que doenças fúngicas tem representado à saúde global, acompanhado de um aumento acelerado de fungos resistentes, dificuldade de acesso a diagnósticos e tratamentos corretos, a Organização Mundial da Saúde publicou, em 2022, um guia para direcionar ações de pesquisa e desenvolvimento com relação a patógenos fúngicos (WHO, 2022).

Dezenove espécies fúngicas foram ranqueadas e classificadas em três grupos de prioridade com base em sua resistência antifúngica, número de mortes, tratamentos comprovadamente eficazes, acesso a diagnóstico, incidência anual de casos e sequelas e complicações pós infecções (WHO, 2022), como definido na **Figura 1**.

 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetozoa causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figura 1: Fungos classificados como prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde.

A lista da esquerda refere-se ao grupo de prioridade crítica, seguida da prioridade alta e prioridade média.

Fonte: World Health Organization, 2022.

Doenças fúngicas invasivas (DFI) são causas crescentes de casos de morbidade e mortalidade ao redor do mundo. São mais comuns em pacientes que apresentam doenças imunológicas ou pessoas que estão hospitalizadas (Parsons; Diekema, 2023). Patógenos como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Mucorales*, além de outras espécies, contribuem com essas infecções (Sedik *et al.*, 2024).

A pandemia de Coronavírus (COVID-19) resultou em um aumento de casos de DFI em pacientes hospitalizados. Casos de candidíase e aspergilose dominaram a Europa, seguidas de mucormicose na Índia (Lass-Flörl; Steixner, 2023). Patógenos fúngicos são uma ameaça à saúde pública e seu diagnóstico é, muitas vezes, tardio e não conclusivo (Sedik *et al.*, 2024; WHO, 2022).

Dentre os patógenos fúngicos de prioridade crítica, a *Candida albicans* destaca-se por fazer parte da microbiota humana e não apresentar patogenicidade em pessoas saudáveis (Katsipoulaki *et al.*, 2024; Talapko *et al.*, 2021; WHO, 2022). Entretanto, ao haver o desequilíbrio na homeostase do hospedeiro, principalmente no sistema imunológico, por ser um agente oportunista, assume sua forma patogênica

filamentosa, instaura sua infecção tecidual e pode até invadir e disseminar-se para outros órgãos (Lopes; Lionakis, 2022).

1.1.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um organismo comensal oportunista que reside no microbioma humano em sua forma de levedura colonizando a boca, trato intestinal, pele e trato reprodutivo (Lass-Flörl *et al.*, 2024; Macias-Paz *et al.*, 2022). Fatores como imunossupressão, exposição prolongada a antibióticos e a uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), predisposição genética, idade avançada ou neonato e intervenções médicas que afetem a integridade da barreira mucocutânea causam o desequilíbrio na homeostase do hospedeiro favorecendo o supercrescimento fúngico (Askari *et al.*, 2025; Lass-Flörl *et al.*, 2024; Lopes; Lionakis, 2022).

Suas infecções são classificadas como mucocutâneas, que afetam a pele e membranas mucosas, ou invasivas, quando o fungo atinge a corrente sanguínea (candidemia) e dissemina-se para os demais órgãos, resultando em taxas de mortalidade de 40-70% (Talapko *et al.*, 2021; WHO, 2022). Por outro lado, as infecções mucocutâneas são mais comuns que infecções sistêmicas por afetarem primeiramente a mucosa vaginal, oral, esofágica, faríngea, intestinal além do sistema urinário (Lopes; Lionakis, 2022; Tamo, 2020).

O aumento de casos reportados de candidíase oral em pacientes imunocomprometidos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), diabéticos, oncológicos, fumantes, portadores de dentaduras, doenças periodontais ou alterações salivares (Carvalho *et al.*, 2026; Macias-Paz *et al.*, 2022) reforça a importância de atenção para infecções mucocutâneas causadas por *C. albicans* devido suas propriedades de adesão e seu nível de patogenicidade (Millsop; Fazel, 2016).

A candidíase oral apresenta, como uma de suas formas clínicas, placas esbranquiçadas cremosas na língua e na mucosa bucal (pseudomembranosa) com uma base de lesões vermelhas dolorosas (eritematosa). Infecções pseudomembranosas ocorrem normalmente em neonatos, pessoas anêmicas e imunodeficientes. (Carvalho *et al.*, 2026; Talapko *et al.*, 2021; Tamo, 2020)

Por tratar-se de um fungo oportunista polimórfico, sua alteração de microrganismo comensal à patogênico ocorre ao transicionar morfológicamente entre levedura e hifa. Sua forma de levedura geralmente associa-se a colonização e

disseminação enquanto sua forma de hifa é patogênica e invasiva, permitindo a invasão nas barreiras do hospedeiro (Lopes; Lionakis, 2022).

1.2 TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

O crescimento populacional de pessoas de risco, mudanças climáticas e ações humanas contribuem com o aumento de infecções fúngicas (Hoenigl *et al.*, 2024; Parsons; Diekema, 2023) e, atualmente, há limitações com relação ao tratamento antifúngico devido sua eficácia limitada. A resistência inata dos fungos ou até mesmo resistência adquirida, a dificuldade de penetração da medicação na célula e/ou os efeitos adversos aos pacientes além do limitado arsenal terapêutico (Hoenigl *et al.*, 2024; WHO, 2022) são desafios que exigem busca de medicamentos com novos mecanismos de ação.

As medicações existentes na atualidade apresentam mecanismos de ação que podem variar em sítios de atuação. A **Figura 2** esquematiza os locais em que a levedura é exposta aos medicamentos existentes e agentes com potencial antifúngico.

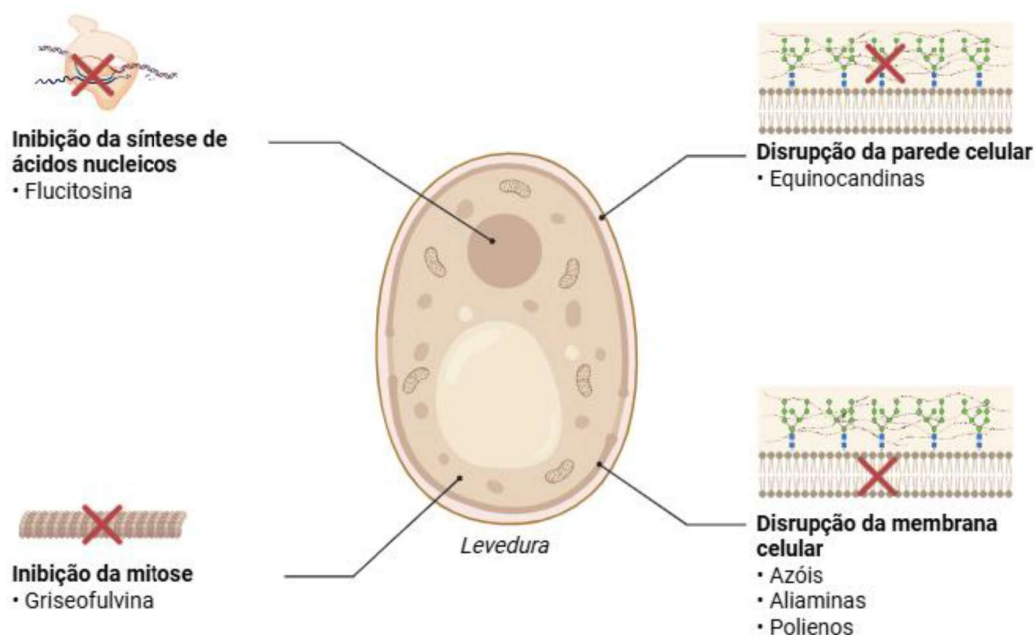


Figura 2: Sítios de atuação de medicamentos e agentes antifúngicos atuais.

Fonte: Encontrado em BioRender.com, 2025 – adaptada.

A griseofulvina é uma micotoxina eficaz no tratamento de fungos dermatófitos de diferentes espécies e atua inibindo a síntese dos ácidos nucleicos além da mitose celular do fungo (De Carli; Larizza, 1988). A flucitosina, por sua vez, é um composto análogo de pirimidina que se converte ao adentrar a célula fúngica,

atuando como um antimetabólito capaz de inibir a síntese de DNA e RNA (Fisher *et al.*, 2022; Tamo, 2020).

Os polienos, como anfotericina B e nistatina, são compostos que atuam ligando-se ao ergosterol na membrana celular fúngica. Como resultado, poros transmembranas são formados resultando na morte do fungo (Macias-Paz *et al.*, 2022; Tamo, 2020). Essa classe, por sua vez, é altamente tóxica ao ser humano devido à similaridade estrutural entre o ergosterol e colesterol, composto presente na membrana celular humana (Lee; Robbins; Cowen, 2023).

Ambas as classes dos azóis e aliaminas atuam na biossíntese de ergosterol, contudo, em diferentes estágios. As aliaminas atuam em um estágio inicial, inibindo a enzima esqualeno epoxidase, resultando no acúmulo de esqualeno e comprometendo a integridade da membrana (Lopes; Lionakis, 2022; van Rhijn; Rhodes, 2025).

Os azóis, como miconazol e fluconazol, são os antifúngicos mais utilizados no tratamento contra a candidíase e atuam na inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, bloqueando a conversão do lanosterol em ergosterol, acumulando esteróis metilados tóxicos que alteram a integridade da membrana. Por mais eficaz que seja, apresenta efeitos adversos que podem variar de simples a mais sérios (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Lopes; Lionakis, 2022; Tamo, 2020).

Por fim, as equinocandinas, como caspofungina e anidulafungina, inibem a enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, interrompendo a síntese do componente essencial da parede celular fúngica, β -1,3-glucana, resultando na perda de rigidez, desregulação osmótica e lise celular (Lopes; Lionakis, 2022; Macias-Paz *et al.*, 2022; Mathuria *et al.*, 2024; Tamo, 2020). São agentes fungicidas contra espécies de *Candida* (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Pfaller; Sheehan; Rex, 2004).

O arsenal terapêutico antifúngico atual é limitado e suas descobertas podem ser consideradas recentes, como esquematizado pela **Figura 3**. Os fármacos utilizados são divididos em quatro classes principais, sendo os polienos, azóis, equinocandinas e pirimidinas (WHO, 2022). Ao avaliar infecções sistêmicas causadas por *Candida*, a classe dos azóis, polienos e equinocandinas são utilizadas como principais tratamentos (McCarty; White; Pappas, 2021; Talapko *et al.*, 2021). Já para infecções de candidíase oral, o tratamento é realizado com nistatina, polieno de uso tópico, miconazol, azol de uso tópico, e fluconazol via oral (Katsipoulaki *et al.*, 2024).

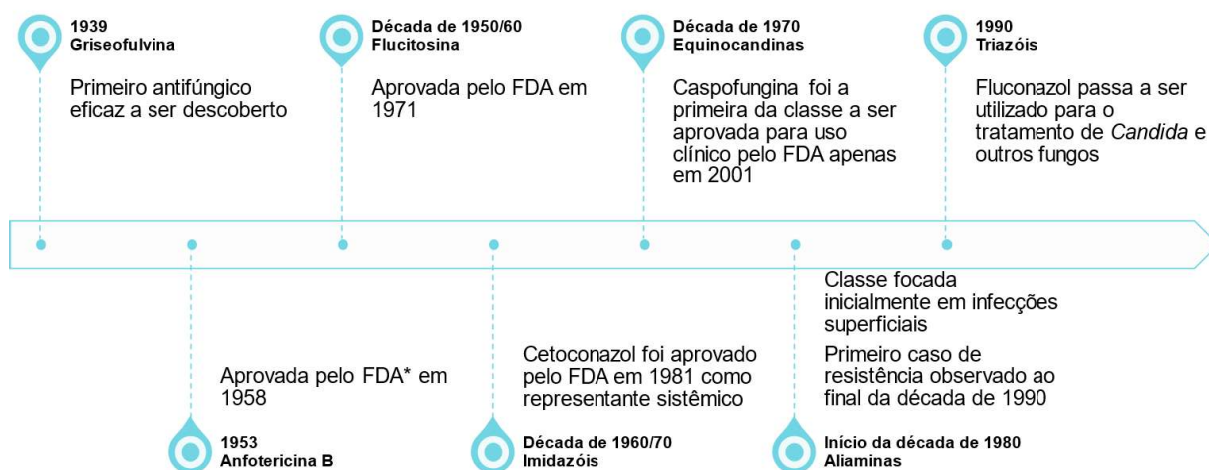


Figura 3: Linha do tempo na descoberta dos agentes antifúngicos utilizados na atualidade.

*FDA: Food and Drug Administration, agência regulatória dos Estados Unidos.

Fonte: Eksi; Gayyurhan; Balci, 2013; Lopes; Lionakis, 2022; Mathuria *et al.*, 2024; van Rhijn; Rhodes, 2025.

A resistência apresentada pelos fungos pode ser de caráter intrínseco (primária) ou adquirido (secundária). A resistência primária apresenta-se de forma natural no fungo e se relaciona à fisiologia geral enquanto a resistência adquirida desenvolve-se em algumas linhagens que obtiveram a habilidade de resistir à atividade ao antifúngico ao qual eram sensíveis (Lass-Flörl; Steixner, 2023).

O corpo humano apresenta populações fúngicas em sua microbiota que consiste em linhagens sensíveis e resistentes à medicamentos. Contudo, ao expor tais grupos aos antifúngicos, mutações genéticas podem ser ativadas e patógenos resistentes são selecionados (Lass-Flörl; Steixner, 2023), como demonstrado na **Figura 4**.

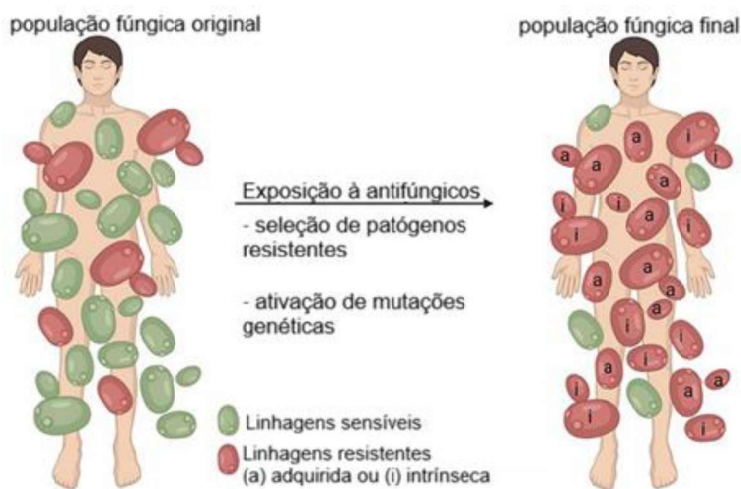


Figura 4: Efeito do uso de antifúngicos na microbiota humana.

Fonte: Lass-Flörl; Steixner, 2023 – adaptada.

Considerando então o crescimento de patógenos, muitas vezes resistentes a mais de uma medicação, faz-se necessário avanços em novas terapias antifúngicas (Parsons; Diekema, 2023). Visando alternativas cujos efeitos adversos nos pacientes sejam reduzidos e dificulte a aquisição de resistência, sensibilizando diferentes linhagens, peptídeos antimicrobianos (PAMs), incluindo os peptídeos antifúngicos (PAFs), começaram a ser estudados.

1.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos são moléculas compostas por aminoácidos produzidos por quase todos os organismos vivos (Satchanska; Davidova; Gergova, 2024). Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são definidos como peptídeos de defesa do hospedeiro e são cruciais para a imunidade inata, protegendo-o contra invasões patogênicas (Nayab *et al.*, 2022; Roque-Borda *et al.*, 2025; Seyfi *et al.*, 2019).

PAMs são, em sua maioria, catiônicos e anfifílicos, facilitando sua interação com membranas microbianas, adotando assim conformações como α -hélice, folhas- β ou estruturas estendidas (Roque-Borda *et al.*, 2025; Zare-Zardini; Salehi; Seyedjavadi, 2025).

Os peptídeos antifúngicos (AFPs), por sua vez, representam um subconjunto de PAMs com atividade contra fungos. Sua forma de atuação difere-se de antifúngicos convencionais pois AFPs utilizam a estratégia de múltiplos alvos, podendo atuar na ruptura de membrana, inibição da síntese de parede celular, disfunção mitocondrial e indução a estresse oxidativo (Chadha, 2023; Roque-Borda *et al.*, 2025; Zare-Zardini; Salehi; Seyedjavadi, 2025).

1.3.1 Histatina-5 e derivados

A histatina-5 (Hst-5) pertence à família das histatinas, sequências ricas em histidinas e presentes na saliva humana (Oppenheim *et al.*, 2012; Perez-Rodriguez *et al.*, 2022; Puri; Edgerton, 2014; Usman; You; Waseem, 2025).

O interesse nas histatinas ocorreu na década de 1980, coincidindo com a epidemia de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A recorrência de candidíase oral em indivíduos imunocomprometidos possibilitou a identificação das histatinas como primeira linha de defesa essencial contra *Candida albicans* (Puri; Edgerton, 2014; Zambom *et al.*, 2025). A Hst-5 é o subproduto da clivagem proteolítica da Histatina-3 e apresenta maior atividade antifúngica dentre os membros de sua

classe (Han *et al.*, 2016; Oppenheim *et al.*, 2012; Perez-Rodriguez *et al.*, 2022; Usman; You; Waseem, 2025).

A Hst-5 apresenta ação fungicida contra espécies do gênero *Candida*, sendo altamente eficaz contra *Candida albicans*. Reduz a patogenicidade fúngica ao inibir a transição levedura-hifa (Han *et al.*, 2016; Puri; Edgerton, 2014); apresenta mecanismo de ação intracelular; liga-se a receptores da parede celular e, ao ser transportada para o interior da célula, apresenta ação mitocondrial e causa o desequilíbrio osmótico celular devido a perda de íons K⁺ e ATP (Han *et al.*, 2016; Perez-Rodriguez *et al.*, 2022; Puri; Edgerton, 2014; Zambom *et al.*, 2025); além de ligar-se a metais como cobre e zinco, potencializando assim sua atividade através da hiperacumulação de metais tóxicos no fungo (Campbell *et al.*, 2023; Puri; Edgerton, 2014).

Além da atividade antifúngica, a Hst-5 participa da formação de uma película protetora nos dentes, apresenta efeito bactericida contra patógenos orais e auxilia na cicatrização de feridas ao estimular a migração de células epiteliais (Puri; Edgerton, 2014; Usman; You; Waseem, 2025; Zambom *et al.*, 2025).

O domínio funcional da Hst-5, uma sequência de 12 resíduos de aminoácidos conhecido como P-113 (AKRHHGYKRKFH), apresenta uma atividade igual ou superior ao se comparar com o poder inibitório de seu precursor com sequência completa (Rothstein *et al.*, 2001). Tal descoberta permitiu que, ao avaliar o aspecto fisiológico, histatinas nativas que se encontram na cavidade oral podem sofrer clivagem enzimática e gerar derivados com atividades biológicas melhoradas. Já a segunda conclusão refere-se a importância clínica e como essa descoberta possibilitou novas explorações de peptídeos bioativos para tratamentos terapêuticos (Oppenheim *et al.*, 2012).

Dessa forma, a sequência 8WYKHst-5 é proposta seguindo a estratégia de utilização do potencial antifúngicos de fragmentos derivados da Hst-5, como reportado por Zambom e colaboradores (2025), e contém resíduos de aminoácido pertencentes ao domínio funcional da Hst-5. Almejando então uma atividade superior se comparado às encontradas por Zambom e colaboradores (2025), a estratégia proposta por Lin e colaboradores (2016) de duplicação da sequência do fragmento 8WYKHst-5 também é implementada, contudo, de duas formas distintas, sendo uma sequência de duplicação linear e outra sequência de duplicação ramificada.

Por fim, para avaliar a atividade dos peptídeos com suas sequências duplicadas se comparado ao análogo de Hst-5 (0WHst-5) e a seu precursor 8WYKHst-

5, todos os compostos serão expostos a três linhagens de *Candida albicans*, sendo elas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231. As sequências conhecidas e propostas estão dispostas no **Quadro 1** e apresentam o resíduo de triptofano em seu grupo amino-terminal apenas para quantificar a emissão de luz pois tal resíduo apresenta fluorescência.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Registro na literatura
Hst-5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY	Oppenheim <i>et al.</i> , 1988
P-113	AKRHHGYKRKFH	Rothstein <i>et al.</i> , 2001
0WHst-5	WDSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY	Zambom <i>et al.</i> , 2019
8WYKHst-5	WYKRKFHEK	-
8WYKDuoHst-5	WYKRKFHEKYKRKFHEK	-
8WYKDimHst-5	WYKRKFHEK-K _{CONH₂} WYKRKFHEK	-

Quadro 1: Estrutura da histatina-5, seu domínio funcional P-113 e estruturas análogas a histatina-5. Estrutura peptídica base para as sequências propostas e seu respectivo registro na literatura, além de seus análogos sintetizados e estudados neste trabalho.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar e avaliar peptídeos análogos à histatina-5 como uma alternativa antifúngica no tratamento frente *Candida albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sintetizar, caracterizar e purificar os peptídeos propostos;
- 2) Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos propostos sobre linhagens de *Candida albicans*;
- 3) Avaliar a cinética de inibição do crescimento de *Candida albicans* na presença dos peptídeos propostos;
- 4) Avaliar a atividade inibitória dos peptídeos propostos sobre a formação de biofilmes de *Candida albicans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS

3.1.1 Síntese de Peptídeos

Para a obtenção dos peptídeos, o protocolo de síntese utilizado foi a Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS), descrita por Merrifield em 1963 no qual os aminoácidos são adicionados um por vez até que o peptídeo de interesse esteja completo. Para um crescimento orientado da cadeia, os grupos funcionais dos aminoácidos, assim como seus grupos α -amínicos, são protegidos com protetores removíveis a fim de não ocorrer nenhuma reação paralela que interfira na obtenção do peptídeo proposto.

Como grupo protetor da cadeia lateral, um ácido-lábil é utilizado atuando de forma permanente até o final da síntese. Os grupos α -amínicos, por sua vez, possuem grupos protetores temporários para que sua remoção seja possível a cada etapa de acoplamento. O grupo protetor utilizado foi uma base-lábil que permite sua desproteção por meio de uma solução básica.

As sínteses utilizaram a estratégia química 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)/tercbutil (tBu) (Atherton *et al.*, 1978), agentes acopladores N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), sendo a base-lábil o grupo protetor Fmoc e o ácido-lábil o grupo protetor tBu e foram realizadas com L- α -aminoácidos. As estruturas químicas dos compostos anteriores e das resinas utilizadas estão dispostas no **ANEXO A**.

Reações de acoplamento exigem a presença de agentes acopladores para que o grupo carboxílico do Fmoc-aminoácido a ser adicionado seja ativado, possibilitando assim a ligação peptídica entre ele e o grupo α -amínico do L- α -aminoácido já acoplado, conforme **Figura 5**.

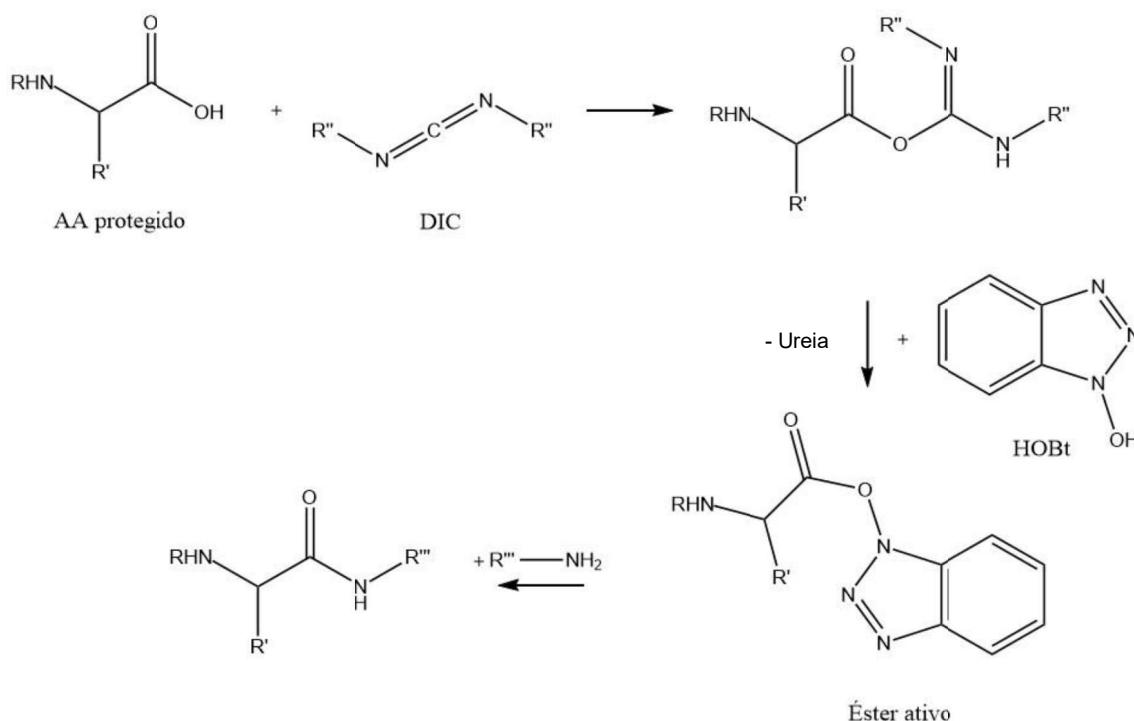


Figura 5: Reação de acoplamento.

Reação de acoplamento (SN₂) no qual o aminoácido protegido a ser adicionado sofre a ativação no grupo carboxílico, possibilitando a ligação peptídica com a sequência já formada. Os compostos DIC e HOBt são agentes acopladores.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2025).

Para a síntese manual de peptídeos em fase sólida, os Fmoc-aminoácidos e agentes acopladores DIC e HOBt foram utilizados com um excesso molar de 3 vezes (x) o grupo amina presente na resina, com exceção da sequência ramificada que utilizou o excesso molar de 6x. A resina do tipo Wang com o primeiro aminoácido acoplado foi pesada, em balança analítica, para as sequências 0WHst-5, 8WYKHst-5 e 8WYKDuoHst-5.

Para a sequência 8WYKDimHst-5 a resina do tipo Rink amida foi pesada, em balança analítica, e foi utilizado, também, o resíduo de aminoácido Fmoc-Lis-Fmoc, possibilitando assim a síntese de duplicação ramificada.

O cálculo inicial baseou-se em sua equivalência molar se comparado ao grau de substituição presente em 1 grama (g) de resina, por meio da Equação 1:

$$x = \frac{m_{\text{resina}}(g) \cdot \text{grau de substituição} \left(\frac{\text{mmol}}{g} \right)}{1 g} \quad (1)$$

O fator de correção para o excesso molar de 3x ou 6x é calculado por:

$$y = x(\text{mmol}) \cdot 3 \text{ ou } y = x(\text{mmol}) \cdot 6 \quad (2)$$

Para calcular a massa do agente acoplador HOBt, o valor de y é utilizado:

$$m_{HOBt} = MM_{HOBt} \cdot y \quad (3)$$

O uso do valor de y se repete para calcular o volume do agente acoplador DIC:

$$V_{DIC} = \frac{MM_{DIC} \cdot y}{\rho_{DIC}} \quad (4)$$

Por fim, para a massa dos Fmoc-aminoácidos a ser utilizado durante a síntese, a equação é:

$$m_{AA} = MM_{AA} \cdot y \quad (5)$$

A resina pesada foi triplamente lavada de forma intercalada com N,N-Dimetilformamida (DMF) e Diclorometano (DCM) (1:1, v:v). Após, os grupos protetores Fmoc foram removidos por meio de uma solução de 20% 4-metilpiperidina em DMF (v/v) por 20 minutos (min). A reação ocorreu na capela com um volume de solução de desproteção equivalente a $\frac{1}{3}$ do volume total da seringa em que a síntese foi realizada. O processo de lavagem tripla intercalada foi repetido e a adição do aminoácido seguinte da sequência pôde ser realizada.

Para a confirmação de que a desproteção ou o acoplamento foi efetivo, utiliza-se o teste de Ninidrina (teste de Kaiser). O teste baseia-se em sua sensibilidade aos grupos amina livres, detectando aminas primárias ou secundárias, adquirindo assim uma coloração roxo-azulado (roxo de Ruhemann) ao ser submetido à altas temperaturas. A ninidrina reage com a amina livre por meio da reação representada na **Figura 6**.

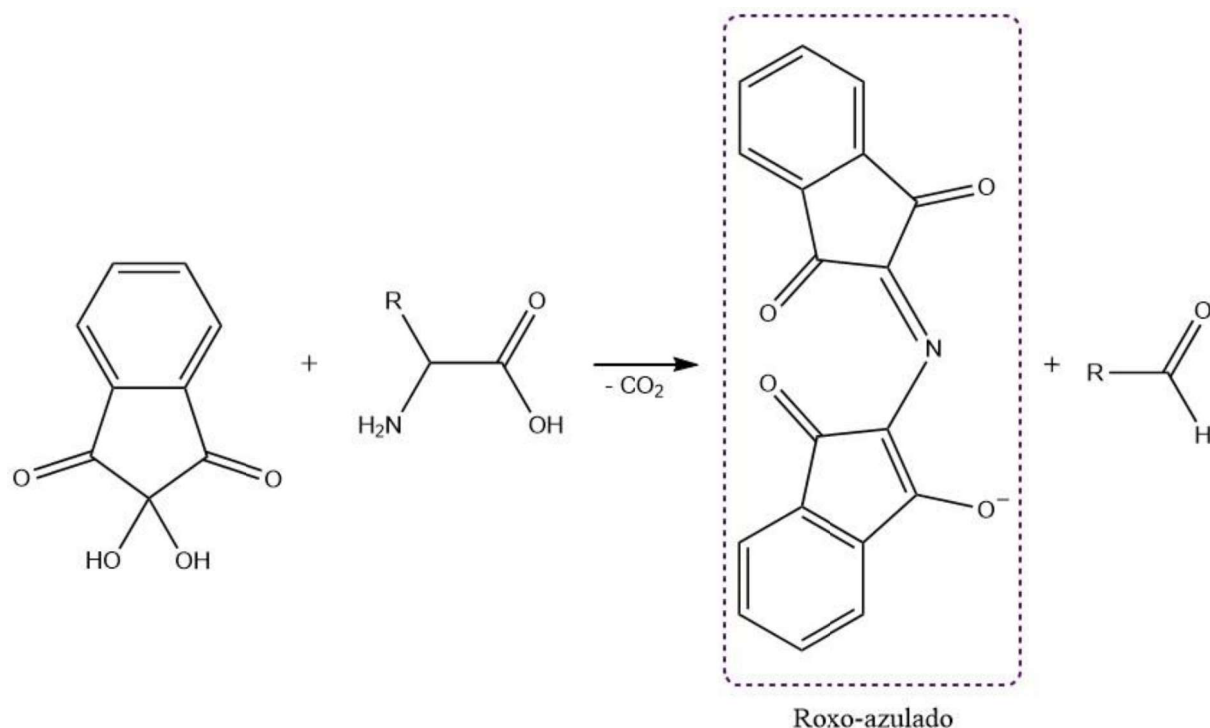


Figura 6: Reação do Teste de Ninidrina.

A ninidrina, em contato com aminas primárias ou secundárias livres, forma um ânion de cor roxo-azulado intenso.

Fonte: adaptada de Reaxys - ScienceDirect, acessado em 2025.

A menor quantidade possível de resina foi retirada da seringa em que ocorria o processo de síntese e foi adicionada em um tubo de ensaio pequeno. No tubo, então, foram adicionadas duas gotas de solução A (2 mL de KCN 0,001M + 98 mL de piridina), duas gotas de solução B (5 g de ninidrina + 100 mL de etanol absoluto) e duas gotas de solução C (80 g de fenol + 20 mL de etanol absoluto), e, então, o tubo de ensaio contendo a resina foi levado à estufa por 4 min à aproximadamente 100°C.

Com a desproteção do grupo Fmoc, a amina livre reagiria com a ninidrina e a coloração roxo-azulado intenso era observada. Então, para o acoplamento, a massa de HOBt, massa de L-α-aminoácido e o volume de DIC obtidos pelas Equações 3, 5 e 4, respectivamente, foram dissolvidos em DMF/DCM (1:1, v:v) e a solução foi vertida na seringa em que ocorria a síntese. Após 2 horas (h) de reação em temperatura ambiente (T.A.), o processo de lavagem tripla foi realizado e, em seguida, o Teste de Ninidrina foi novamente aplicado.

Para a confirmação de acoplamento, o processo de teste citado acima foi repetido e, ao retirar o tubo da estufa, a solução deveria manter-se amarela clara, comprovando a ausência de amina livre.

Caso o acoplamento não tivesse ocorrido, seria necessário reacoplar o L- α -aminoácido, contudo, com um excesso molar pela metade. Com o acoplamento confirmado, a adição do próximo L- α -aminoácido ocorreu na seringa, como descrito anteriormente.

A síntese é um processo cíclico de acoplamentos e desproteções, tendo no intervalo entre essas etapas os processos de lavagem tripla da peptil-resina com solventes intercalados entre si a fim de remover subprodutos e prevenir reações intermediárias.

Ao término da adição do último resíduo de aminoácido da sequência peptídica de interesse, o processo de desproteção foi realizado novamente e a peptil-resina foi lavada com metanol por várias vezes e deixada para secar à vácuo até que os grânulos se desprendessem totalmente entre si e da parede da seringa.

3.1.2 Clivagem peptil-resina

A peptil-resina, após secagem a vácuo e mantida *overnight* em dissecador, foi transferida para um frasco de cintilação e pesada em balança analítica para obtenção do peptídeo bruto.

O coquetel de clivagem utilizou como base a massa final, tendo como relação 1 mL de solução para cada 100 mg de peptil-resina. A solução utilizada levou 2,5% de água destilada (v/v), 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) (v/v) e 95% de Ácido Trifluoracético (TFA) (v/v), e foram adicionados ao frasco de cintilação na respectiva ordem.

A reação ocorreu em capela por 3h e o frasco permaneceu tampado, coberto com papel alumínio e sob agitação branda de aproximadamente 150 rotações por minuto (rpm). Ao término da reação, 10 mL de éter etílico gelado foi vertido no frasco para precipitação do peptídeo. A suspensão foi vertida em um tubo de centrifuga de 50 mL e, novamente, uma nova lavagem com 10 mL de éter etílico gelado foi realizada, vertendo esse segundo volume ao mesmo tubo de centrifuga. O tubo foi armazenado em banho de gelo ou freezer por 2h, com o intuito de garantir a precipitação completa do peptídeo bruto.

Após as 2h, foi retirado o tubo de centrifuga do gelo, agitado vigorosamente e centrifugado por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante (precaução) foi retirado com uma pipeta de Pasteur, reservando-o em um novo tubo de centrifuga de 50 mL. O precipitado que se encontrava no tubo foi lavado novamente com 5 mL de éter etílico

gelado, mantendo o tubo no gelo por 5 min. Depois, foi agitado vigorosamente e centrifugado por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante do tubo foi retirado com a pipeta de Pasteur e reservado no frasco de precaução.

O processo de lavagem foi realizado por 3x. Após última lavagem com éter, o tubo ficou aberto na capela *overnight* para evaporação completa de éter. A separação final entre o peptídeo bruto e a resina foi iniciada utilizando uma solução de 10% de Acetonitrila (ACN) em água destilada (v/v). No tubo foi adicionado 5 mL de solução de ACN 10% e agitado vigorosamente. Foi centrifugado por 10 min a 5.000 rpm e o sobrenadante do tubo foi retirado com uma pipeta de Pasteur e adicionado em uma seringa com filtro para não permitir passagem de nenhum grânulo de resina. A solução peptídica foi filtrada em um balão de fundo redondo de 250 mL.

O processo de lavagem foi realizado por ~7x ou até que a resina apresentasse uma tonalidade branca/amarela clara, tendo assim a maior parte do peptídeo dissolvido em solução de ACN. A solução peptídica diluída foi então levada ao rotaevaporador e concentrada até pelo menos metade do volume obtido, em um intervalo de 40° a 60 °C.

A solução concentrada foi vertida em um tubo de centrifuga de 50 mL, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 2 dias. O peptídeo bruto obtido foi um sólido branco volumoso, sendo necessário sua caracterização e sua purificação para que fosse utilizado. A SPFS pode ser resumida em pontos chaves descritos no fluxograma da **Figura 7**.

Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

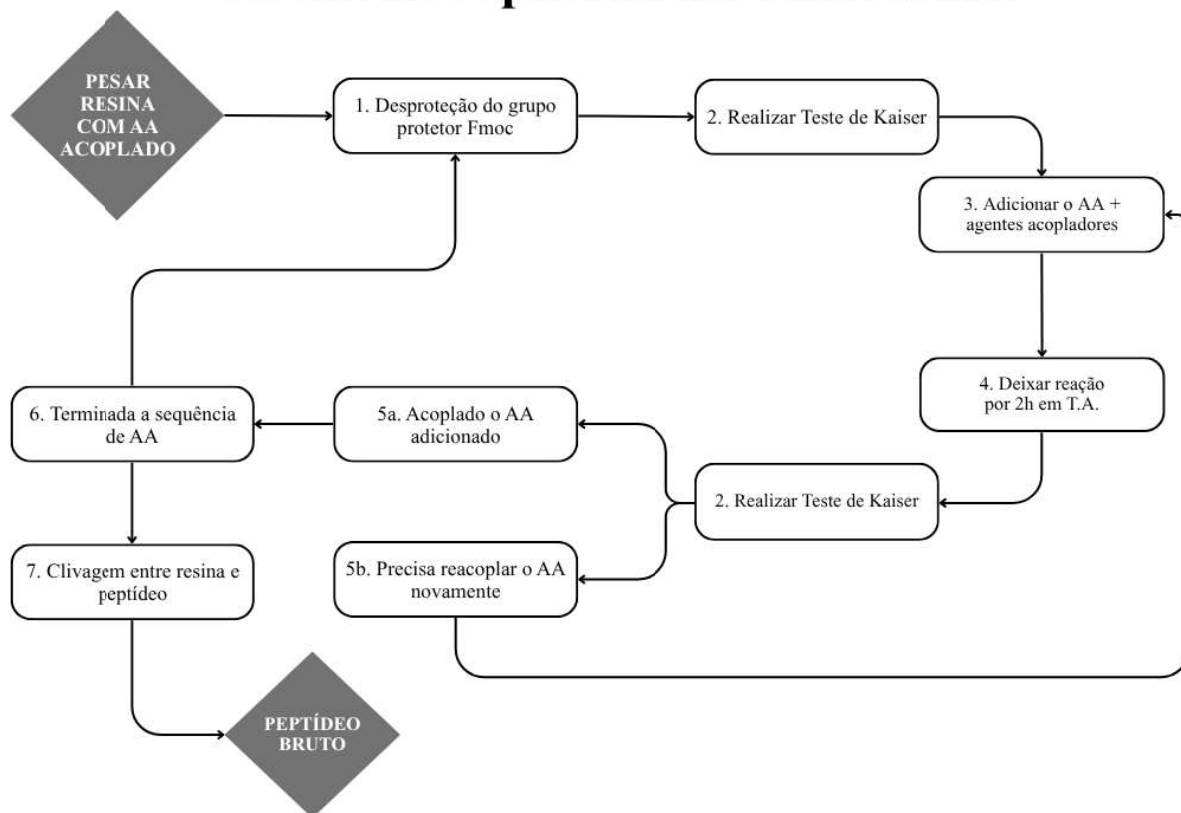


Figura 7: Fluxograma do processo de síntese.

O processo de SPFS inicia-se com a pesagem da resina a ser utilizada na síntese e segue as etapas 1, 2, 3, 4. Após o processo 4, a etapa 2 é repetida e há duas opções. Na opção 5a, o aminoácido foi acoplado com sucesso, podendo avaliar se aquele foi o último da sequência. Caso tenha sido, o caminho segue para a etapa 7 e a síntese é finalizada. Se não foi o último aminoácido da sequência, as etapas de 1 a 4 se repetem. A opção 5b, por sua vez, demonstra quando o acoplamento do aminoácido não foi efetivo, sendo necessário repetir então as etapas 3 e 4.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2025).

3.1.3 Caracterização e Purificação de Peptídeos

O peptídeo bruto foi dissolvido em solvente A (0,045% TFA/H₂O) e purificado por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no modo semi-preparativo em uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 mm x 250 mm e 5 µm). Foi utilizado o solvente A (0,045% TFA/H₂O, v/v) e solvente B (0,036% TFA/ACN, v/v) com um gradiente de 0,33%/min de Solvente B por 90 min a um fluxo de 5 mL/min nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm, detectando ligação peptídica e o resíduo triptofano (W), respectivamente.

A análise qualitativa foi realizada em modo analítico utilizando uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 mm x 150 mm e 5 µm) por meio de um sistema de separação Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector UV/Vis Shimadzu LC-10A/47A. Foram utilizados o solvente A e solvente B com um gradiente de 5% a 95%

de solvente B por 30 min, a um fluxo de 0,6 mL/min nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm.

A caracterização do peptídeo puro foi realizada por um espectrômetro de massas Amazon SL *Ion Trap* da Brucker® acoplado ao cromatógrafo, pelo modo de ionização por eletrospray (LC/ESI-MS⁺) (Zambom *et al.*, 2019; Zambom *et al.*, 2025).

3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

As linhagens de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804, ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 estavam estocadas em meio *brain heart infusion* (BHI, BD Difco™) com 20% de glicerol a -80°C. Para a reativação dos microrganismos, em um fluxo laminar, 5 mL de meio Sabouraud Dextrose (SDB, BD Difco™) estéril foram adicionados em 4 tubos de centrifuga também estéreis de 50 mL. Os criotubos contendo os fungos foram retirados do -80°C e, juntamente no fluxo laminar, 10 µL do estoque de cada linhagem foi transferido à um tubo de centrifuga que continha SDB, com sua devida identificação.

O estoque permanente foi então devolvido ao -80°C e os tubos foram incubados sob agitação de 150 rpm por 24h a 35°C. Após 24h, as suspensões fúngicas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e semeadas em placas estéreis já solidificadas de Sabouraud Dextrose Ágar (SDA, BD Difco™) com 50 µg/mL de cloranfenicol (CAS: 56-75-7, Sigma-Aldrich), por meio de estriamento por esgotamento para crescimento de colônias isoladas e a placa mantida em refrigerador de 4-8°C.

Para a realização dos ensaios, foram necessários dois crescimentos consecutivos por 24h a 35°C para garantir que os microrganismos apresentassem seu metabolismo ideal.

3.2.1 Ensaio de Sensibilidade Antifúngica

Os ensaios de sensibilidade foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato e de poliestireno utilizando como base o método de referência M27-A4 (CLSI, 2017) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) dos peptídeos. Algumas adaptações foram realizadas ao método, a fim de comparar protocolos e resultados:

- Uso do meio caldo Sabouraud dextrose (SDB) e RPMI-1640 tamponado com MOPS 0,16 M (RPMI);

- Leitura de resultados: escala de leitura visual utilizando o controle não tratado (nt) como base e leitura complementar da densidade óptica (D.O.) a 530 nm utilizando o leitor de placas.

3.2.1.1 **Determinação da Concentração Inibitória Mínima**

Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, com duplicata experimental, nos dois meios de cultura. Em cada replicata biológica foram utilizados os dois meios de cultura das quais 4 linhagens de *Candida* (*C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804, ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019) foram avaliadas frente a atividade dos peptídeos-teste e o antifúngico padrão fluconazol (FLC) para controle de qualidade do ensaio.

3.2.1.1.1 **Preparo das Soluções Teste**

As substâncias estudadas, ao serem adicionadas nas placas, apresentaram uma concentração 4x maior à concentração de interesse final. Os intervalos de concentração utilizados estão dispostos no **Quadro 2**.

Substância	Solução de trabalho	Intervalo de Concentração	Microrganismo
0WHst-5 8WYKHst-5 8WYKDuoHst-5	1280 µmol/L	0,62 – 320 µmol/L	<i>Candida albicans</i>
8WYKDimHst-5	1000 µmol/L	0,49 – 250 µmol/L	<i>Candida albicans</i>
Fluconazol	128 µg/mL	0,062 – 32 µg/mL	<i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i>

Quadro 2: Intervalos de concentração dos peptídeos e do fluconazol utilizados nos ensaios.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

➤ Fluconazol (FLC)

A solução estoque de FLC foi preparada de forma concentrada, no qual 6,5 mg de FLC (CAS: 86386-73-4, Sigma-Aldrich) foi pesado em balança analítica e dissolvido em 1 mL de DMSO para obtenção de uma solução estoque a 6,5 mg/mL. A solução foi armazenada em alíquotas de 200 µL a -20°C.

➤ Peptídeos

Os peptídeos liofilizados foram aliquotados em microtubos e armazenados a -20°C. As soluções peptídicas foram preparadas somente no dia do experimento para que os compostos bioativos não fossem degradados. As massas foram previamente calculadas e pesadas em balança analítica e dissolvidas em RPMI ou SDB nos volumes que seriam utilizados para o experimento.

Os peptídeos e FLC foram dissolvidos e diluído, respectivamente, em meio de cultura seguindo as Equações 6 e 7.

$$Concentração_{inicial} \cdot Volume_{inicial} = Concentração_{final} \cdot Volume_{final} \quad (6)$$

$$[Concentração_{final}] = \frac{massa_{peptídeo}}{Massa\ Molar_{peptídeo} \cdot Volume_{final}} \quad (7)$$

Ou seja, sabendo que a solução da substância a ser testada é adicionada apenas na primeira coluna, e apenas 50 µL são utilizados, foi preparado, para cada leva de 4 placas por meio, os seguintes volumes finais de solução 4x mais concentrada:

- FLC: 500 µL de uma solução de 128 mg/mL;
- Peptídeos: 350 µL de uma solução de 1280 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e 1000 µM para 8WYKDimHst-5.

Para o preparo da solução de FLC, partindo da solução estoque, foi utilizado a Equação 6.

$$6.500 \cdot 10^{-6} \cdot V_{i_{FLC\ estoque}} = 128 \cdot 10^{-6} \cdot 500 \rightarrow V_{i_{FLC\ estoque}} = 9,85\ \mu L$$

$$V_{solução\ final} - V_{solução\ FLC\ estoque} = V_{solução\ meio\ de\ cultura} \rightarrow 500 - 9,85 = 490,15\ \mu L\ de\ meio$$

As soluções peptídicas, por sua vez, baseiam-se na massa pesada para serem preparadas. Utilizando então a Equação 7, o valor teórico de massa necessária para o preparo das soluções variou para cada peptídeo, sendo elas:

$$0WHst - 5: 1280 \cdot 10^{-6} = \frac{m \cdot 10^{-3}}{3222,5 \cdot 350 \cdot 10^{-6}} \rightarrow m_{0WHst-5} = 1,44\ mg$$

$$8WYKHst - 5: 1280 \cdot 10^{-6} = \frac{m \cdot 10^{-3}}{1321,53 \cdot 350 \cdot 10^{-6}} \rightarrow m_{8WYKHst-5} = 0,59\ mg$$

$$8WYKDuoHst - 5: 1280 \cdot 10^{-6} = \frac{m \cdot 10^{-3}}{2438,83 \cdot 350 \cdot 10^{-6}} \rightarrow m_{8WYKDuoHst-5} = 1,09 \text{ mg}$$

$$8WYKDimHst - 5: 1000 \cdot 10^{-6} = \frac{m \cdot 10^{-3}}{2751,2 \cdot 350 \cdot 10^{-6}} \rightarrow m_{8WYKDimHst-5} = 0,96 \text{ mg}$$

3.2.1.1.2 Padronização do Inóculo Fúngico

Com o auxílio de uma alça, pelo menos 5 colônias isoladas de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804, ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram retiradas de suas respectivas placas em SDA e foram suspendidas em microtubos com 1 mL de solução salina 0,9% (NaCl/H₂O, m/v). Os microtubos de 1,5 mL foram agitados vigorosamente por 15 segundos e 5 µL dessa suspensão foi transferida para microtubos de 1,5 mL que continham 495 µL de solução de formaldeído 4% em H₂O (v/v).

Os microtubos com formaldeído foram agitados vigorosamente por 15 segundos e 10 µL dessa suspensão foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Os inóculos de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram padronizados por meio da contagem de células realizadas na Neubauer para que a concentração fúngica final fosse 1x10⁶ UFC/mL em solução salina 0,9%.

A suspensão de inóculo padronizada em 1x10⁶ UFC/mL foi, inicialmente, agitada veementemente por 15 segundos e, então, diluída em uma razão de 1:20, no qual 50 µL foram transferidos à um novo microtubo com 950 µL de solução salina. A segunda diluição foi realizada com meio de cultura na razão de 1:50, tendo como base a relação de 20 µL de inóculo 1:20 e 980 µL de meio de cultura, variando esses volumes com base no V_f de inóculo a ser usado nas placas. Dessa forma, a concentração do inóculo adicionado na placa foi de 1x10³ UFC/mL.

3.2.1.1.3 Montagem dos Ensaios

Após a preparação dos peptídeos-teste e do inóculo fúngico padronizado, o ensaio de microdiluição foi realizado conforme descrito a seguir.

Oito placas estéreis de 96 poços de fundo chato e de poliestireno foram utilizadas, das quais 4 placas continham RPMI e outras 4 continham SDB. As placas foram montadas em fluxo laminar, tendo como primeira etapa a adição de 50 µL de meio nas colunas de 1 a 11 e, na coluna 12, 100 µL de meio foram adicionados. Depois, houve a adição de 50 µL de solução peptídica ou FLC, somente nos seus

respectivos poços demarcados da coluna 1. Uma diluição seriada na razão 1:2 (v:v) foi realizada até a coluna 10 de tal forma que todos os poços se mantivessem com um volume de 50 µL e, ao chegar na coluna 10, os 50 µL em excesso foram desprezados.

Houve, por fim, a adição de 50 µL, em todos os poços das colunas 1 a 11, do inóculo fúngico a 1×10^3 UFC/mL em meio de cultura como previamente preparado. Os resultados foram avaliados ao término de 24h de incubação estática a 35°C após a ressuspensão das leveduras. Os métodos de leitura envolvidos foram o visual e pela determinação de densidade ótica a 530 nm em leitor de microplaca Epoch 2 (BioTek®). Foram determinadas as menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI_{50} e CI_{90} , respectivamente), que pôde ser calculada através da Equação 8.

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \left(\frac{DO_{\text{poço}} - DO_{\text{meio de cultura}}}{DO_{\text{controle positivo}} - DO_{\text{meio de cultura}}} \right) \right) \cdot 100\% \quad (8)$$

3.2.1.2 **Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Após o ensaio de microdiluição em caldo, subcultivos foram realizados para determinar se os peptídeos apresentavam ação fungistática ou fungicida nos dois meios de cultura. Para tal, após a ressuspensão das leveduras da microplaca, foram transferidos 10 µL da suspensão de cada poço a partir do que apresentava menor concentração em que 90% do crescimento fúngico foi inibido (CI_{90}). Os poços de controle não tratado também foram transferidos à placa de Petri.

As placas foram incubadas por 24h a 35°C. Ao término da incubação, o crescimento fúngico foi avaliado de forma visual. Caso não houvesse crescimento, o peptídeo apresentaria potencial ação fungicida.

3.2.1.3 **Microscopia de Fluorescência**

Devido a pouca quantidade celular na suspensão do controle não tratado, o protocolo metodológico foi adaptado para que as fotos pudessem ser realizadas. Após o separo dos subcultivos para ensaio de CFM, as amostras foram coradas na própria placa de 96 poços.

Foi adicionado, nos poços que apresentava concentração final de 160 µM, o volume de 20 µL de uma solução de calcoflúor 1 mg/mL e, a fim de evitar maiores perdas da amostra, a etapa de lavagem não foi realizada. As lâminas avaliadas foram referentes aos compostos 0WHst-5, 8WYKHst-5 e 8WYKDuoHst-5.

3.2.2 Cinética de inibição de crescimento fúngico

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo chato e de poliestireno foi avaliado o crescimento fúngico das linhagens de *C. albicans* e *C. parapsilosis* ao serem expostos aos compostos do presente estudo. O meio de cultura e as concentrações das substâncias teste foram escolhidos com base nos resultados obtidos no ensaio de CIM.

O preparo das substâncias teste e a padronização do inóculo seguiram as metodologias descritas nos itens **3.2.1.1.1** e **3.2.1.1.2**, respectivamente, com a alteração nas concentrações dos compostos estudados, como demonstrado no **Quadro 3**.

Substância	Concentrações	Microrganismo
0WHst-5 8WYKHst-5 8WYKDuoHst-5	40, 160 e 320 µmol/L	<i>Candida albicans</i>
8WYKDimHst-5	31,25, 125 e 250 µmol/L	<i>Candida albicans</i>
Fluconazol	1 e 4 µg/mL	<i>Candida albicans</i>
Fluconazol	0,0625 – 8 µg/mL	<i>Candida parapsilosis</i>

Quadro 3: Concentrações das substâncias avaliadas no ensaio de cinética de crescimento fúngico.
Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Em uma placa de 96 poços de fundo chato de poliestireno estéril, foram adicionados 50 µL de meio SDB em cada poço da placa de cultura, com exceção dos poços referentes ao controle de esterilidade (C-), que foi adicionado 100 µL.

Posteriormente, foi adicionado 50 µL das soluções dos compostos com uma concentração 4x a de interesse final. Então, os 50 µL de inóculo a 1×10^3 UFC/mL foram adicionados aos seus respectivos poços a fim de completar o volume de 100 µL em cada, incluindo o controle não tratado do microrganismo (nt).

Ao terminar a montagem, a placa foi incubada no leitor de placas Epoch 2 (BioTek®) por 48 h a 35°C em agitação constante para que a leitura de absorbância (530 nm) fosse realizada a cada hora.

3.2.3 Avaliação antifúngica dos peptídeos sobre do biofilme em formação de *Candida albicans*

Para que os biofilmes fossem formados, o inóculo de cada linhagem de *C. albicans* foi preparado a 1×10^6 UFC/mL em meio SDB. Então, em uma placa de 96 poços de fundo chato e de poliestireno estéril, foi adicionado 100 µL da suspensão de leveduras nos poços e a placa foi incubada a 35°C por 1,5 h de forma estática.

Após o término da etapa de adesão, os poços foram lavados uma vez com uma solução salina 0,9% e 100 µL da solução dos peptídeos ou o FLC foi adicionado em cada poço, seguindo a relação do **Quadro 4**. A placa foi incubada novamente por 24 h de forma estática a 35°C. Os compostos e concentrações utilizados nessa etapa foram escolhidos com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores.

Substância	Concentrações
0WHst-5	40, 160 e 320 µmol/L
8WYKDuoHst-5	40, 160 e 320 µmol/L
8WYKDimHst-5	31,25, 125 e 250 µmol/L
Fluconazol	4 µg/mL

Quadro 4: Concentrações das substâncias avaliadas no ensaio de tratamento do biofilme de *C. albicans* em formação.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Após o tempo de incubação, os poços com biofilmes foram lavados 2x com PBS para a quantificação do biofilme por meio de duas avaliações colorimétricas. Uma averiguou a atividade metabólica das células sésseis por meio do uso do sal sódico de XTT. A outra, por sua vez, averiguou a quantidade de biomassa total de biofilme formado através do uso de uma solução de Cristal Violeta 0,2%.

A primeira avaliação realizada usou o sal de sódio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) (CAS:111072-31-2, Sigma-Aldrich) para que as células sésseis fossem quantificadas de forma colorimétrica por meio de sua atividade metabólica. Após a lavagem, foi adicionado uma alíquota de 150 µL de uma solução de 0,1 mg/mL XTT/10 µM menadiona em PBS em cada poço. A placa foi incubada, protegida da luz, por 2h a 35°C e, ao término do tempo, foi transferido 100

μL do sobrenadante de cada poço para uma nova placa e sua absorbância avaliada a 490 nm no leitor de placas Epoch 2.

A segunda avaliação colorimétrica utilizou uma solução de Cristal Violeta 0,2% em água destilada (m/v) que permitiu quantificar a biomassa total de biofilme em cada poço. Após a lavagem, o biofilme foi fixado com 100 μL de metanol por 15 min, T.A. O metanol foi removido e deixado para secagem (*overnight*, T.A.). Foi adicionado, então, 100 μL de cristal violeta 0,2% e incubado por 20 min, T.A. O corante foi retirado e os poços foram lavados 3x com água destilada.

Após as lavagens, o corante foi solubilizado com 150 μL de ácido acético 33% em água destilada (v/v) por 5 min e 100 μL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma nova placa e sua absorbância foi lida a 590 nm no leitor de placas Epoch 2.

Para as duas quantificações os dados de densidade ótica e porcentagem de inibição nos ensaios de atividade metabólica (XTT/menadiona) e da biomassa total (coloração com cristal violeta) foram plotados na forma de gráficos.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para os dados obtidos foram avaliadas usando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com). O nível de confiança de 95% foi considerado significativo para todas as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos brutos foram, inicialmente, purificados e caracterizados a fim de confirmar o êxito da síntese de peptídeos em fase sólida. A **Figura 8** demonstra os cromatogramas de cada sequência.

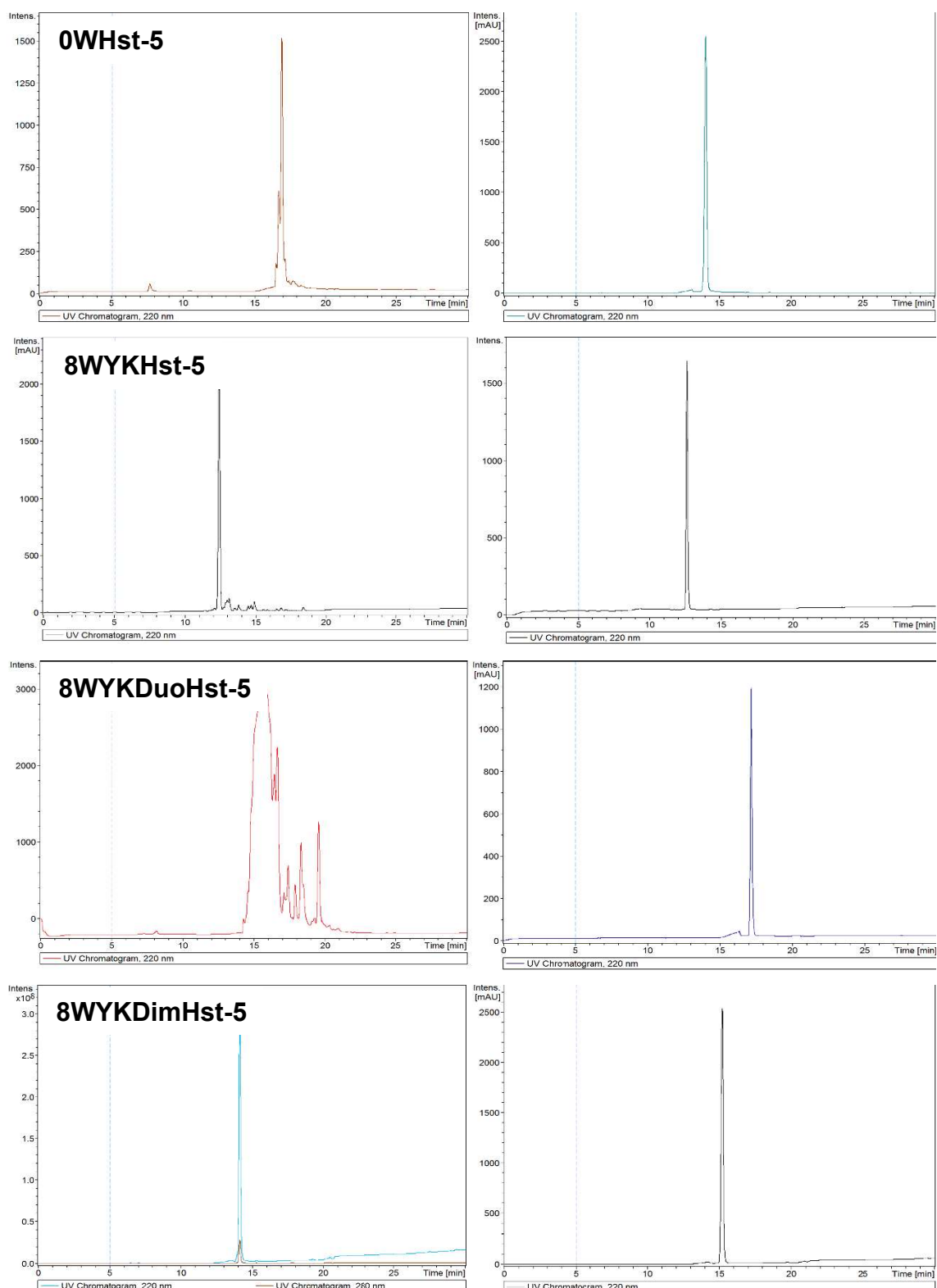


Figura 8: Cromatogramas dos peptídeos brutos e purificados.
Cromatograma referente ao análogo bruto e purificado, respectivamente.
Fonte: elaborado pelo próprio autor (2025).

Para confirmação da obtenção da sequência desejada, utiliza-se do valor teórico da massa molar de cada sequência a fim de compará-la com o obtido pelo

espectro de massas de cada peptídeo, **Figura 9**, pela razão m/Z . As razões permitiram os cálculos de massa molar experimental, **Tabela 1**, possibilitando assim a caracterização do composto.

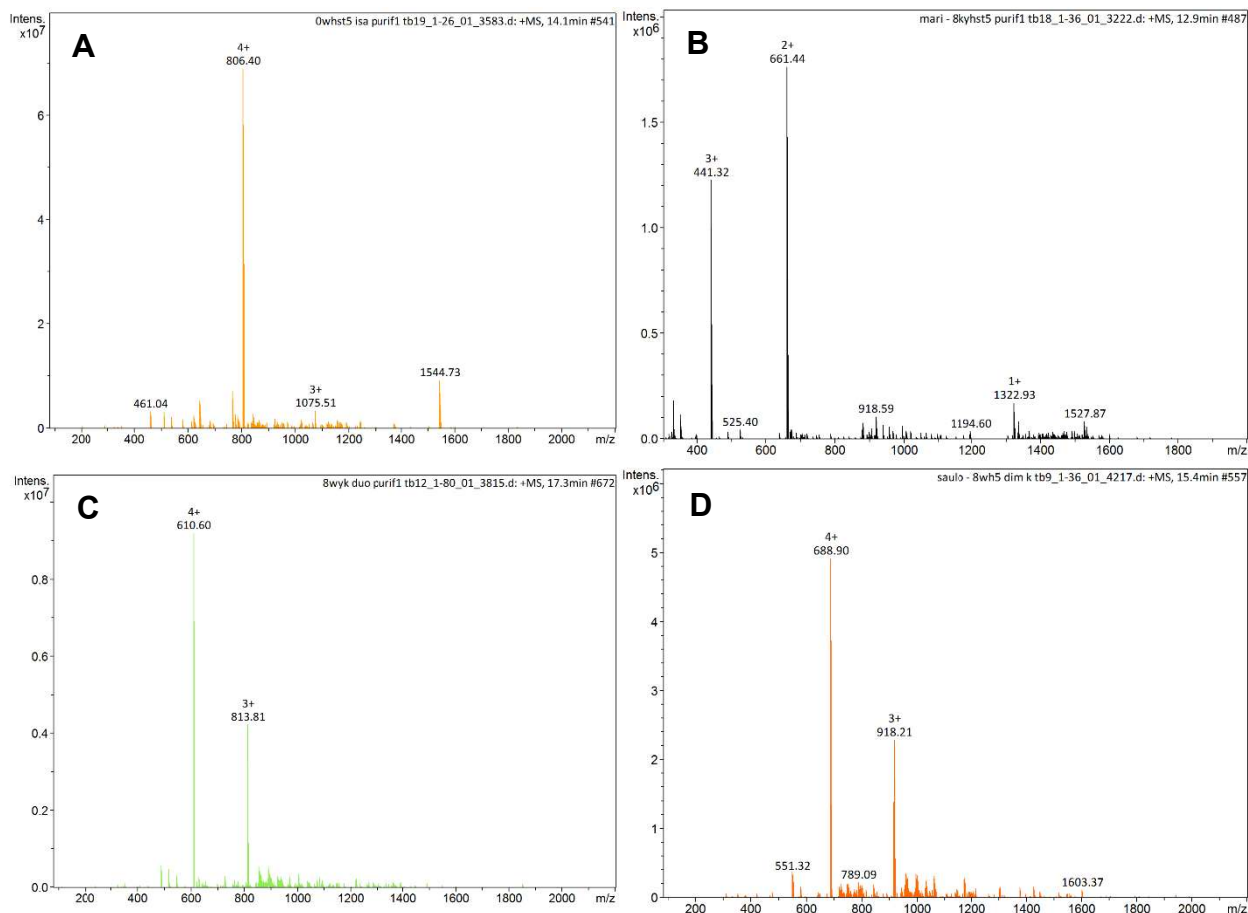


Figura 9: Espectro de massas dos peptídeos purificados. Espectros referente a (A) 0WHst-5, (B) 8WYKHst-5, (C) 8WYKDuoHst-5 e (D) 8WYKDimHst-5. **Fonte:** elaborado pelo próprio autor (2025).

Tabela 1: Comparação entre a massa molar teórica e massa molar experimental para cada peptídeo. Os resultados estão expressos em g/mol.

Sequência	Carga (Z)	MM/Z _{teórica}	MM/Z _{experimental}	MM _{teórica} (g/mol)	MM _{experimental} (g/mol)
0WHst-5	+ 3	1.075,17	1.075,51	3.222,5	3.222,56
	+ 4	806,62	806,40		
8WYKHst-5	+ 1	1.322,53	1.322,93	1.321,53	1.321,26
	+ 2	661,76	661,44		
8WYKDuoHst-5	+ 3	813,94	813,81	2.438,83	2.438,42
	+ 4	610,71	610,60		
8WYKDimHst-5	+ 3	918,07	918,21	2.751,20	2.751,62
	+ 4	688,80	688,90		

Fonte: elaborado pelo próprio autor (2025).

Ao avaliar as massas experimentais obtidas, foi possível concluir que todos os peptídeos propostos foram sintetizados e, por meio de seus cromatogramas, as sequências apresentaram pureza maior que 90%, comprovando assim a obtenção de bons resultados por meio da metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida.

4.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Atividade antifúngica dos peptídeos

Os valores da moda dos resultados obtidos através dos ensaios de CIM e de CFM dos peptídeos propostos frente aos microrganismos estudados estão dispostos na **Tabela 2** e

Tabela 3, obtida em meio RPMI e caldo Sabouraud dextrose, respectivamente.

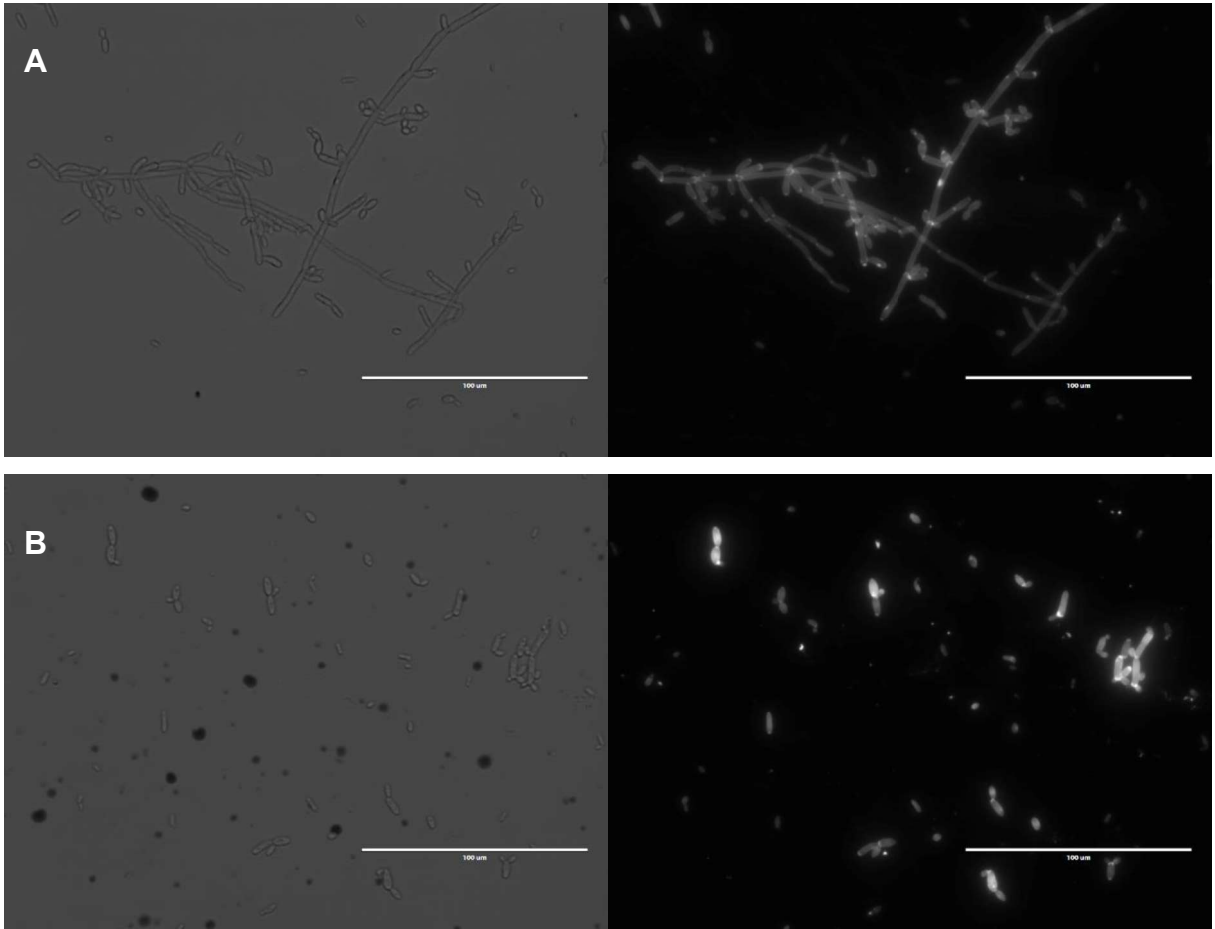
Não foi possível observar inibição do crescimento de *C. albicans* tratados com análogos da histatina-5 (Hst-5) nas concentrações testadas em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com MOPS, enquanto o fluconazol apresentou inibição em concentrações esperadas (**Tabela 2**). Utilizando como referência o material complementar M60 (CLSI, 2017), ao avaliar o gênero *C. albicans*, uma linhagem é sensível ao composto FLC caso seu valor de CIM₉₀ seja ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ e resistente caso seu valor seja ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de incubação. As linhagens ATCC 90028 e ATCC 18804 são linhagens sensíveis enquanto ATCC 10231 é resistente ao agente antifúngico padrão testado (ATCC®, 2023).

O meio RPMI é padrão para os testes de sensibilidade aos antifúngicos em diferentes protocolos (CLSI, EUCAST e outros). Esse meio é rico em L-aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos. Em pH 7,0, os grupos laterais dos L-aminoácidos presentes tornam-se agentes iônicos, carregados positiva ou negativamente, sendo um possível fator na influência frente a atividade inibitória dos peptídeos derivados da Hst-5.

A tentativa de avaliar compostos carregados positivamente em um meio eletronicamente denso pode ter atuado na atividade peptídica e, por consequência, feito com que não fosse possível observar atividade inibitória durante os ensaios. Contudo, ao analisar a capacidade de filamentação das linhagens estudadas ao serem cultivadas em RPMI, os peptídeos 0WHst-5, 8WYKHst-5 e 8WYKDuoHst-5 conseguiram reduzir tal característica em *C. albicans* ATCC 90028.

A Hst-5 possui a capacidade de impedir a mudança morfológica de levedura para hifa (Han *et al.*, 2016; Puri; Edgerton, 2014) em *C. albicans*, sendo possível explicar a redução na filamentação ao ser exposta a um meio rico, como demonstrado na **Figura 10**. Contudo, o fato de a atividade se estender ao fragmento 8WYKHst-5 e sua duplicação linear, quando não foi observado nenhuma atividade inibitória, foi um resultado positivo. Apesar do resultado preliminar, estudos são necessários para averiguação e confirmação da atividade citada para os análogos da Hst-5, não tendo sido realizado no decorrer deste projeto.

A redução de filamentação foi observada a partir de 80 $\mu\text{mol/L}$ para 0WHst-5 e 8WYKHst-5 enquanto para a sequência 8WYKDuoHst-5, tal comportamento foi observado a partir de 10 $\mu\text{mol/L}$.



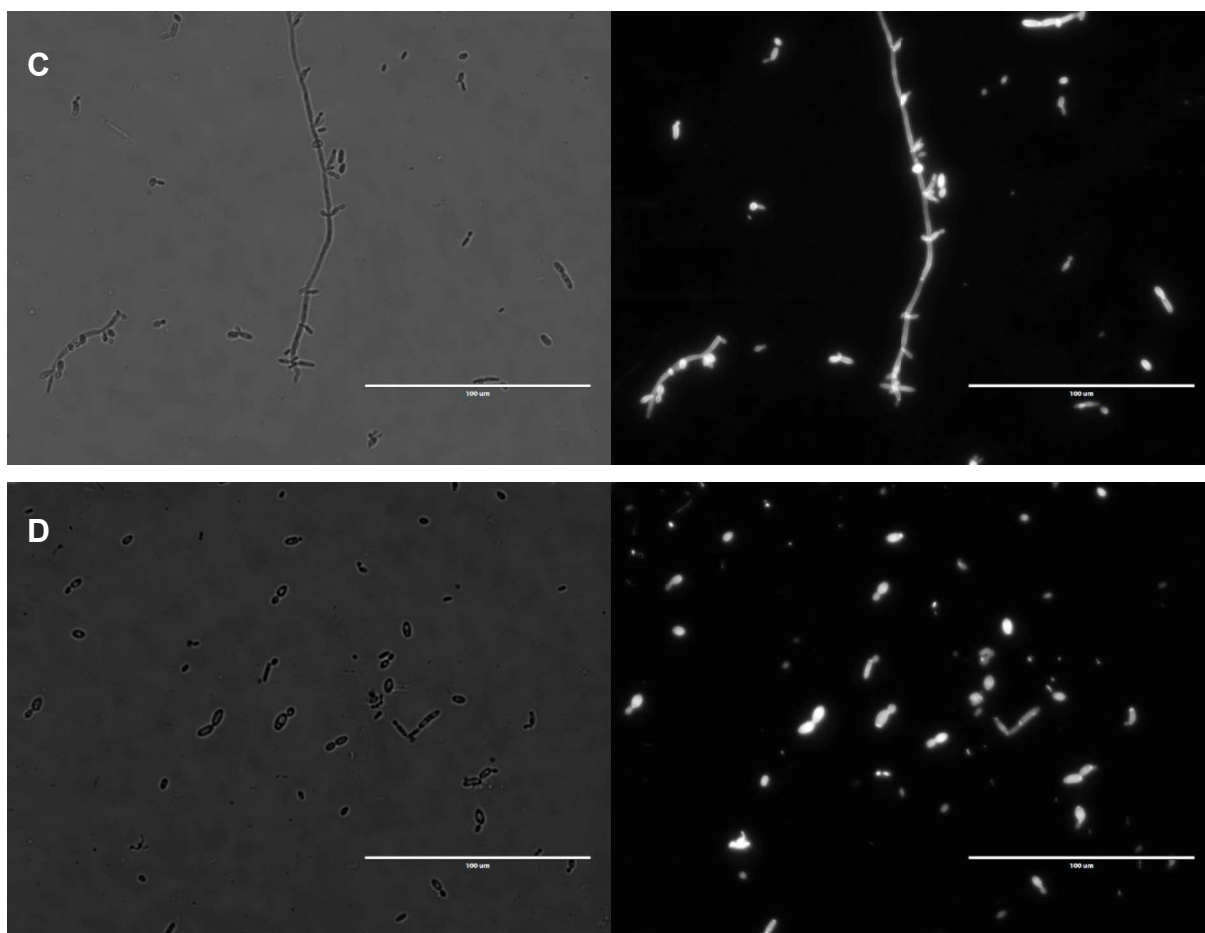


Figura 10: Microscopia de fluorescência de *C. albicans* ATCC 90028 após exposição aos compostos. As imagens expressas ao lado esquerdo foram fotografadas em luz branca e ao lado direito com o filtro DAPI em preto e branco e em (A) é possível observar o controle não tratado, (B) exposto a 160 μ M de 0WHst-5, (C) exposto a 160 μ M de 8WYKHst-5 e (D) exposto a 160 μ M de 8WYKDuoHst-5. Todas as fotos em luz branca foram editadas com brilho em 37 e contraste em 14 e todas as fotos em preto e branco foram editadas com brilho em 52 e contraste em 14 pelo Adobe Photoshop.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2025).

Tabela 2: Susceptibilidade de linhagens *Candida albicans* aos peptídeos análogos a histatina-5 avaliados em RPMI. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ e $\mu\text{g/mL}$.

Substâncias	<i>C. albicans</i> ATCC 90028			<i>C. albicans</i> ATCC 18804			<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
0WHst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	n. d.		
8WYKHst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	n. d.		
8WYKDuo Hst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	n. d.		
8WYKDim Hst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	n. d.		
FLC ($\mu\text{g/mL}$)	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	16	$\leq 0,06$	0,5	> 32	16	> 32	> 32	0,25	1	2

n.d.: Não Determinado

CI₅₀: menor concentração que inibe 50% do crescimento fúngico

CI₉₀: menor concentração que inibe 90% do crescimento fúngico

CFM: concentração fungicida mínima

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Quando avaliamos a atividade antifúngica dos peptídeos em caldo Sabouraud dextrose, foi possível observar que os peptídeos conseguiram inibir o crescimento de *C. albicans* nas concentrações testadas. Dentre os peptídeos, 8WYKDimHst-5 foi o que inibiu em menores concentrações CI₅₀ e CI₉₀ (7,81-31,25 μM).

Tabela 3: Susceptibilidade de linhagens de *Candida albicans* aos peptídeos análogos a histatina-5 avaliados em caldo Sabouraud dextrose. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ e $\mu\text{g/mL}$.

Substâncias	<i>C. albicans</i> ATCC 90028			<i>C. albicans</i> ATCC 18804			<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
0WHst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	80	80	160	80	160	160	80	80	160	n. d.		
8WYKHst-5 ($\mu\text{mol/L}$)	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	> 320	n. d.		
8WYKDuoH st-5 ($\mu\text{mol/L}$)	80	80	320	80	80	80	40	40	80	n. d.		
8WYKDimH st-5 ($\mu\text{mol/L}$)	7,81	15,62	15,62	31,25	31,25	62,5	7,81	15,62	31,25	n. d.		
FLC ($\mu\text{g/mL}$)	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	16	0,5	1	> 32	16	> 32	> 32	0,5	4	4

n.d.: Não Determinado

CI₅₀: menor concentração que inibe 50% do crescimento fúngico

CI₉₀: menor concentração que inibe 90% do crescimento fúngico

CFM: concentração fungicida mínima

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Os resultados obtidos pelos ensaios realizados em caldo SDB puderam ser compilados e suas respectivas atividades puderam ser calculadas por meio da Equação 8. Destaca-se, portanto, a maior porcentagem de inibição, chegando a aproximadamente 100% para o peptídeo 8WYKDimHst-5 em concentrações maior ou igual a 15,62 μM para todas as linhagens de *C. albicans*, incluindo a linhagem resistente ao FLC ATCC 10231.

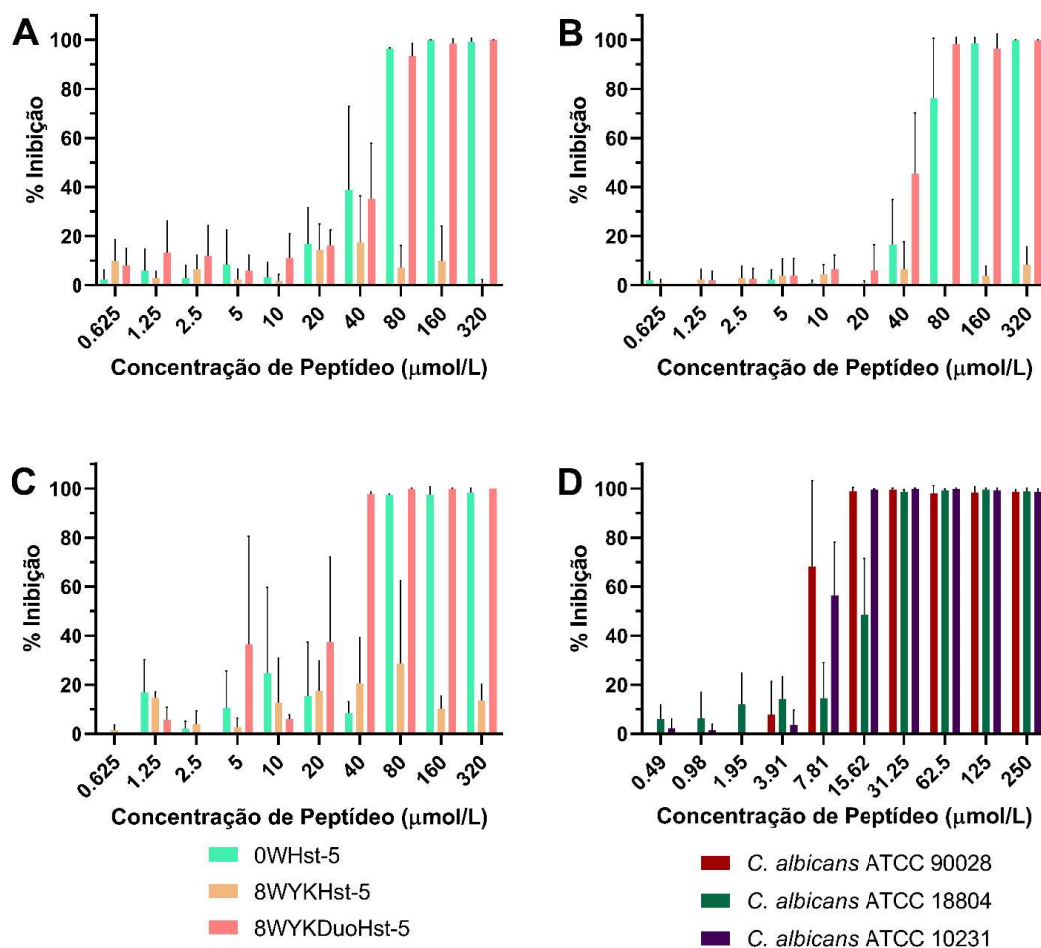


Figura 11: Porcentagem de inibição dos peptídeos sobre o crescimento de *Candida albicans* obtidos por meio dos ensaios de susceptibilidade antifúngica realizadas com caldo SDB.

Os gráficos representam a inibição peptídica calculada em cada concentração avaliada frente a *C. albicans* (A) ATCC 90028, (B) ATCC 18804 e (C) ATCC 10231. (D) Inibições referentes ao peptídeo 8WYKDimHst-5 frente a cada linhagem. Os cálculos foram realizados a partir da média biológica das densidades óticas, obtendo a %inibição média $\pm$ DP.

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Ao avaliar os gráficos dispostos na **Figura 11**, é possível comparar os resultados obtidos pela sequência 0WHst-5 deste trabalho com resultados anteriores reportados por Zambom e colaboradores (2025). De acordo com Zambom *et al.* (2025), 0WHst-5 apresentou inibição de 75% para *C. albicans* ATCC 90028 e maior que 80% para *C. albicans* ATCC 18804 com 20 μM de peptídeo, enquanto para *C. albicans* ATCC 10231 não foi possível observar nenhuma atividade inibitória em concentrações inferiores a 80 μM . Esses percentuais de inibição obtidos nas mesmas linhagens não foram observados, neste trabalho, para as linhagens não resistentes.

O peptídeo 8WYKHst-5 não apresentou atividade significativa ao ser incubado por 24h. Por mais que sua sequência apresentasse resíduos de aminoácidos participantes do domínio funcional da Hst-5, seus resultados não foram promissores.

Por outro lado, o composto duplicado linearmente, 8WYKDuoHst-5, apresentou inibições superiores com 80 $\mu\text{mol/L}$ e 40 $\mu\text{mol/L}$ se comparado a 0WHst-5 ao ser avaliado frente *C. albicans* ATCC 18804 e ATCC 10231, respectivamente.

Um agente antifúngico pode ser classificado como fungicida caso sua razão entre CFM e CI_{90} seja menor ou igual a 4 (Pfaller; Sheehan; Rex, 2004; Feng *et al.*, 2023). Ao avaliar os resultados obtidos utilizando o RPMI como meio de cultivo, os peptídeos não puderam ser classificados por suas propriedades fungistática ou fungicida devido ao valor de CI_{90} frente as linhagens de *C. albicans* não terem sido determinados pelas concentrações estudadas, assim como o fragmento 8WYKHst-5 em meio SDB. Dessa forma, as informações contidas na **Tabela 4** referem-se apenas aos compostos testados em caldo Sabouraud dextrose.

Tabela 4: Classificação fungicida ou fungistática dos análogos avaliados em caldo Sabouraud Dextrose com base nas concentrações inibitórias e fungicidas mínimas.

	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
0WHst-5	Fungicida	Fungicida	Fungicida
8WYKHst-5	> 320 $\mu\text{mol/L}$	> 320 $\mu\text{mol/L}$	> 320 $\mu\text{mol/L}$
8WYKDuo Hst-5	Fungicida	Fungicida	Fungicida
8WYKDim Hst-5	Fungicida	Fungicida	Fungicida

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

4.2.2 Cinética de Inibição de Crescimento Fúngico

Os ensaios de cinética de crescimento fúngico foram realizados a fim de explicar se a atividade antifúngica observada até então ocorria nas primeiras horas de exposição aos peptídeos até um período de 48h. Os resultados obtidos referente a *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231 podem ser encontrados nas **Figura 12**, **Figura 13** e **Figura 14**, respectivamente.

Nas 8 h iniciais de ensaio não foi possível avaliar nenhuma mudança significativa no crescimento de *C. albicans*, exposta ou não aos agentes inibidores de crescimento devido a quantidade de célula fúngica que não é detectada por absorbância. A partir de 8 h de incubação é possível observar que o controle não tratado atingiu a fase estacionária após 20-24 h dependendo da linhagem de *C. albicans*.

De modo geral, 8WYKHst-5 foi inativo ao ser estudado como agente inibidor do crescimento fúngico. O análogo 0WHst-5 mostrou-se menos ativo se comparado as sequências duplicadas, promovendo inibição de crescimento somente nas maiores concentrações. Os peptídeos duplicados, 8WYKDuoHst-5 e 8WYKDimHst-5, foram os mais ativos, apresentando atividade inibitória em até 48 h de incubação. Entretanto, é possível observar algumas particularidades nas atividades desses peptídeos.

Para *C. albicans* ATCC 90028, na concentração de 40 μ M a ação inibitória de 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 é reduzida a partir de 24 h enquanto 8WYKDimHst-5, com 31,25 μ M, mantém-se por até 48 h (**Figura 12E-F**). Para *C. albicans* ATCC 18804, em 24 h de incubação, é possível observar a inibição de crescimento de aproximadamente 90% dos microrganismos expostos a 40 μ M de 8WYKDuoHst-5 e 31,25 μ M de 8WYKDimHst-5. A partir desse período, houve recrescimento do fungo e somente o peptídeo 8WYKDuoHst-5 manteve sua atividade inibitória em 50% após 48 h de incubação (**Figura 13E-F**). Para a linhagem FLC-resistente de *C. albicans* ATCC 10231, a ação inibitória de 40 μ M de 0WHst-5 é reduzida para aproximadamente 10% após um período de 36 h enquanto 8WYKDuoHst-5, também com 40 μ M, e 8WYKDimHst-5, com 31,25 μ M, mantém-se por até 48 h (**Figura 14E-F**), um resultado importante para a atividade antifúngica dos peptídeos aqui testados.

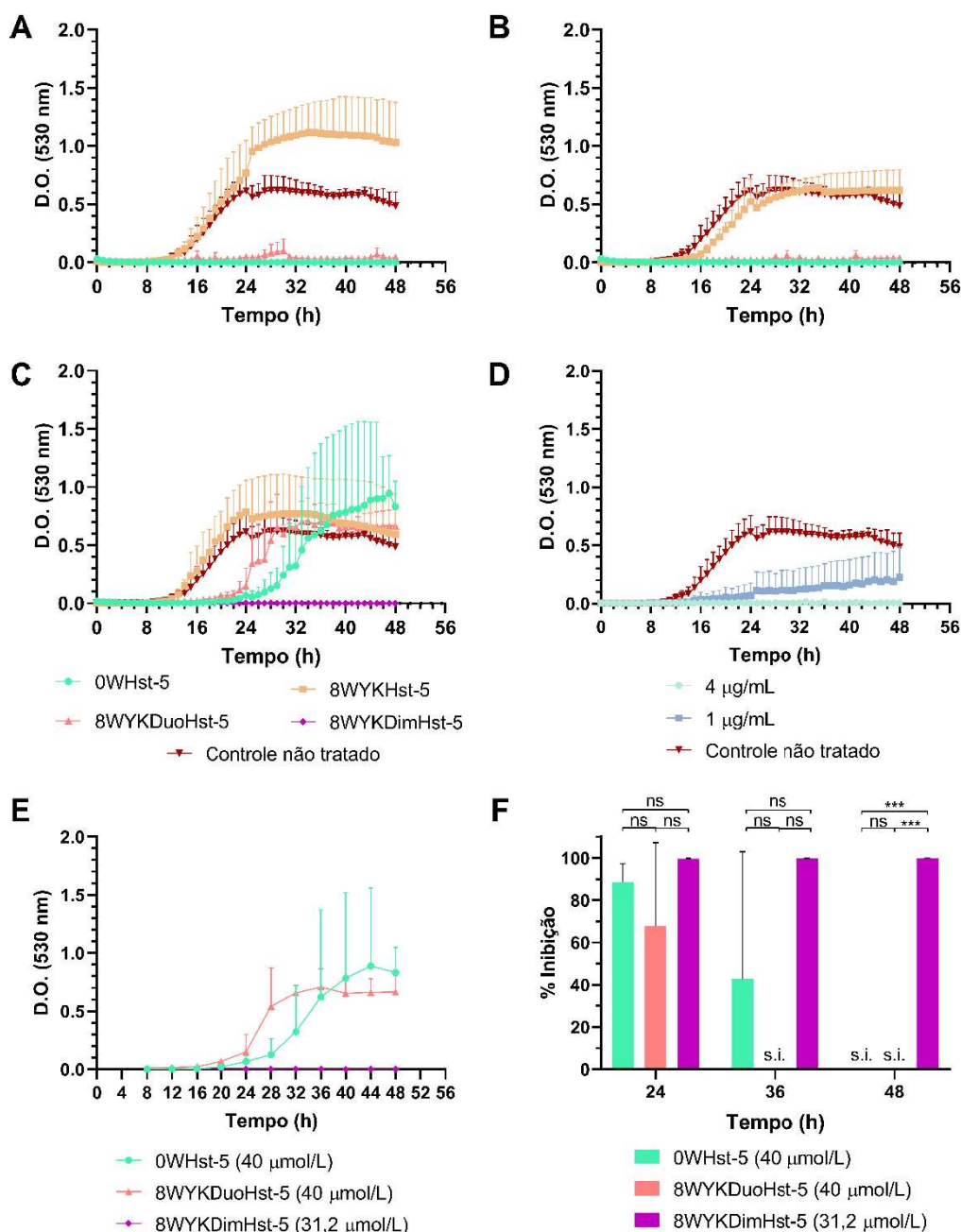


Figura 12: Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 90028 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5.

Os gráficos apresentam resultados em concentrações de (A) 320 μ M para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 250 μ M para 8WYKDimHst-5; (B) 160 μ M para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 125 μ M para 8WYKDimHst-5 e (C) 40 μ M para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 31,25 μ M para 8WYKDimHst-5 após um período de 48h em incubação na presença dos peptídeos em caldo Sabouraud dextrose. O fluconazol (D) foi avaliado por ser um medicamento padrão de tratamento. Em 20h (E), a ação inibitória em 40 μ M de 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 passam a reduzir enquanto em 31,25 μ M de 8WYKDimHst-5 se mantém. Em (F) observa-se a porcentagem de inibição de cada sequência a cada 12h de tratamento com 40 μ M para 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e com 31,25 μ M para 8WYKDimHst-5.

Os gráficos (A), (B), (C), (D) e (E) foram plotados a partir da média biológica das densidades óticas $\pm$ DP e (F) a partir do cálculo da %inibição média biológica $\pm$ DP. ANOVA One-way com múltiplas comparações com pós teste de Tukey.

(s.i.: sem inibição; ns: não apresenta variação estatística significativa; *** $p < 0,001$).

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

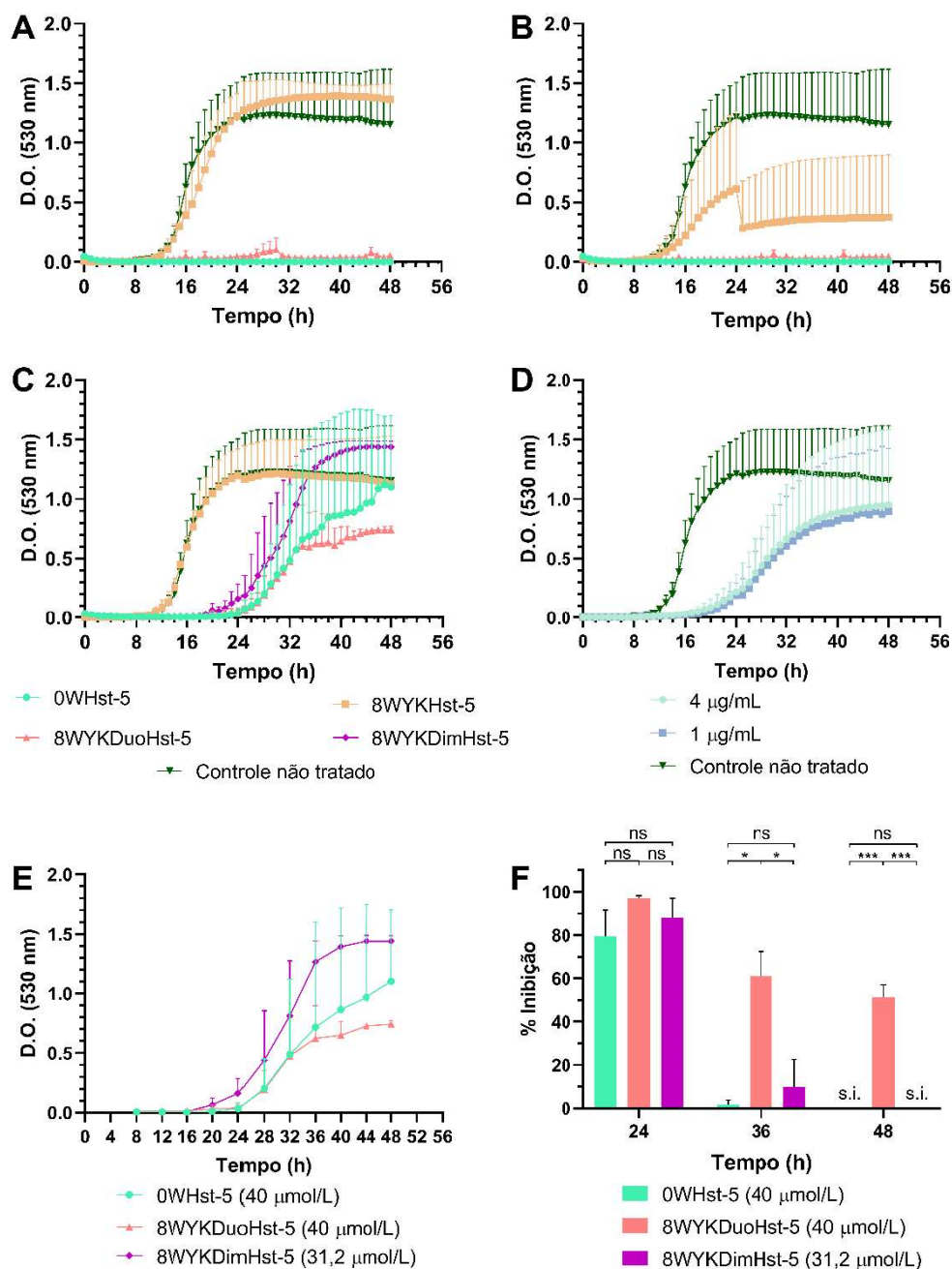


Figura 13: Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 18804 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5.

Os gráficos apresentam resultados em concentrações de (A) 320 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 250 µM para 8WYKDimHst-5; (B) 160 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 125 µM para 8WYKDimHst-5 e (C) 40 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 31,25 µM para 8WYKDimHst-5 após um período de 48h em incubação na presença dos peptídeos em caldo Sabouraud dextrose. O fluconazol (D) foi avaliado por ser um medicamento padrão de tratamento. Até 16h de ensaio (E) a ação inibitória em 40 µM de 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e em 31,25 µM de 8WYKDimHst-5 mantiveram-se constantes, reduzindo após esse período. Em (F) observa-se a porcentagem de inibição de cada sequência a cada 12h de tratamento com 40 µM para 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e com 31,25 µM para 8WYKDimHst-5.

Os gráficos (A), (B), (C), (D) e (E) foram plotados a partir da média biológica das densidades ópticas ± DP e (F) a partir do cálculo da %inibição média biológica ± DP. ANOVA One-way com múltiplas comparações com pós teste de Tukey.

(s.i.: sem inibição; ns: não apresenta variação estatística significativa; *** p < 0,001).

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

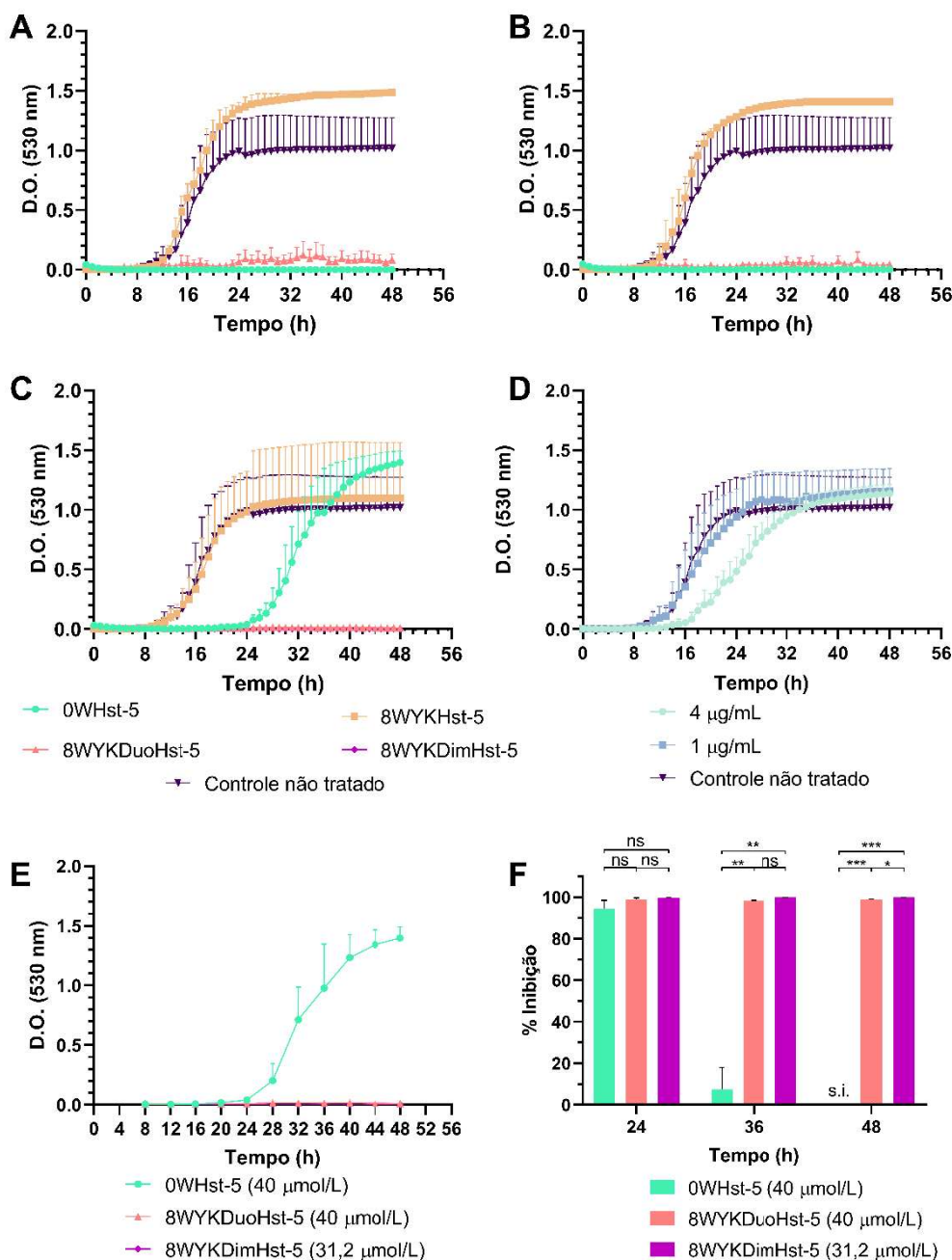


Figura 14: Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231 exposta aos peptídeos análogos a histatina-5

Os gráficos apresentam resultados em concentrações de (A) 320 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 250 µM para 8WYKDimHst-5; (B) 160 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 125 µM para 8WYKDimHst-5 e (C) 40 µM para 0WHst-5, 8WYKHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 31,25 µM para 8WYKDimHst-5 após um período de 48h em incubação na presença dos peptídeos em caldo Sabouraud dextrose. O fluconazol (D) foi avaliado por ser um medicamento padrão de tratamento. Em 20h (E), a ação inibitória em 40 µM de 0WHst-5 passou a reduzir enquanto em 40 µM de 8WYKDuoHst-5 e em 31,25 µM de 8WYKDimHst-5 se mantiveram. Em (F) observa-se a porcentagem de inibição de cada sequência a cada 12h de tratamento com 40 µM para 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e com 31,25 µM para 8WYKDimHst-5.

Os gráficos (A), (B), (C), (D) e (E) foram plotados a partir da média biológica das densidades ópticas $\pm$ DP e (F) a partir do cálculo da %inibição média biológica $\pm$ DP. ANOVA One-way com múltiplas comparações com pós teste de Tukey.

(s.i.: sem inibição; ns: não apresenta variação estatística significativa; *** $p < 0,001$).

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

4.2.3 Atividade dos peptídeos sobre a formação dos biofilmes

Para a avaliação da atividade peptídica sobre a formação do biofilme de *C. albicans*, foi primeiro realizada uma padronização em caldo Sabouraud dextrose comparando a formação de biomassa dos microrganismos em agitação e estática. Os dados indicam que biofilmes formados em condição estática tiveram maior biomassa quantificada, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (**Figura 15**). Por isso, os testes prosseguiram no formato estático para avaliar o efeito dos peptídeos derivados da histatina-5.

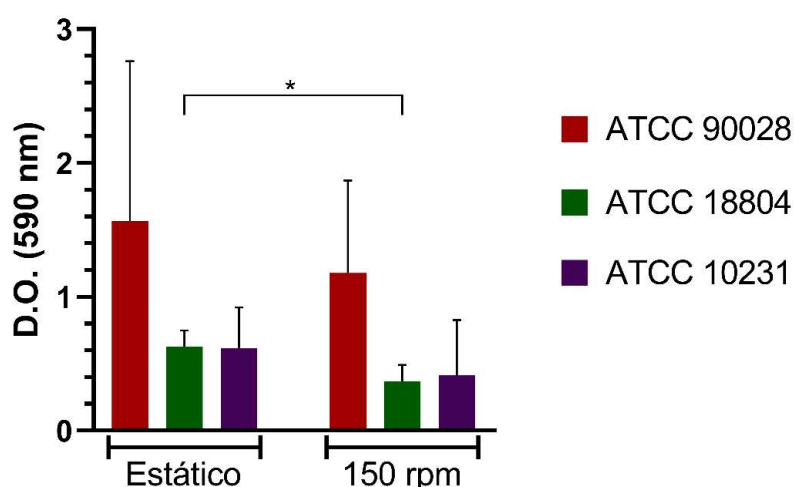


Figura 15: Comparação da biomassa dos biofilmes de *Candida albicans* em caldo Sabouraud dextrose após crescimento estático e em agitação.

ANOVA One-way com múltiplas comparações com pós teste de Tukey. *** $p < 0,001$

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

Após determinado qual protocolo seguir, o tratamento sobre o biofilme em formação de cada linhagem foi aplicado em triplicata experimental e triplicata biológica para cada composto a ser estudado. Os resultados das avaliações colorimétricas após o tratamento estão evidenciados na **Figura 16** e **Figura 17**.

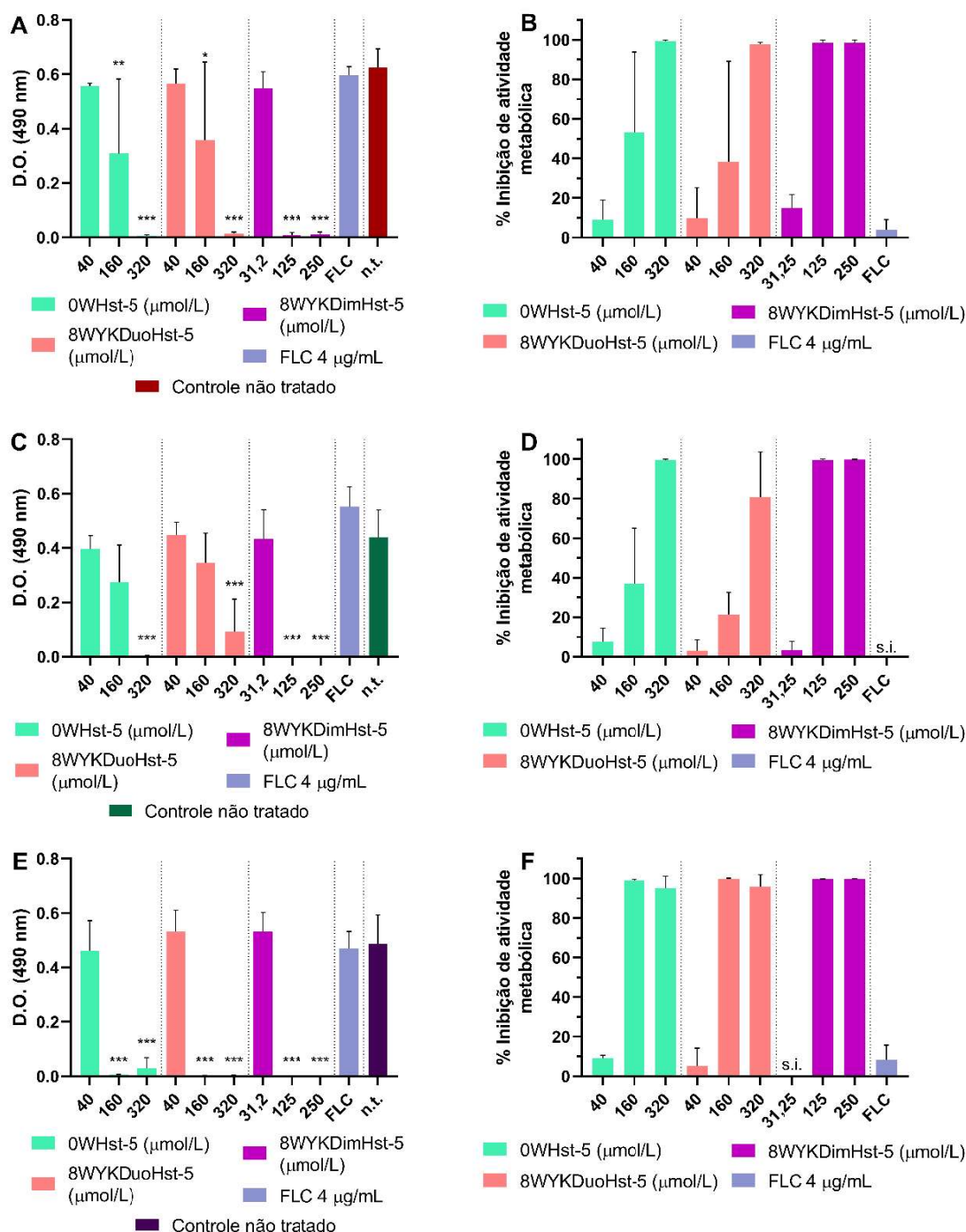


Figura 16: Atividade metabólica dos biofilmes de *Candida albicans* em formação expostos aos peptídeos análogos a histatina-5.

Leitura da densidade ótica em 490 nm após o teste colorimétrico com sal sódico de XTT para avaliar a atividade metabólica de *C. albicans* (A) ATCC 90028, (C) ATCC 18804 e (E) ATCC 10231 após 24h de incubação em caldo Sabouraud dextrose. A porcentagem de inibição respectiva a cada linhagem encontra-se nos gráficos (B), (D) e (F).

Os gráficos (A), (C) e (E) foram plotados a partir da média biológica das densidades óticas $\pm$ DP e (B), (D) e (F) a partir do cálculo da %inibição média biológica $\pm$ DP. (s.i.: sem inibição).

ANOVA One-way com múltiplas comparações com o Controle não tratado com pós teste de Dunnett.

*** $p < 0,001$

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

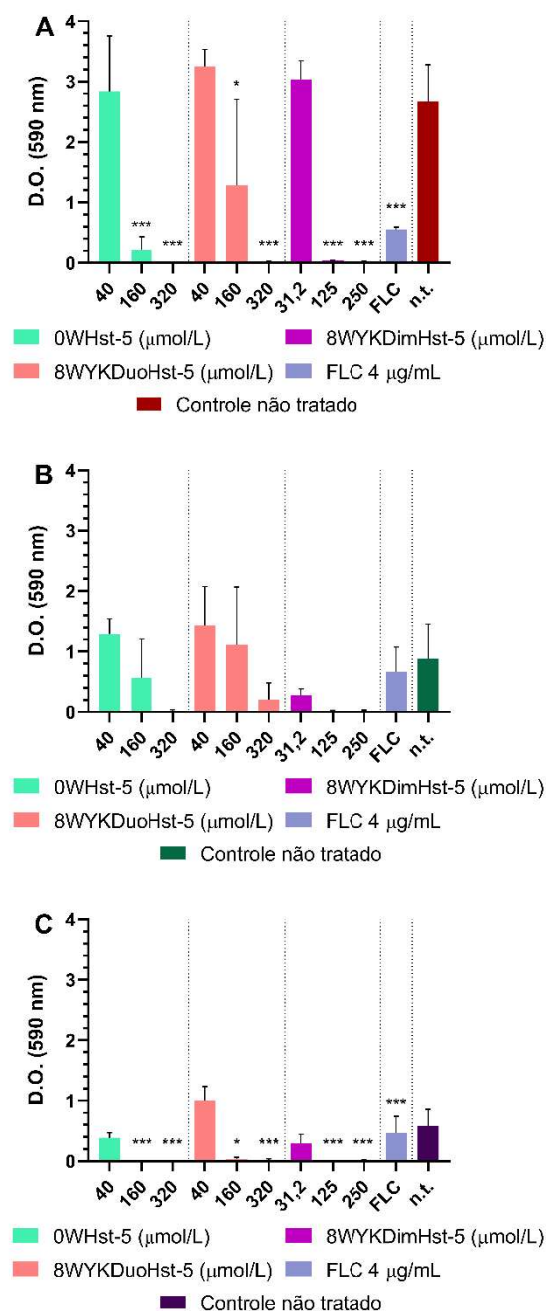


Figura 17: Biomassa dos biofilmes de *Candida albicans* em formação após exposição aos peptídeos análogos a histatina-5.

Leitura da densidade ótica em 590 nm após o teste colorimétrico com cristal violeta para avaliar a biomassa de *C. albicans* (A) ATCC 90028, (B) ATCC 18804 e (C) ATCC 10231 após 24h de incubação em caldo Sabouraud dextrose.

Os gráficos (A), (B) e (C) foram plotados a partir da média biológica das densidades óticas $\pm$ DP.

ANOVA One-way com múltiplas comparações com o Controle não tratado com pós teste de Dunnett.

*** $p < 0,001$

Fonte: elaborada pelo próprio autor (2026).

C. albicans ATCC 90028 apresenta um biofilme mais robusto se comparado as outras duas linhagens estudadas. Os resultados de atividade metabólica do controle não tratado e dados de biomassa não tratada demonstram

como não há correlação entre sensibilidade medicamentosa e virulência. Ao avaliar os resultados referentes a atividade metabólica de suas células sésseis do biofilme em formação, a inibição foi de aproximadamente 100% após 24 h de tratamento com 125 μ M de 8WYKDimHst-5. Comparando aos demais peptídeos, a concentração necessária para que a mesma inibição fosse alcançada por 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 foi mais do que o dobro (320 μ M).

A mesma atividade inibitória foi observada ao tratar o biofilme em formação de ATCC 18804 e ATCC 10231 com 125 μ M de 8WYKDimHst-5. Contudo, ao avaliar a ATCC 18804, não foi observado inibição superior a 80% quando tratado com 320 μ M de 8WYKDuoHst-5.

A linhagem *C. albicans* ATCC 10231 mostrou um biofilme mais sensível ao tratamento realizado com análogos de histatina-5, apresentando uma atividade inibitória de aproximadamente 100% ao ser avaliado frente 160 μ M de 0WHst-5 e 8WYKDuoHst-5 e 125 μ M de 8WYKDimHst-5.

Houve redução significativa da matriz do biofilme em formação de ATCC 90028 se comparado ao controle não tratado. Em ATCC 18804, a biomassa foi praticamente nula ao tratar com a maior concentração de 0WHst-5 e com 125 μ M e 250 μ M de 8WYKDimHst-5. A sensibilidade de ATCC 10231 frente ao tratamento resultou em uma redução de biomassa quase total ao ser exposta a concentrações acima de 160 μ M de 0WHst-5, 160 μ M de 8WYKDuoHst-5 e 125 μ M de 8WYKDimHst-5.

O tratamento com peptídeos análogos a histatina-5 reduziu a atividade metabólica e biomassa dos biofilmes em formação para as três linhagens. Para *C. albicans* ATCC 10231, só foi possível observar biomassa e atividade metabólica na menor concentração testada.

5 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho, foi possível concluir que a metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida é amplamente utilizada até os dias atuais devido sua eficiência na obtenção de peptídeos com purezas acima de 90%. Também foi possível observar que a tentativa de avaliar os peptídeos análogos à histatina-5 no meio de cultivo RPMI não foi conclusivo para nenhum dos testes realizados.

Os ensaios em caldo Sabouraud dextrose, por sua vez, apresentaram resultados condizentes e complementares para as análises microbiológicas. As

linhagens avaliadas se mostraram sensíveis à 0WHst-5 e aos peptídeos de sequência duplicada, mas não ao fragmento 8WYKHst-5.

A duplicação e dimerização da sequência resultaram em atividades diferentes, demonstrando serem estratégias interessantes para a potencialização da atividade de peptídeos baseados na estrutura da Hst-5. No entanto, são necessárias mais investigações para avaliar tais diferenças estratégicas de duplicação, isto é, se a influência se deu apenas devido a estrutura ou devido o grupo carboxila resultante da síntese com a resina Wang e o grupo amida resultante da síntese com Rink amida.

A CIM₉₀ obtida para *C. albicans* ATCC 90028 foi 80 µM, 80 µM e 15,62 µM; ATCC 18804 foi 160 µM, 80 µM e 31,25 µM e ATCC 10231 foi 80 µM, 40 µM e 15,62 µM para 0WHst-5, 8WYKDuoHst-5 e 8WYKDimHst-5, respectivamente. A sequência 8WYKHst-5 não apresentou inibição nos ensaios.

Os ensaios de cinética de crescimento demonstraram que, após 48 h, a sequência 0WHst-5 mantém 50% de inibição frente a *C. albicans* ATCC 18804 com 40 µM, 8WYKDuoHst-5 mantém quase 100% de inibição contra *C. albicans* ATCC 10231 com 40 µM e 8WYKDimHst-5 mantém quase 100% de inibição contra *C. albicans* ATCC 90028 e ATCC 10231 com 31,25 µM.

Os três peptídeos também apresentaram capacidade de reduzir a atividade metabólica e a biomassa do biofilme de *C. albicans* em formação para as três linhagens estudadas, especialmente na ATCC 10231.

Por fim, a sequência 8WYKDimHst-5 demonstrou melhores resultados se comparada aos outros estudados ao longo deste projeto, em específico para a linhagem resistente a fluconazol, mostrando-se uma alternativa no combate a infecções resistentes de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. ATCC® Multidrug-Resistant & Antimicrobial Testing Reference Strains. ATCC, 2023. Disponível por solicitação em: www.atcc.org.

ASKARI, S. *et al.* A rare case of *Candida albicans*-associated meningitis; A case report study. **Clinical Infection in Practice**, v. 26, 8 Apr. 2025.
DOI 10.1016/j.clinpr.2025.100490

ATHERTON, E. *et al.* A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. **Journal of the Chemical Society**, n. 13, p. 537, Jan. 1978.
DOI 10.1039/c39780000537

BLUMBERG, D.. **Yeast Infection (Candidiasis)**. UC Davis Health, 2024. Disponível em: <https://health.ucdavis.edu/conditions/infectious-diseases/fungal-infections/yeast-infection>. Acesso em: 23 Dec. 2025.

BROWN, G. *et al.* The pathobiology of human fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 11, p. 687 - 704, Nov. 2024.
DOI 10.1038/s41579-024-01062-w

CAMPBELL, J. *et al.* Histatin-5 interacts with cellular copper to promote antifungal activity against *Candida albicans*. **Metallomics**, v. 15, n. 12, Dec. 2023.
DOI 10.1093/mtomcs/mfad070

CARVALHO, J. P. *et al.* Distribution of *Candida* Species Causing Oral Candidiasis in High-Risk Populations: A Systematic Review. **Healthcare**, v. 14, p. 159, 8 Jan. 2026.
DOI 10.3390/healthcare14020159

CASE, N. T. *et al.* Fungal impacts on Earth's ecosystems. **Nature**, v. 638, n. 8049, p. 49 – 57, 6 Feb. 2025.
DOI 10.1038/s41586-024-08419-4

CHADHA, S.. Combating fungal phytopathogens with human salivary antimicrobial peptide histatin 5 through a multi-target mechanism. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, Aug. 2023.
DOI 10.1007/s11274-023-03667-4

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A4**: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Pennsylvania: CLSI, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M60**: Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Pennsylvania: CLSI, 2017.

DE CARLI, L.; LARIZZA, L.. Griseofulvin. **Reviews in Genetic Toxicology**, v. 195, n. 2, p. 91 – 126, Mar. 1988.
DOI 10.1016/0165-1110(88)90020-6

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, 12 Jan. 2024.
DOI 10.1016/S1473-3099(23)00692-8

ESKI, F.; GAYYURHAN, E. D.; BALCI, I.. In Vitro Susceptibility of *Candida* Species to Four Antifungal Agents Assessed by the Reference Broth Microdilution Method. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 22 Jan. 2013.
DOI 10.1155/2013/236903

FENG, Y. *et al.* Understanding fluconazole tolerance in *Candida albicans*: implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive fungal infections. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 35, p. 314-321, 2023.
DOI 10.1016/j.jgar.2023.10.019

FISHER, M. C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, p. 557-571, 29 Sept. 2022.
DOI 10.1038/s41579-022-00720-1

HAN, J. *et al.* Antifungal activity and action mechanism of histatin 5-halocin hybrid peptides against *Candida* spp. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 1 Feb. 2016.
DOI 10.1371/journal.pone.0150196

HOENIGL, M. *et al.* Novel antifungals and treatment approaches to tackle resistance and improve outcomes of invasive fungal disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 37, n. 2, 11 Apr. 2024.
DOI 10.1128/cmr.00074-23

KATSIPOULAKI, M. *et al.* *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 2, 27 June. 2024.
DOI 10.1128/membr.00021-23

LASS-FLÖRL, C.; STEIXNER, S.. The changing epidemiology of fungal infections. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 94, p. 101215–101215, Dec. 2023.
DOI 10.1016/j.mam.2023.101215

LASS-FLÖRL, C. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, p. 20, 21 Mar. 2024.
DOI 10.1038/s41572-024-00503-3

LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L.. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n.1, p. 5, 17 July 2023.
DOI 10.1038/s44259-023-00007-2

LIN, G.-Y. *et al.* The Antimicrobial Peptides P-113Du and P-113Tri Function against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6369–6373, Oct. 2016.
DOI 10.1128/AAC.00699-16.

LOCKHART, S. R.; CHOWDHARY, A.; GOLD, J. A. W.. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 818-832, Dec. 2023.

DOI 10.1038/s41579-023-00960-9

LOPES, J.; LIONAKIS, M.. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, p. 89-121, 2022.

DOI 10.1080/21505594.2021.2019950

MACIAS-PAZ, I. U. *et al.* *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 55, p. 189-198, Apr. 2023.

DOI 10.1016/j.ram.2022.08.003

MADIGAN, M. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Grupo A Educação S.A., 2016.

McCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G.. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, p. 389-413, June 2021.

DOI 10.1016/j.idc.2021.03.007

MATHURIA, A. *et al.* Drug repurposing for fungal infections. *In*: SINGH, V. **Progress in Molecular Biology and Translational Science: Clinical Application of Repurposed Drugs**. Academic Press, 2024. p. 59-78.

DOI 10.1016/bs.pmbts.2024.04.002

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

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N.. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, p. 487-494, July 2016.

DOI 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022

NAYAB, S. *et al.* A Review of Antimicrobial Peptides: Its Function, Mode of Action and Therapeutic Potencial. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, 2022.

DOI 10.1007/s10989-021-10325-6

OPPENHEIM, F. G. *et al.* Anti-Candidal Activity of Genetically Engineered Histatin Variants with Multiple Functional Domains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51479, 12 Dec. 2012.

DOI 10.1371/journal.pone.0051479

OPPENHEIM, F. G. *et al.* Histatins, a Novel Family of Histidine-rich Proteins in Human Parotid Secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7472-7477, June 1988.

DOI 10.1016/s0021-9258(18)68522-9

PARSONS, M. G.; DIEKEMA, D. J. What Is New in Fungal Infections?. **Modern Pathology**, v. 36, n. 6, p. 100187, June 2023.
DOI 10.1016/j.modpat.2023.100187.

PEREZ-RODRIGUEZ, A. *et al.* Antimicrobial Peptides with Anti-*Candida* Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, Aug. 2022.
DOI 10.3390/ijms23169264

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H.. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 268-280, 2004.
DOI 10.1128/CMR.17.2.268-280.2004

PURI, S.; EDGERTON, M.. How Does It Kill?: Understanding the Candidacidal Mechanisms of Salivary Histatin 5. **Eukariotic Cell**, v. 13, p. 958-964, Aug. 2014.
DOI 10.1128/EC.00095-14

ROQUE-BORDA, C. A. *et al.* Repositioning Antimicrobial Peptides Against WHO-Priority Fungi. **Advanced Science**, v. 12, 6 Oct. 2025.
DOI 10.1002/advs.202509567

ROTHSTEIN, D. M. *et al.* Anticandida Activity Is Retained in P-113, a 12-AminoAcid Fragment of Histatin 5. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1367-1373, May 2001.
DOI 10.1128/AAC.45.5.1367-1373.2001

SATCHANSKA, G.; DAVIDOVA, S.; GERGOVA, A.. Diversity and Mechanisms of Action of Plant, Animal, and Human Antimicrobial Peptides. **Antibiotics**, v. 13, Mar. 2024.
DOI 10.3390/antibiotics13030202

SCIENCEDIRECT. **Ninhydrin Reaction - an overview | ScienceDirect Topics**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/ninhydrin-reaction#>. Acesso em: 27 maio 2025.

SEDIK, S. *et al.* Diagnosing fungal infections in clinical practice: a narrative review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 22, n. 11, p. 935–949, 16 Sept. 2024.
DOI 10.1080/14787210.2024.2403017.

SEYFI, R. *et al.* Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 1451-1463, Sept. 2020.
DOI 10.1007/s10989-019-09946-9

TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans* – The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, 22 Jan. 2021.
DOI 10.3390/jof7020079

TAMO, S. P. B.. *Candida* Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. **Infectious Diseases and Clinical Microbiology**, v. 2, p. 91-102, 31 Aug. 2020.
DOI 10.36519/idcm.2020.0006

USMAN, S.; YOU, Y.; WASEEM, A.. Exploring the Healing Powers of Histatins: From Oral Health to Therapeutics. **International Journal of Molecular Science**, v. 26, June 2025.
DOI 10.3390/ijms26115019

VAN RHIJN, N.; RHODES, J.. Evolution of antifungal resistance in the environment. **Nature Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1804-1815, Aug. 2025.
DOI10.1038/s41564-025-02055-y

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: WHO, 2022.

WU, B. *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127–140, 7 May 2019.
DOI 10.1080/14787210.2024.2403017.

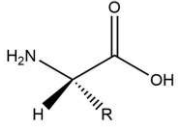
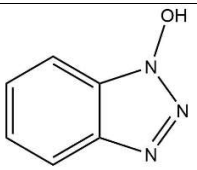
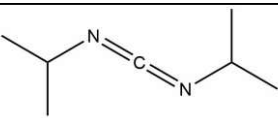
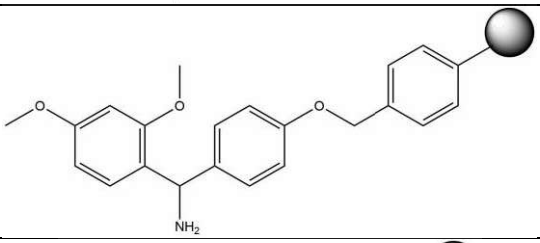
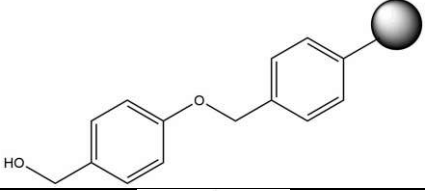
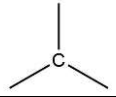
ZAMBOM, C. R. *et al.* A Novel Antifungal System With Potential for Prolonged Delivery of Histatin 5 to Limit Growth of *Candida Albicans*. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 1667, 2019.
DOI 10.3389/fmicb.2019.01667

ZAMBOM, C. R. *et al.* Reducing Functional Domain of Histatin 5 Improves Antifungal Activity and Prevents Proteolytic Degradation. **Microorganisms**. v. 13, p. 1091, May 2025.
DOI 10.3390/microorganisms13051091

ZARE-ZARDINI, H.; SALEHI, Z.; SEYEDJAVADI, S. S.. Emerging Role of Antifungal Peptides in Novel Therapeutic Strategies Against Candidiasis. *In*: RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.. **Candidiasis – Emerging Clinical Challenges and Novel Therapeutic Approaches**. IntechOpen, 2025.
DOI 10.5772/intechopen.1012626

ZOLIN, G. V. S.. **Análogos de Histatina 5 complexados com íons metálicos de prata como alternativa para o combate de *Candida albicans***. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2023.

ANEXO A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NA SÍNTESE E OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS

Composto	Sigla	Estrutura Química
L- α -aminoácido	-	
N-hidroxibenzotriazol	HOBt	
N,N-diisopropilcarbodiimida	DIC	
Resina Rink Amida	-	
Resina Wang	-	
terc-butil	t-Bu	
9-fluorenilmetoxycarbonil	Fmoc	