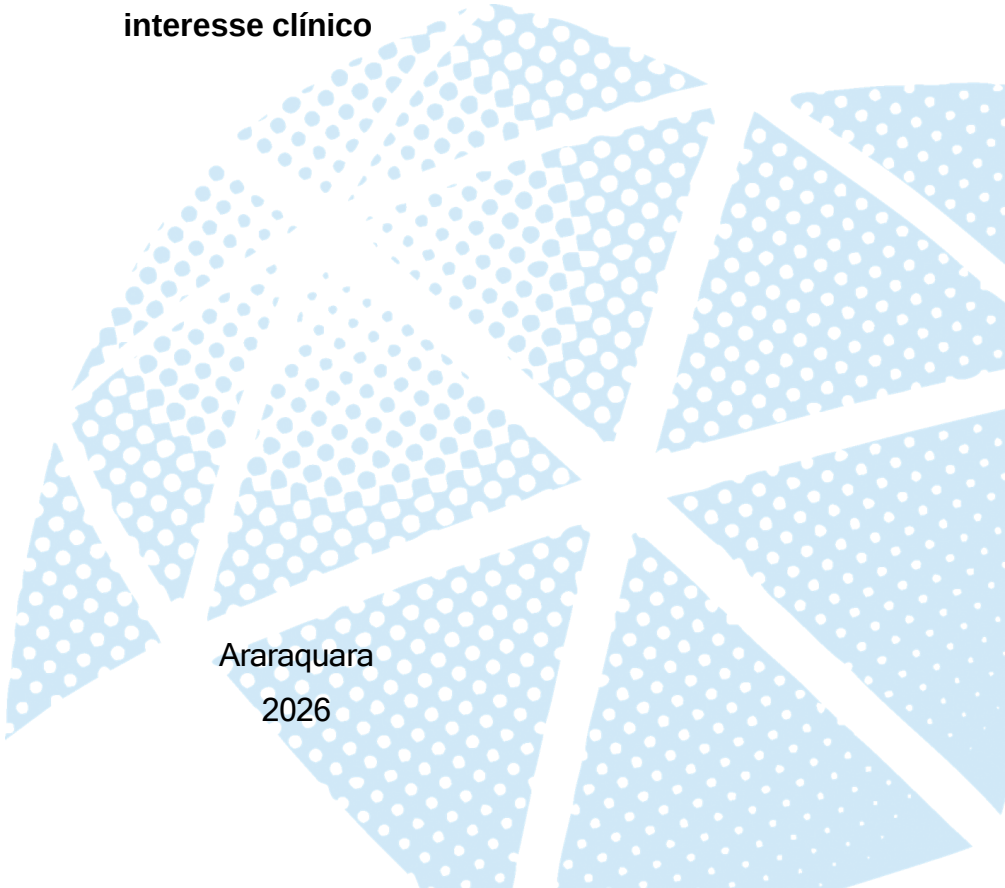


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -
UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS DE
ARARAQUARA

VINICIUS OLIVEIRA CHESNA

Síntese e ensaios *in vitro* de análogos do peptídeo antimicrobiano
“B1CTcu5” conjugados com grupamento imidazol frente a patógenos de
interesse clínico

Araraquara
2026



VINICIUS OLIVEIRA CHESNA

**Síntese e ensaios *in vitro* de análogos do peptídeo antimicrobiano
“B1CTcu5” conjugados com grupamento imidazol frente a patógenos de
interesse clínico**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de ciências farmacêuticas, Araraquara, para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicados a Farmácia.

Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara

2026

C524s Chesna, Vinicius Oliveira.
Síntese e ensaios *in vitro* de análogos do peptídeo antimicrobiano
"B1CTcu5" conjugados com grupamento imidazol frente a patógenos de
interesse clínico / Vinicius Oliveira Chesna. – Araraquara, 2025.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós- graduação
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração:
Análises clínicas.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *Candida albicans*. 2. Candidíase. 3. Imidazol. 4. Antibióticos
peptídicos. 5. Peptídeos – Síntese. I. Pavan, Fernando Rogério, orient.
II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara Kazumi
Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese e testes in vitro de análogos do peptídeo antimicrobiano "B1CTcu5" conjugados com grupamento imidazol frente patógenos de interesse clínico

AUTOR: VINICIUS OLIVEIRA CHESNA

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

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

Prof. Dr. HAROLDO CESAR DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia, Imunobiologia e Parasitologia / Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 30 de setembro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as todas as pessoas que contribuíram positivamente com a realização desse trabalho como laboratórios parceiros, colegas e amigos de trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 - Processo Nº: 88887.900171/2023-00

RESUMO

A *Candida albicans* é um fungo comensal presente na microbiota dos humanos, porém em condições de desequilíbrios homeostáticos, esse organismo pode se tornar patogênico, causando uma doença conhecida como candidíase, que apresenta diversas manifestações clínicas, sendo a sua forma sistêmica a mais letal, causada principalmente por fungos resistentes às medicações empregadas na terapia. A tuberculose é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Apesar de possuir uma alta taxa de mortalidade, essa doença apresenta um tratamento, entretanto essa terapêutica é muito prolongada e apresenta diversos efeitos adversos, levando ao abandono do tratamento e consequentemente ao aparecimento de isolados resistentes. Tais problemáticas evidenciam a necessidade da procura de novos compostos a serem empregados no tratamento dessas doenças. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm se destacado como moléculas promissoras, por serem proteínas de baixo peso molecular que integram o sistema de defesa inata de diversos organismos. Entre esses, as brevininas, peptídeos isolados da pele de sapos do gênero *Ranidae* que demonstraram atividade frente ao MTB. Análogos dessas moléculas foram sintetizados, resultando no peptídeo CRBR04. O grupamento imidazol, um anel heterocíclico de cinco membros com reconhecida atividade antimicrobiana tem sido empregado na modificação de fármacos visando aprimorar suas atividades e propriedades farmacocinéticas. Este trabalho teve como objetivo a conjugação do peptídeo CRBR04 com um grupamento imidazol, utilizando-se do aminoácido histidina. A primeira geração de peptídeos conjugados não apresentou atividade antimicrobiana satisfatória, sendo então sintetizado um segundo grupo de moléculas a partir de ensaios de *machine learning*. Esse segundo grupo apresentou dificuldades em sua purificação devido às suas propriedades físico-químicas. Dentre os peptídeos sintetizados, apenas o composto VC7 apresentou atividade frente ao MTB, com concentração inibitória mínima (CIM) de 90 µg/ml. Além disso, demonstrou atividade antifúngica frente a cepas sensíveis, clínicas e resistentes aos medicamentos da terapia de *Candida albicans*, com CIMs de 37,80 µg/mL, 102,05 µg/mL e 138,69 µg/mL, respectivamente. Enquanto o peptídeo CRBR04 exibiu atividade similar frente às mesmas cepas, com CIM de 150 µg/mL, sugerindo a existência de mecanismos de ação distintos entre os dois compostos. Apenas o peptídeo CRBR04 demonstrou a capacidade de inibir a formação de biofilmes de *Candida albicans* resistentes, entretanto não demonstrou atividade frente aos biofilmes previamente formados. Nos ensaios de citotoxicidade frente a células Caco-2, os peptídeos CRBR04 e VC7 apresentaram valores de IC₅₀ de 52,22 µg/mL e 180,10 µg/mL, respectivamente, indicando uma baixa toxicidade seletiva de ambas as moléculas em relação a essa linhagem celular. Ensaios realizados frente a eritrócitos humanos demonstraram que os peptídeos não possuem atividade hemolítica nas concentrações testadas. Os compostos estudados demonstraram um perfil de atividade frente a espécies de *Candida albicans*, porém ainda apresentam algumas problemas como a alta citotoxicidade e dificuldade de síntese.

Palavras-chave: *Candida albicans*; candidíase; imidazol; peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

Candida albicans is a commensal fungus present in the human microbiota; however, under conditions of homeostatic imbalance, this organism can become pathogenic, causing a disease known as candidiasis, which presents several clinical manifestations. Its systemic form is the most lethal and is mainly caused by fungi resistant to the medications employed in therapy. Tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Despite its high mortality rate, this disease has an available treatment; however, this therapy is very prolonged and is associated with several adverse effects, leading to treatment abandonment and, consequently, to the emergence of resistant isolates. These issues highlight the need to search for new compounds to be used in the treatment of these diseases. Antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising molecules, as they are low-molecular-weight proteins that are part of the innate defense system of several organisms. Among these, brevinins, peptides isolated from the skin of frogs of the genus *Ranidae*, have demonstrated activity against MTB. Analogues of these molecules were synthesized, resulting in the peptide CRBR04. The imidazole moiety, a five-membered heterocyclic ring with recognized antimicrobial activity, has been employed in drug modification to improve biological activity and pharmacokinetic properties. This study aimed to conjugate the peptide CRBR04 with an imidazole moiety using the amino acid histidine. The first generation of conjugated peptides did not show satisfactory antimicrobial activity; therefore, a second group of molecules was synthesized based on machine learning assays. This second group showed difficulties in purification due to its physicochemical properties. Among the synthesized peptides, only compound VC7 showed activity against MTB, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 90 µg/mL. In addition, it exhibited antifungal activity against drug-sensitive, clinical, and drug-resistant strains of *Candida albicans*, with MICs of 37.80 µg/mL, 102.05 µg/mL, and 138.69 µg/mL, respectively. In contrast, the peptide CRBR04 exhibited similar activity against the same strains, with an MIC of 150 µg/mL, suggesting the existence of distinct mechanisms of action between the two compounds. Only the peptide CRBR04 demonstrated the ability to inhibit biofilm formation by drug-resistant *Candida albicans*; however, it did not show activity against preformed biofilms. In cytotoxicity assays using Caco-2 cells, the peptides CRBR04 and VC7 showed IC₅₀ values of 52.22 µg/mL and 180.10 µg/mL, respectively, indicating low selective toxicity of both molecules toward this cell line. Assays performed with human erythrocytes demonstrated that the peptides did not exhibit hemolytic activity at the tested concentrations. The studied compounds demonstrated an activity profile against *Candida albicans* species; however, they still present some limitations, such as high cytotoxicity and difficulties in synthesis.

Keywords: *Candida albicans*; candidiasis; imidazole; antimicrobial peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Cromatograma peptídeo CRBR04 bruto e puro	34
Figura 2 Cromatograma peptídeo his-CRBR04 bruto e puro	34
Figura 3 Cromatograma peptídeo CRBR04-his bruto	35
Figura 4 Cromatograma peptídeo VC7 bruto e puro	37
Figura 5 Cromatograma peptídeo VC8 bruto e puro	38
Figura 6 Cromatograma peptídeo VC9 bruto e puro	38
Figura 7 Cromatograma peptídeo VC10 bruto e puro	39
Figura 8 Espectro de massas peptídeo CRBR04 bruto e puro.....	39
Figura 9 Espectroscopia de massas peptídeo his-CRBR04 bruto e puro.....	40
Figura 10 Espectroscopia de massas peptídeo VC7 bruto e puro.....	40
Figura 11 Espectroscopia de massas peptídeo VC8 bruto e puro.....	41
Figura 12 Espectroscopia de massas peptídeo VC9 bruto e puro.....	42
Figura 13 Espectroscopia de massas peptídeo VC10 bruto e puro.....	42
Figura 14 Ensaio hemolítico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estrutura primária dos análogos do peptídeo CRBR04 e informações sobre hidrofobicidade, carga e peso molecular	24
Tabela 2 Escores dos truncamentos do peptídeo CRBR04	36
Tabela 3 Estrutura primária dos fragmentos do peptídeo CRBR04 e informações sobre hidrofobicidade, carga e peso molecular	37
Tabela 4 Relação massa/carga teórica e experimental obtidas após a síntese dos peptídeos	43
Tabela 5 Resultados ensaio de concentração inibitória mínima H37Rv	44
Tabela 6 Resultados ensaio concentração inibitória mínima E.coli e S. aureus	45
Tabela 7 Resultados ensaio concentração inibitório mínima Candida albicans	46
Tabela 8 Resultados perfil de inibição da formação de biofilmes de Candida albicans	48
Tabela 9 Resultado ensaio de citotoxicidade frente a Caco-2	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivos específicos	22
3	MATERIAIS E METODOS	23
3.1	Ensaio <i>in silico</i>	23
3.2	Síntese dos peptídeos em fase sólida	23
3.2.1	Síntese do peptídeo CRBR04 e seus primeiros análogos	23
3.2.2	Síntese dos fragmentos do peptídeo antimicrobiano CRBR04	25
3.2.3	Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos	25
3.3	Ensaio <i>in vitro</i>	26
3.3.1	Cultivo microbiológico	26
3.3.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM90)	27
3.3.3	Ensaio em biofilme de <i>Candida albicans</i>	29
3.3.4	Ensaio celular	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Síntese, purificação e desenvolvimento dos peptídeos	33
4.2	Ensaio biológico	43
4.2.1	Concentração inibitória mínima	43
4.2.2	Biofilme	47
4.2.3	Ensaio celular	48
4.2.4	Hemolítico	49
4.2.5	CONCLUSÃO	51
	Referências	53

1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um dos grupos mais diversificados e, ao mesmo tempo, menos compreendidos dentro do domínio *Eukaryota*. Embora aproximadamente 150 mil espécies tenham sido descritas, estimativas sugerem que o número real pode ultrapassar vários milhões. A maioria das espécies fúngicas apresenta estratégias de vida baseadas em relações simbióticas ou comensais com outros organismos, desempenhando papéis fundamentais na manutenção do equilíbrio ecológico. Apenas uma parcela restrita é capaz de atuar como agentes etiológicos de infecções em seres humanos, fenômeno que se deve, em grande medida, à elevada complexidade dos sistemas imunológicos inatos e adaptativos.¹⁻²

Além disso, para estabelecer um processo infeccioso em humanos, os fungos necessitam reunir atributos específicos que os permita transpor as barreiras impostas pelo hospedeiro. Entre essas características, destacam-se a capacidade de crescimento e sobrevivência em temperatura corporal de aproximadamente 37 °C, a habilidade de ultrapassar barreiras anatômicas e fisiológicas, a competência para metabolizar componentes estruturais dos tecidos humanos e a aptidão para resistir aos mecanismos de defesa do sistema imunológico.²

Dessa forma, a maioria das doenças fúngicas são classificadas como oportunistas, uma vez que a capacidade desses microrganismos de provocar infecção está fortemente associada a algum comprometimento das barreiras imunológicas do hospedeiro. Nesses contextos, a proliferação fúngica torna-se possível em decorrência de condições que favorecem a sua instalação, tais como a ruptura de barreiras anatômicas, o enfraquecimento dos mecanismos de defesa inatos e adaptativos, ou ainda intervenções externas que facilitem a entrada e a persistência do patógeno nos tecidos do hospedeiro.³

As doenças fúngicas são ainda negligenciadas devido ao seu carácter oportunista. Contudo, nas últimas décadas, tais infecções passaram a receber maior atenção em decorrência de transformações sociais, que resultaram em um aumento expressivo do número de indivíduos imunocomprometidos. Entre esses, destacam-se pacientes vivendo com HIV/AIDS, indivíduos submetidos a

regimes de quimioterapia antineoplásica e aqueles em uso prolongado de agentes imunossupressores. Atualmente, estima-se que, por ano, mais de 6,55 milhões de pessoas tenham suas vidas ameaçadas por doenças fúngicas, das quais 3,75 milhões de pessoas morrem, sendo cerca de 2,75 milhões de dessas mortes diretamente atribuídas a essas infecções.^{1,4}

Os fungos do gênero *Candida* são reconhecidos como os principais agentes de infecções fúngicas em humanos.⁴ Em cultura, as espécies de *Candida* crescem predominantemente na forma de leveduras ovais com brotamentos e apresentam a capacidade de formar pseudo-hifas durante o crescimento. Em contraste, *Candida albicans* distingue-se das demais espécies por seu caráter dimórfico, sendo capaz de produzir hifas verdadeiras, característica que constitui um dos principais critérios utilizados para a identificação da espécie.⁶

Apesar do seu comportamento patogênico, a *Candida albicans* é um fungo que, na maior parte do tempo, apresenta comportamento comensal, compondo a microbiota de seres humanos e de diferentes animais, colonizando mucosas da cavidade oral, do trato gastrointestinal e da mucosa vaginal.^{7,8} Entretanto, alterações na microbiota que comprometem a homeostase do hospedeiro, como ocorre durante a administração de antibioticoterapia, podem favorecer a transição de *Candida albicans* de um estado comensal para patogênico, resultando em respostas inflamatórias locais e no desenvolvimento de doenças fúngicas.⁹

As doenças ocasionadas pelos fungos do gênero *Candida* são amplamente conhecidas como candidíases e essas podem ser divididas em três grandes grupos de acordo com suas manifestações clínicas: Candidíase mucocutânea, sistêmica e mucocutânea crônica.^{6,10}

A candidíase mucocutânea, pode ser dividida em superficial e de mucosa. A superficial é uma apresentação clínica que envolve a invasão de pele dos pacientes principalmente nas regiões dos seios, virilha, axilas, unhas e dedos – áreas que apresentam maior acúmulo de umidade, são quentes e estão sujeitas à fricção. Tal manifestação promove sintomas como vermelhidão e descamação de tecidos com pústulas satélites, com tendência à disseminação para áreas cutâneas adjacentes previamente saudáveis. Os principais afetados

por essa manifestação clínica são idosos e crianças, além de trabalhadores que são frequentemente expostos a açúcares ou produtos de limpeza em ambientes úmidos, podendo ser considerada até mesmo uma doença laboral nesses casos.¹¹

A candidíase de mucosa manifesta-se predominantemente na cavidade oral e na região vulvovaginal. A forma oral, conhecida popularmente como “sapinho”, ocorre com maior frequência em crianças e em indivíduos imunocomprometidos. Clinicamente, é caracterizada pela presença de placas esbranquiçadas aderidas às mucosas da cavidade oral, que podem ser removidas com relativa facilidade, expondo uma base eritematosa subjacente.¹²

Enquanto na sua forma vulvovaginal, a infecção manifesta-se por sintomas como sensação de ardor, prurido, eritema da mucosa vaginal e secreção esbranquiçada característica. Estima-se que cerca de 75% das mulheres em idade fértil apresentam ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal ao longo da vida, enquanto aproximadamente 5% a 9% experimentam formas recorrentes da doença, definidas por quatro ou mais episódios sintomáticos ao ano.^{9,12}

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento dessas manifestações, incluindo hiperglicemia decorrente da descompensação do diabetes mellitus, alterações na microbiota induzidas pelo uso de antibióticos ou pela atividade sexual, níveis elevados de estrogênio relacionados ao uso de contraceptivos, além de predisposições genéticas que podem favorecer a suscetibilidade individual à infecção.⁹

A forma sistêmica, também denominada candidíase invasiva, corresponde a uma manifestação grave geralmente causada por *Candida albicans*, caracterizada pela disseminação do fungo para órgãos internos ou pela sua presença na corrente sanguínea, configurando um quadro de infecção generalizada. A incidência estimada é de aproximadamente 90 casos por 100.000 habitantes, sendo considerada a principal manifestação clínica associada à mortalidade em pacientes imunocomprometidos. A elevada taxa de letalidade está relacionada, em grande parte, à baixa suspeita clínica, à ausência de métodos diagnósticos rápidos e sensíveis e, conseqüentemente, ao atraso no início do tratamento antifúngico adequado. Soma-se a isso a dificuldade na

prevenção, uma vez que, até o presente momento, não existem vacinas disponíveis para evitar a infecção.¹³⁻¹⁴

Diversos fatores de risco estão associados a esse tipo de infecção, incluindo aspectos étnicos, raciais e de gênero. Contudo, o principal fator predisponente relaciona-se à hospitalização, em especial nas unidades de terapia intensiva (UTIs), onde a incidência pode alcançar aproximadamente 7 casos para cada 1.000 admissões. Nesse contexto, os pacientes frequentemente são submetidos a procedimentos invasivos que comprometem a integridade das barreiras epiteliais e mucosas, como punções venosas, inserção de cateteres e instrumentação do trato urinário. Tais intervenções favorecem a translocação de *Candida* para a corrente sanguínea, possibilitando sua disseminação sistêmica e culminando no estabelecimento da doença.¹³

Por fim, a candidíase mucocutânea crônica compreende um conjunto de síndromes geralmente causadas por fungos do gênero *Candida*, em especial *Candida albicans*, caracterizadas por lesões persistentes e recorrentes em pele, unhas e mucosas. Essa condição está fortemente associada a disfunções imunológicas do hospedeiro, em especial a imunodeficiências primárias decorrentes de falhas na função dos linfócitos T. O prognóstico costuma ser desfavorável, e o tratamento baseia-se em terapias antifúngicas de longa duração, frequentemente empregando regimes de politerapia. Atualmente, novas abordagens vêm sendo investigadas no campo da biologia molecular, com foco na correção das alterações imunológicas subjacentes, particularmente aquelas relacionadas à função dos linfócitos T, visando oferecer alternativas terapêuticas mais eficazes e potencialmente curativas para os pacientes acometidos por essa síndrome.^{15,16}

Sendo assim, observa-se que o gênero *Candida* apresenta a capacidade de acometer diferentes sítios do organismo humano, adaptando-se e transitando de um estado comensal para um estado patogênico. Um dos principais mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* está relacionado à sua notável plasticidade morfológica, isto é, à capacidade de transitar entre a forma leveduriforme, geralmente associada ao estado de colonização e disseminação, e a forma filamentosa (hifas), vinculada à invasão tecidual e à ruptura de barreiras do hospedeiro. Essa transição morfológica pode ser desencadeada por

diversos fatores presentes no organismo humano, incluindo a temperatura corporal de 37 °C, variações de pH, disponibilidade de nutrientes e a presença de diferentes sinais celulares.^{17,18}

Essa alteração estrutural inicia a produção de diferentes moléculas que favorecem a invasão tecidual. Entre elas destaca-se a candidalisina, um peptídeo citotóxico secretado durante a formação das hifas, capaz de induzir danos às células epiteliais por meio da formação de poros na membrana, facilitando assim a penetração ativa do fungo e sua disseminação nos tecidos. Além disso, são expressas proteínas de adesão e invasão, como as pertencentes às famílias Als3 e Hwp1, que promovem a fixação das hifas às células do hospedeiro. Esse processo de adesão pode induzir a endocitose mediada por células epiteliais e endoteliais, mecanismo que viabiliza o acesso da *Candida* à corrente sanguínea e a tecidos mais profundos do organismo humano.¹⁷⁻¹⁸

As adesinas desempenham papel fundamental também na formação de uma das principais estruturas patogênicas de *Candida albicans*: os biofilmes. Esse processo inicia-se pela adesão das células leveduriformes a superfícies bióticas, como células epiteliais, ou abióticas, como dispositivos médicos e implantes, que atuam como substrato (“scaffold”) para o desenvolvimento da comunidade microbiana. Em seguida, ocorre a fase de proliferação, caracterizada pela transição morfológica das células leveduriformes para a forma filamentosa (hifas), etapa essencial para a consolidação estrutural do biofilme. Na fase de maturação, há secreção de uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, a qual contribui para a estabilidade da estrutura do biofilme e confere proteção contra agentes químicos, incluindo antifúngicos, além de dificultar a ação efetiva do sistema imune do hospedeiro. Além disso, os biofilmes representam um importante reservatório de infecção, visto que podem sofrer fragmentação, liberando células viáveis capazes de readesão e colonização de novos tecidos do organismo hospedeiro, favorecendo, assim, a disseminação sistêmica do fungo.¹⁷

O patógeno também é capaz de modular padrões moleculares associados a patógenos, os quais são reconhecidos por receptores do sistema imune inato e desencadeiam a resposta imunológica. Um dos mecanismos

utilizados consiste na redução da exposição de determinados PAMPs, como o β -glucano da parede celular, em resposta a alterações metabólicas relacionadas à disponibilidade de oxigênio ou a variações hormonais, o que dificulta o reconhecimento pelo hospedeiro. Além disso, *Candida albicans* secreta enzimas hidrolíticas, incluindo lipases e proteases, que degradam componentes efetores do sistema imune, como anticorpos e peptídeos antimicrobianos (defensinas), favorecendo a evasão da resposta imune e a manutenção da infecção.¹³⁻¹⁷

Diante da notável capacidade adaptativa dos fungos e da complexidade de seus mecanismos de virulência, o tratamento das infecções por *Candida spp.* constitui um elemento central para o controle da doença e a mitigação de suas complicações clínicas. Atualmente, cinco principais classes de fármacos estão disponíveis para o manejo das infecções fúngicas. Entre elas, os azóis representam a categoria mais amplamente empregada no tratamento das candidíases sistêmicas, em virtude de sua eficácia clínica, perfil de segurança relativamente favorável, custo-benefício e diversidade de formulações que possibilitam diferentes vias de administração. Outras classes, como os polienos e as equinocandinas, também são utilizadas, embora estejam frequentemente associadas a limitações importantes, sobretudo decorrentes de sua toxicidade e dos efeitos adversos relacionados ao uso prolongado.¹⁹

O mecanismo de ação dos azóis está associado à inibição da biossíntese do ergosterol, principal componente esteroidal da membrana plasmática fúngica. Essa inibição ocorre por meio da ligação coordenada entre um dos nitrogênios do anel azólico e o grupo heme da enzima lanosterol 14 α -demetilase, responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol. Como resultado, há acúmulo de intermediários metilados, redução da concentração de ergosterol e comprometimento da integridade e funcionalidade da membrana celular fúngica, levando à inibição do crescimento e eventual morte do microrganismo.^{20,21}

Entretanto, devido ao uso extensivo dos azóis, em especial do fluconazol, e ao fato de apresentarem predominantemente ação fungistática, observa-se uma elevada tendência ao desenvolvimento de resistência antifúngica por parte das espécies de *Candida*. Esse fenômeno dificulta tratamento das infecções, as quais podem colocar em risco a vida dos pacientes.

Nesse contexto, a OMS classificou, em 2022, a *Candida albicans* como patógeno de prioridade crítica, em razão de sua elevada mortalidade, prevalência e dificuldade diagnóstica, reforçando a necessidade urgente de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o manejo das doenças causadas por esse microrganismo.¹⁹⁻²²

Além disso, outras espécies de *Candida* têm demonstrado importância clínica, sendo classificadas como patógenos críticos, como é o caso da *Candidozyma auris*. Essa espécie representa um risco à saúde dos pacientes e desperta interesse clínico por sua capacidade de causar infecções invasivas, as quais são de difícil tratamento, uma vez que cerca de 90% dos isolados clínicos apresentam resistência a todos os medicamentos utilizados na terapia, somada à sua elevada virulência.²²⁻²³

Por outro lado, tuberculose é a doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), um patógeno aeróbico obrigatório que pertence à família *Mycobacteriaceae*. Tal bactéria apresenta-se como bacilos retos ou levemente curvados com um tamanho de aproximadamente 1 a 10 µm, porém algumas modificações no ambiente e tempo de cultivo, podem causar alterações morfológicas desse patógeno.²⁴

Uma das principais características que diferencia essa família bacteriana é a sua parede ricamente composta por ácidos micólicos ligados a uma estrutura de peptídeoglicanos. Essa característica dificulta o isolamento do patógeno, uma vez que a coloração de gram não é capaz de corar essa bactéria de forma eficiente.² Esse complexo envelope bacteriano está correlacionado a mecanismos de virulência dessa bactéria, uma vez que essa espessa camada de lipídios é capaz de proteger o bacilo frente a agentes químicos e ao sistema imune do hospedeiro.²⁴⁻²⁶

O ciclo da tuberculose se inicia quando partículas contendo a bactéria são aerossolizadas por indivíduos infectados e posteriormente inaladas por um novo hospedeiro, depositando-se nos pulmões. Os macrófagos residentes reconhecem o patógeno e o fagocitam na tentativa de destruí-lo. No entanto, devido a seus mecanismos de virulência, a bactéria consegue evitar a digestão, seja bloqueando a fusão do fagossomo com o lisossomo ou escapando para o citosol, estabelecendo assim uma relação parasitária com a célula de defesa.²⁷

Uma vez internalizado pelos macrófagos, o MTB começa a se replicar, excretando substâncias, como ESAT6 e ESX-1, capazes de recrutar macrófagos, tal ação ocasiona à formação de uma estrutura conhecida como granuloma, estrutura definida como um acúmulo de macrófagos fortemente interligados, cuja função é impedir a disseminação dessas bactérias para outros órgãos. No entanto, se o granuloma não consegue erradicar essa infecção, o MTB se aproveita dessa estrutura como fonte de nutrientes, parasitando as células presentes nela à medida que sua população cresce, perpetuando um ciclo vicioso de crescimento bacteriano e infecção dos macrófagos.²⁷

De forma a completar o ciclo da doença, o MTB necessita romper as barreiras impostas pelo granuloma para ser capaz de infectar o próximo hospedeiro. Sendo assim, essa bactéria utiliza-se de fatores de necrose para romper as membranas dos macrófagos, criando um ambiente propício para o desenvolvimento extracelular da bactéria, devido ao derramamento do material intracelular dessas células de defesa. Quando esses resíduos necróticos, denominados *debris* caseosos, deslocam-se para os brônquios pulmonares, desencadeiam a tosse, a qual dispersa partículas aerolizadas no ar que são capazes de infectar o próximo hospedeiro.²⁷

Apesar de ter uma alta mortalidade, tendo acometido 10,8 milhões de pessoas no mundo e levado 1,25 milhão de pessoas a óbito, no ano de 2023, a tuberculose é uma doença curável, cujo tratamento usualmente consiste em uma politerapia com 4 fármacos: a rifampicina, isoniazida, etambutol e a pirazinamida, administrados por um período de 4 a 9 meses, o qual pode ser prolongado para 18 meses em caso de infecções por cepas resistentes aos medicamentos utilizados na terapia.²⁸ No entanto, a longa duração do tratamento somado com a necessidade do uso de múltiplos antibióticos, os quais apresentam efeitos colaterais significativos, levam a uma baixa aderência a essa terapia. A elevada taxa de abandono do tratamento favorece o aparecimento de cepas resistentes a essas medicações, representando desafios futuros para o tratamento para essa doença.²⁹⁻³⁰

Devido aos problemas apresentados pelo tratamento e o aparecimento de cepas resistentes a cada vez mais antibióticos, muitos esforços estão sendo desprendidos para o desenvolvimento de novos fármacos com

melhores propriedades, de forma a contornar os problemas enfrentados na atual terapia.²⁹

Uma das principais apostas da indústria farmacêutica na busca por novos antibióticos são os peptídeos antimicrobianos (PAM), proteínas de baixo peso molecular que possuem atividade antimicrobiana, atuando como um mecanismo de defesa inata em diversos seres vivos, tanto invertebrados quanto invertebrados.³¹ Tais moléculas vem despertando o interesse de centros de pesquisa como uma alternativa promissora para enfrentar a resistência bacteriana, fato evidenciado pelo aumento constante no número de publicações científicas desde os anos 2000. Atualmente, os medicamentos baseados em peptídeos antimicrobianos correspondem a cerca de 5 a 6% do faturamento do mercado farmacêutico global, com projeções que estimam alcançar, até o ano de 2031, 64.3 bilhões de dólares, o que reflete o poder terapêuticos dessas moléculas. Diversos peptídeos antimicrobianos já estão presentes no mercado como a bacitracina, colistina, daptomicina e à vancomicina.³² Apesar do histórico consolidado desses fármacos no mercado, centros de pesquisa ainda buscam por peptídeos antimicrobianos com baixa toxicidade, amplo espectro de ação, alta potência, baixa acumulação em tecidos e baixa propensão ao desenvolvimento de resistência, atributos essenciais para que sejam considerados promissores para se tornarem compostos comercialmente viáveis, de forma a superar os desafios impostos pela resistência bacteriana.³³

A compreensão dos mecanismos de ação de novos fármacos vem se tornando uma prioridade crescente na pesquisa, visto que esse conhecimento auxilia desenvolvimento de tratamentos mais eficazes direcionados aos pacientes. No contexto dos peptídeos antimicrobianos, seus mecanismos de ação podem ser classificados em dois grandes grupos: Os rompedores de membrana e os não rompedores de membrana.³⁴

Os rompedores de membrana são peptídeos, geralmente, carregados positivamente, os quais através de ligações eletrostáticas interagem com a superfície da membrana bacteriana, a qual apresenta carga negativa, como uma forma de ancoramento inicial. Após essa interação, cadeias de resíduos de aminoácidos apolares pertencentes a esse peptídeo inserem-se na bicamada lipídica promovendo alterações de sua composição e estrutura. Essas

modificações podem levar a um afinamento ou formação de poros na membrana, causando o extravasamento do material intracelular e rompendo a integridade dessa barreira seletiva. Além disso, esses peptídeos também atrapalham o gradiente de íons H^+ , dificultando a produção de ATP, contribuindo com a morte bacteriana.³⁴

Por outro lado, os peptídeos não rompedores de membrana, também denominados como peptídeos de alvo interno, apresentam a capacidade de atravessar a membrana plasmática e interagir com alvos intracelulares causando alterações metabólicas que levam a morte bacteriana. Dessa forma, essas moléculas atuam por diversos mecanismos como a inibição do sistema de reparo de ácidos nucleicos, bloqueio da replicação celular, inibição da atividade enzimática, e interferência na biossíntese da parede celular, DNA, RNA e outras biomoléculas essenciais. Sendo assim, tais processos interrompem a multiplicação bacteriana, contribuindo para a contenção e eliminação da infecção.³⁴

Essas moléculas apresentam outras funções no organismo humano além da sua capacidade inibidora de patógenos, como sua característica imunomoduladora. Os peptídeos podem agir de forma inicial na formação de respostas imunes adaptativas, recrutando células de defesa ou modulando a resposta inflamatória, o que contribui com o controle da duração e a intensidade dessas reações imunológicas.³⁴

As brevininas-1 constituem um grupo de peptídeos antimicrobianos isolados do muco da pele de sapos do gênero *Ranidae*, as quais apresentam um amplo espectro de ação frente a bactérias. Porém, sua elevada lipofilicidade confere a essas moléculas uma alta atividade hemolítica.³⁵ Dessa forma, análogos desse peptídeo foram desenvolvidos de forma a superar os problemas apresentados por essas moléculas, resultando na criação do peptídeo B1CTcu5, pertencendo a família das brevininas com uma alta similaridade ao seu peptídeo de original. Esse análogo demonstrou atividade anti-MTB, com concentração inibitória mínima de $12,5 \pm 0,5$ $\mu g/ml$ frente a cepa padrão H37RV, baixa toxicidade frente a macrófagos THP1 e indução de alterações morfológicas na membrana bacteriana, indicando um mecanismo de ação relativo à desestabilização da membrana plasmática. Dessa forma essa molécula é

considerada como um modelo para o desenvolvimento de análogos de peptídeo capazes de causar danos a patógenos intracelulares.³⁶

O grupamento imidazol é um anel heterocíclico de cinco membros composto por três carbonos, dois nitrogênios, quatro hidrogênios e duas ligações duplas com a fórmula molecular $C_3H_4N_2$. Por apresentar uma alta polaridade demonstra uma alta solubilidade em água e outros solventes polares. Dessa forma, essa molécula é frequentemente utilizada como substituinte em fármacos com alta hidrofobicidade, auxiliando na melhoria de suas propriedades farmacocinéticas. Além disso, essa molécula também apresenta uma atividade antimicrobiana inerente, sendo considerada o grupamento farmacofórico dos azóis.^{20,21,37}

Dessa forma, diversos fármacos incorporam anéis imidazólicos em suas estruturas visando a melhoria de suas propriedades farmacológicas. Um exemplo é o estudo conduzido por Narasimhan et al. (2011), o qual sintetizou diversos compostos derivados do imidazol os quais apresentaram atividade frente diversos organismos, incluindo fungos como a *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, e bactérias como o MTB, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Nesse estudo, o grupamento imidazol demonstrou ser uma parte crucial para o aumento da atividade antimicrobiana das moléculas.³⁸

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma biblioteca de moléculas análogas ao peptídeo antimicrobiano B1CTcu5, dentre as quais o composto CRBR04 apresentou resultados promissores frente ao MTB, com concentração inibitória mínima (CIM) de 5 µg/mL e índice de citotoxicidade 50 (IC₅₀) superior a 250 µg/mL. Dessa forma, CRBR04 configura-se como um candidato promissor para estudos posteriores. O presente trabalho tem como objetivo realizar a conjugação do peptídeo CRBR04 com um grupamento imidazol e avaliar sua atividade frente a diferentes patógenos de interesse clínico.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade de análogos do peptídeo CRBR04, associado com um grupamento imidazol frente a alguns patógenos de importância clínica.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar o peptídeo antimicrobiano CRBR04 e seus análogos conjugados com o grupamento imidazol;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos análogos frente cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis aos medicamentos da terapia atual, *Candida albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol
- Determinar o índice de citotoxicidade dos peptídeos CRBR04 e seus análogos frente a linhagem celular Caco-2;
- Determinar a atividade hemolítica do peptídeo CRBR04 e seus análogos;
- Determinar a atividade dos análogos do peptídeo CRBR04 frente a biofilmes de *Candida albicans* resistentes.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Ensaio *in silico*

Como objetivo de aprimorar a atividade da sequência peptídica, foram realizados desenhos racionais de análogos compostos por menos resíduos de aminoácidos. Essa estratégia baseou-se em, além de melhorar a atividade biológica, reduzir o tempo de síntese e os custos, além de auxiliar na prevenção de danos ambientais em concordância com a química verde. A partir da sequência do peptídeo CRBR04 realizou-se ensaios *in silico* empregando a plataforma AntiTBpred. Essa ferramenta emprega técnicas de aprendizado de máquina, fornecendo dados sobre impedimento estérico, anfipaticidade, número líquido de ligações de hidrogênio e ponto isoelétrico. A partir dessas análises foram selecionados os fragmentos com melhores valores preditivos de atividade frente ao MTB. O resíduo de histidina presente na molécula sofreu variações na sua posição de forma estratégica para que fosse possível observar em quais posições esse aminoácido apresentaria um melhor perfil de atividade. As bibliotecas resultantes foram submetidas a uma segunda fase de análise *in silico* com o AntiTBpred, priorizando as moléculas que apresentaram melhor perfil de inibição. Os fragmentos selecionados foram sintetizados e levados aos ensaios *in vitro*.³⁹⁻⁴⁰

3.2 Síntese dos peptídeos em fase sólida

3.2.1 Síntese do peptídeo CRBR04 e seus primeiros análogos

O peptídeo CRBR04, e seus respectivos análogos, um com a adição de uma histidina na sua cadeia C-terminal e outro no N-terminal, foram sintetizados em fase sólida, partindo de uma resina do tipo Wang, com o primeiro aminoácido da cadeia já acoplado seguindo o protocolo Fmoc/t-Bu. Nesse protocolo os grupamentos α -amino dos resíduos de aminoácidos que foram acoplados na cadeia encontram-se protegidos por um grupamento base lábil 9-fluorenilmetoxycarbonila, enquanto grupos reagentes de suas cadeias laterais se encontram protegidos por grupamentos ácido lábeis derivados de *terc*-butila. A partir da base polimérica que já continha o aminoácido acoplado foram

realizadas reações contínuas de desproteção dos grupamentos α -amino e acoplamento de resíduos de aminoácidos, partindo da extremidade C-terminal do peptídeo, até a completa polimerização da cadeia. Na tabela 1, observa-se a estrutura primária dos peptídeos sintetizados.

Tabela 1 - Estrutura primária dos análogos do peptídeo CRBR04 e informações sobre hidrofobicidade, carga e peso molecular

Peptídeo	Sequência	Índice Gravy	Carga (pH = 7)	Peso molecular (g/mol)
CRBR04	WLIAGLAANFLPQILSKIARKS	0.67	3	2410,9
HCRBR04	WLIAGLAANFLPQILSKIARKSH	0.50	3,1	2548,0
CRBR04H	HWLIAGLAANFLPQILSKIARKS	0.50	3,1	2548,0

Fonte: Autor

Para que a reação aconteça de forma mais rápida, a ativação do grupo carboxila do aminoácido a ser acoplado se faz necessária. Dessa forma, foram empregados os reagentes de acoplamento diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-hidroxibenzotriazol (HOBt), com excesso molar de três vezes, solubilizados em dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM) (1:1), tais reagentes promovem a formação de um éster ativo que é atacado nucleofilicamente pela amina livre permitindo a ligação peptídica. A reação ocorreu por duas horas, e após esse período eram realizadas lavagens utilizando DMF e DCM, de forma a remover subprodutos e reagentes em excesso.⁴¹

Após cada reação, foi realizado o ensaio de Kaiser para a confirmação do acoplamento do resíduo de aminoácido. Tal ensaio baseia-se na utilização da ninidrina, composto que reage em altas temperaturas a grupamento amina livres tornando-se azul, demonstrando a eficiência da reação de acoplamento. (Kaiser, 1970). Caso o teste de Kaiser demonstre que a ligação peptídica não tenha ocorrido de forma completa, uma nova tentativa de acoplamento é empregada utilizando os mesmos reagentes de acoplamento. Porém, se o teste não apresentar a coloração azulada, realiza-se a desproteção do grupamento α -

amino com uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF, permitindo-se assim o início de um novo ciclo de acoplamento.

Após a completa síntese da cadeia peptídica, realizou-se a clivagem, uma reação que possui como intuito separar o peptídeo da resina e remover os grupamentos derivados de *terc*-butila, os quais protegiam as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos utilizados. Nessa etapa, empregou-se um coquetel de clivagem composto por 95% de ácido trifluoracético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água deionizada, o qual reagiu com a resina por duas horas, sob agitação branda e temperatura ambiente não controlada.

Os peptídeos foram precipitados utilizando éter etílico gelado, levando a formação de um precipitado branco, o qual foi adicionado em tubos cônicos e centrifugados a 10.000 rpm, por 15 minutos, de forma a separar o precipitado contendo o peptídeo, da fase etérea. Esse processo foi repetido três vezes com o intuito de remover os contaminantes presentes nessa reação. Em seguida, extraiu-se os peptídeos empregando uma solução de ácido acético 15% (v/v), a qual foi rotaevaporada e liofilizada.

3.2.2 Síntese dos fragmentos do peptídeo antimicrobiano CRBR04

Para a síntese dos fragmentos do peptídeo antimicrobiano CRBR04, foi empregada a mesma metodologia descrita anteriormente, com algumas modificações específicas. Inicialmente, a resina utilizada foi substituída por uma resina Rink-amida sem o aminoácido inicial previamente acoplado, possibilitando maior flexibilidade na construção da cadeia peptídica. Além disso, o reagente de extração foi modificado, sendo utilizada uma solução de acetonitrila (ACN) 15% (v/v) em substituição ao ácido acético a 15% (v/v), com o objetivo de otimizar a recuperação do peptídeo sintetizado.

3.2.3 Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos

O material bruto obtido após a liofilização foi submetido à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 × 250 mm, 5 µm) em modo semipreparativo. Para as análises em modo analítico, foram empregadas as fases móveis A (0,045% de TFA em água) e B (0,036% de TFA em ACN), com aplicação de um gradiente

linear de 5% a 95% da fase B ao longo de 30 minutos, em fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 220 nm, para monitoramento das ligações peptídicas, e 280 nm, visando a detecção específica de resíduos de triptofano.

Para a análise qualitativa das amostras, foi empregado um sistema de cromatografia líquida Shimadzu LC-10A/C-47A, acoplado a um detector UV/Vis do mesmo modelo. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 × 150 mm, 5 µm). As condições cromatográficas consistiram na aplicação de um gradiente linear de 0,33% min⁻¹ do solvente B ao longo de 90 minutos, com fluxo constante de 5 mL min⁻¹. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm.

A caracterização dos peptídeos puros foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo positivo (ESI-MS⁺), utilizando-se um espectrômetro de massas Bruker Amazon equipado com analisador do tipo íon trap.

3.3 Ensaios *in vitro*

3.3.1 Cultivo microbiológico

3.3.1.1 Cultivo de cepas de MTB

Para os ensaios com micobactérias, foi utilizada a cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Criotubos contendo a cepa foram descongelados e seu conteúdo foi semeado em tubos inclinados contendo meio sólido seletivo Lowenstein-Jensen (LJ). Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por aproximadamente 21 dias, até o crescimento de colônias visíveis. Posteriormente, colônias isoladas foram transferidas para meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina bovina, dextrose, catalase), sendo incubadas em agitador orbital (shaker) a 37 °C por 7 dias.

3.3.1.2 Cultivo de bactérias de nível NB2

Foram utilizadas cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Gram-positiva). Os criotubos contendo as cepas foram descongelados, e 30 µL de cada cultura foram inoculados, em tudo distintos, em meio líquido Luria-Bertani (LB), seguido de incubação em shaker a 37 °C por 24 horas.

3.3.1.3 Cultivo de cepas de *Candida albicans*

Para os ensaios utilizou-se as cepas de *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231. Os microorganismos que se encontravam liofilizados foram reativados em caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi®), sendo incubados em shaker por 24 horas. Após o crescimento, alíquotas do cultivo foram plaqueadas em meio sólido ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Kasvi®) e incubadas a 37 °C por 48 horas. As placas obtidas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) até sua utilização nos ensaios.

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM90)

3.3.2.1 Cepas de MTB

O ensaio de atividade antimicrobiana foi conduzido conforme a metodologia de microdiluição em placas de 96 poços, utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular (REMA – *Resazurin Microtiter Assay*), conforme descrito por Palomino et al. (2002).⁴²

Inicialmente, foram adicionados 100 µL de meio de cultura Middlebrook 7H9, suplementado com 10% de OADC, nos poços das colunas 1 a 11 da placa. Em seguida, 100 µL de uma solução dos peptídeos de interesse, previamente solubilizados em DMSO, foram adicionados nos poços da coluna 2 (um composto por linha). Após homogeneização, procedeu-se à diluição seriada bidirecional ao longo das colunas, transferindo-se 100 µL da solução da coluna 2 para a coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna 10, com homogeneização entre cada transferência. Os 100 µL finais da diluição (provenientes da coluna 10) foram transferidos para os poços correspondentes da coluna 1, configurando o controle de esterilidade do composto.

As suspensões microbianas utilizadas nos ensaios foram preparadas a partir de culturas ativas, diluídas em meio de cultura apropriado até atingirem densidades celulares específicas. Para as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, foi utilizada uma suspensão correspondente 1,0 na escala de McFarland (3×10^8). Posteriormente, todas as suspensões foram diluídas na proporção de 1:100 em meio de cultura e, então, 100 µL de cada suspensão diluída foram adicionados aos poços das colunas 2 a 11 da placa de 96 poços previamente preparada com os compostos.

Os devidos controles experimentais foram incluídos no ensaio. Em uma das linhas da placa foi realizado o controle do solvente, com a adição da mesma concentração de DMSO utilizada na solubilização dos compostos, a fim de avaliar seu possível efeito intrínseco sobre os micro-organismos testados. Os poços da coluna 11 foram adicionados apenas a suspensão microbiana e o meio de cultura, constituindo o controle positivo de crescimento. E, por fim, os poços da coluna 12 receberam 200 µL do meio de cultura estéril, configurando o controle negativo do crescimento microbiano.

As placas de 96 poços foram incubadas sob condições apropriadas de temperatura (37 °C) por um período de 7 dias. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de uma solução de resazurina a 0,01% (m/v) a cada poço, seguida de uma nova incubação de 24 horas.

A leitura foi realizada em leitor de microplacas Cytation 3 (BioTek®), utilizando comprimento de onda de excitação em 530 nm e de emissão em 590 nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir $\geq 90\%$ do crescimento microbiano em comparação ao controle positivo, conforme determinado pela intensidade do sinal de fluorescência.

3.3.2.2 Cepas bacterianas de nível NB2

O ensaio com cepas bacterianas de nível 2 (NB2), foi conduzido de forma similar ao descrito para o MTB, com adaptações. Para o preparo do inóculo, utilizou-se uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$), considerando a elevada taxa de multiplicação

dessas bactérias, a fim de evitar supercrescimento durante o período experimental.

A revelação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da adição de 30 µL de solução de resazurina a 0,01% (m/v) após 24 horas de incubação. A leitura foi realizada 6 horas após a adição do corante, utilizando leitor de microplacas (Cytation 3, BioTek®) nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm.

3.3.2.3 Cepas fúngicas

Para a determinação do CIM90 frente à *Candida albicans* utilizou-se de um ensaio de microdiluição em placas de 96 poços semelhante ao descrito anteriormente, com adaptações específicas para o microrganismo fúngico. O inóculo foi preparado a partir de culturas estoque mantidas sob refrigeração em meio SDA. As colônias foram reativadas em meio SDB por 24 horas a 37 °C sob agitação em shaker.

Após o período de crescimento, uma alíquota da cultura foi diluída em SDB até atingir uma densidade óptica entre 0,100 e 0,150 Å a 530 nm, o que corresponde a uma concentração fúngica estimada de aproximadamente 1×10^6 UFC·mL⁻¹. Esta suspensão foi posteriormente diluída para obtenção do inóculo final utilizado nos ensaios, com concentração ajustada para 1×10^3 UFC·mL⁻¹.

A avaliação da viabilidade celular e da inibição do crescimento foi realizada por meio da leitura da densidade óptica de cada poço a 530 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Epoch, BioTek®).

3.3.3 Ensaios em biofilme de *Candida albicans*

A capacidade de inibição da formação de biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 10231) pelos peptídeos foi avaliada por meio de ensaios em placas de 96 poços. No qual diferentes períodos de incubação foram empregados a fim de observar distintos estágios de desenvolvimento do biofilme.

3.3.3.1 Biofilme pré-formado

Um inóculo fúngico foi preparado com densidade óptica de 0,380 a 320 nm, correspondente a $1,0 \times 10^7$ UFC·mL⁻¹, e posteriormente diluído para $1,0 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹. Em seguida, 100 µL desse inóculo foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços, juntamente com 100 µL das soluções de tratamento. Dessa forma, foi possível avaliar a capacidade dos compostos em inibir a formação do biofilme durante a co-incubação com as células fúngicas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e a densidade dos biofilmes foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

3.3.3.2 Biofilme pré-maduro

Para este ensaio, o inóculo a $1,0 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹ foi adicionado às placas e incubado por 24 h a 37 °C, permitindo a adesão celular e a formação inicial do biofilme. Após esse período, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com solução tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) para eliminar células planctônicas. Em seguida, adicionou-se um novo meio de cultura contendo os tratamentos. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 48 h, e a densidade do biofilme foi quantificada por leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

3.3.4 Ensaios celulares

3.3.4.1 Cultivo celular

Os testes envolvendo células utilizaram da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2, as quais foram mantidas em garrafas de cultivo celular seguindo as condições específicas conforme suas necessidades metabólicas

Essa linhagem foi mantida em meio DMEM alta glicose com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos e antimicóticos. Seus meios de cultivo foram trocados a cada três dias, com a ausência de uma lavagem prévia garrafa com tampão fosfato.

As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera umidificada com saturação de CO₂ de 5%, até atingirem uma confluência celular de 70% para serem utilizadas nos experimentos.

3.3.4.2 Índice de citotoxicidade

Para esse ensaio, as culturas mantidas em garrafas de cultivo tiveram seu meio de cultura removido e foram lavadas com PBS, visando a remoção de resquícios de SFB que poderiam inibir a ação da enzima tripsina. As células foram desprendidas da garrafa por tripsinização, com exceção dos macrófagos RAW 264.7, os quais foram removidos por ação mecânica usando um *cell scraper*.

Para as células tratadas com tripsina, adicionou-se um volume três vezes maior ao adicionado de tripsina de meio de cultura contendo SFB, de forma a inativar essa enzima. As suspensões celulares foram centrifugadas 3.000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspenso em 2 ml de meio de cultura fresco correspondente a linhagem celular utilizada.

Em seguida, as células eram quantificadas realizando a contagem em câmara de Neubauer, com essa determinação calculava-se a diluição adequada para a obtenção de 1×10^3 células por poço. Após o plaqueamento as placas eram incubadas em estufa a 37 °C com saturação de CO₂ de 5%, por 24 horas para permitir a aderência celular.

Após o período de incubação, confirmava-se a aderência celular utilizando um microscópio invertido. Com essa confirmação, o meio de cultura era cuidadosamente retirado da placa e substituído por um novo meio contendo diferentes concentrações dos compostos de interesse. Nesse experimental foram utilizados os controles de viabilidade celular (controle positivo de crescimento), de esterilidade do meio de cultura (controle negativo de crescimento) e de esterilidade do composto.

Por fim, a placa teste era incubada por 24 horas em estufa, e, ao final desse período, adicionou-se 30 µl de resazurina à 0,01 (m/v) em cada poço. A leitura da viabilidade celular foi realizada após 6 horas, utilizando leitor de microplacas (Cytation 3, BioTek®) utilizando comprimento de onda de excitação em 530 nm e de emissão em 590 nm.

3.3.4.3 Ensaio hemolítico

O ensaio de hemólise foi realizado conforme descrito por Oddo e Hansen, com modificações. Amostras de sangue do tipo O+ foram coletadas em tubos heparinizados e lavadas três vezes com tampão PBS (pH 7,4), até que o sobrenadante se apresentasse límpido e as hemácias estivessem adequadamente precipitadas.

Uma suspensão de eritrócitos em concentração conhecida foi diluída em uma escala de 1:100 em tampão PBS. Como controle positivo de hemólise foi utilizada uma solução de Triton X-100 a 1% em tampão PBS (100% de hemólise), enquanto o PBS foi utilizado como controle negativo (0% de hemólise).⁴³

Os compostos em estudo foram submetidos a diluições seriadas em PBS. Em seguida, 100 µL de cada diluição, bem como das soluções controle, foram adicionados a poços de uma placa de 96 poços, juntamente com 100 µL da suspensão padronizada de eritrócitos. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C, e a absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas a 540 nm.

A porcentagem de hemólise foi calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ de Hemólise} = \frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs Controle negativo})}{(\text{Abs Controle positivo} - \text{Abs Controle negativo})} \times 100$$

Foram considerados hemolíticos os peptídeos que apresentaram valores superiores a 50% de lise celular.

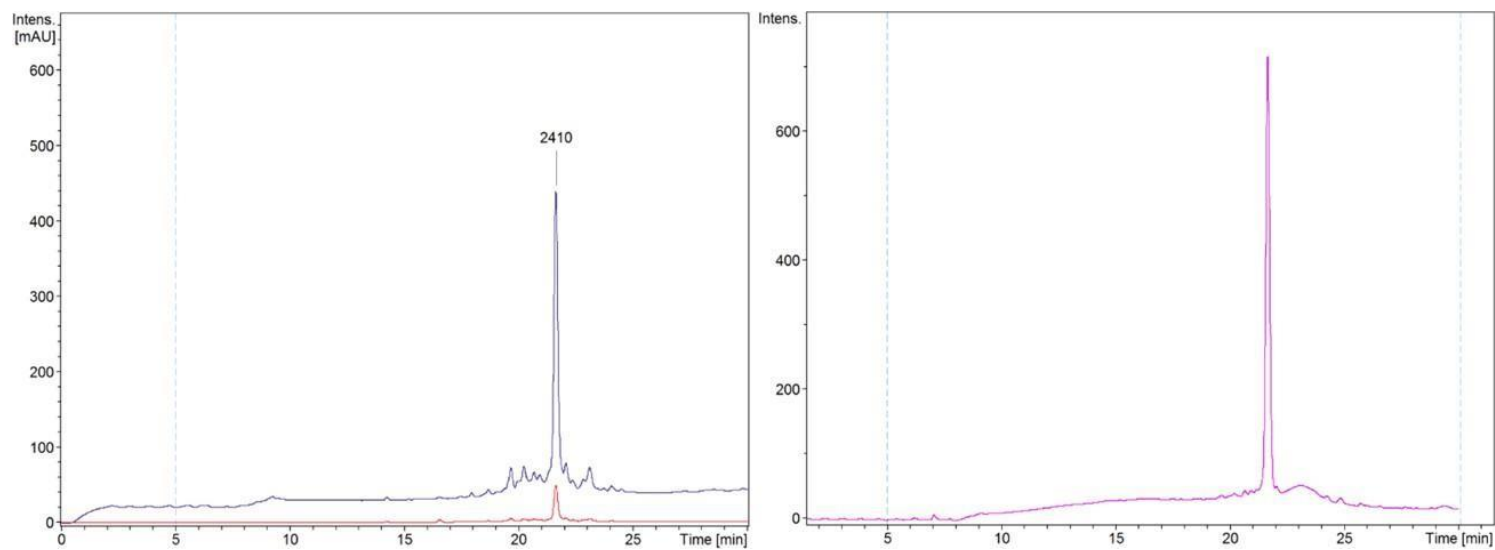
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, purificação e desenvolvimento dos peptídeos

O trabalho teve como ponto inicial a síntese de análogos do peptídeo antimicrobiano CRBR04 conjugados com grupamentos imidazol, na procura por uma melhora na atividade antimicrobiana da molécula, baseada em características desse substituinte descritas na literatura como um agente antimicrobiano²⁰. Para viabilizar essa combinação utilizou-se da histidina, um aminoácido que contém em sua cadeia lateral um grupamento imidazol. Dessa forma, sintetizou-se dois análogos do peptídeo: um contendo uma molécula de histidina acoplada na porção C-terminal (CRBR04-his) e outro na porção N-terminal da molécula (his-CRBR04) com o objetivo de analisar a influência da posição desse resíduo de aminoácido na atividade do antimicrobiana.

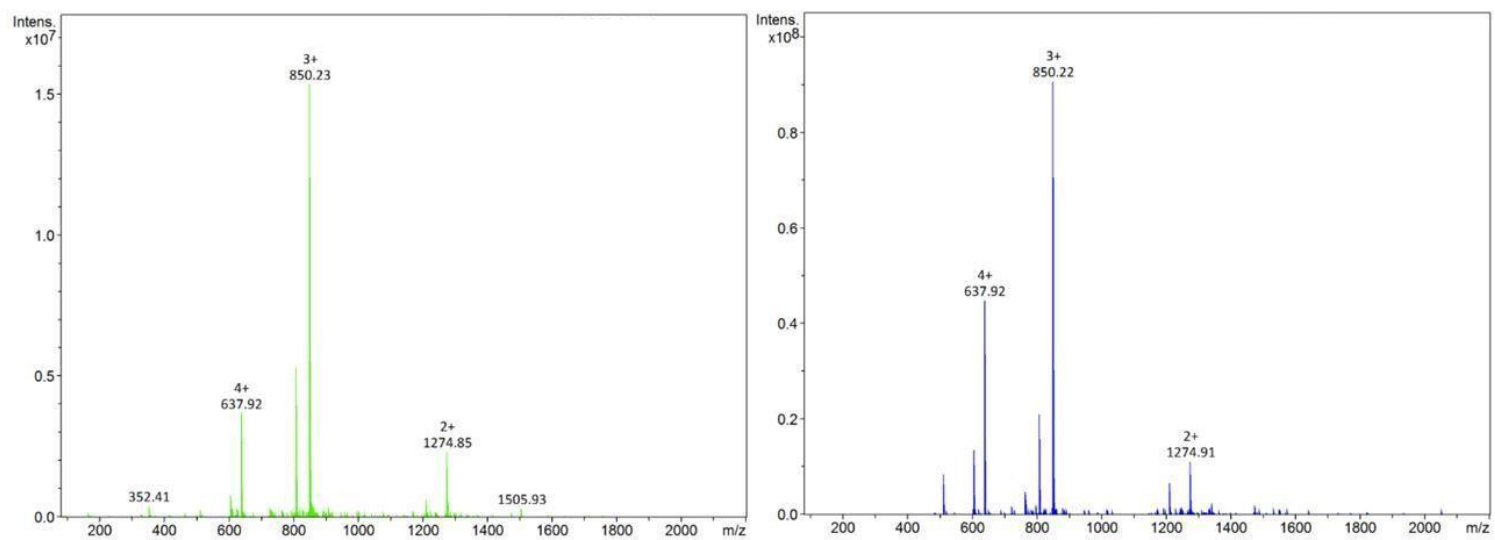
Os peptídeos foram sintetizados de forma manual em resina Wang, de forma que os aminoácidos foram adicionados de forma sequencial, respeitando a ordem das cadeias peptídicas de interesse. Devido à presença de um resíduo de triptofano na molécula foi possível analisar os peptídeos através de técnicas de UV-vis e fluorescência. Os peptídeos foram clivados e purificados através de HPLC em coluna C18 em fase reversa com objetivo de obter-se o maior grau de pureza possível. O perfil cromatográfico obtido pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3. Por fim, os materiais purificados foram caracterizados por espectroscopia de massas, visando confirmar identidade molecular desses compostos através da razão massa carga (m/z), como é possível observar na tabela 3. Entretanto, devido ao alto teor de impurezas do material bruto do peptídeo HCRBR04, não foi possível obter esse peptídeo, uma vez que a realização de purificação dessa molécula garantiria um baixo rendimento em massa, inviabilizando sua utilização experimental.

Figura 1 - Cromatograma peptídeo CRBR04 bruto e puro



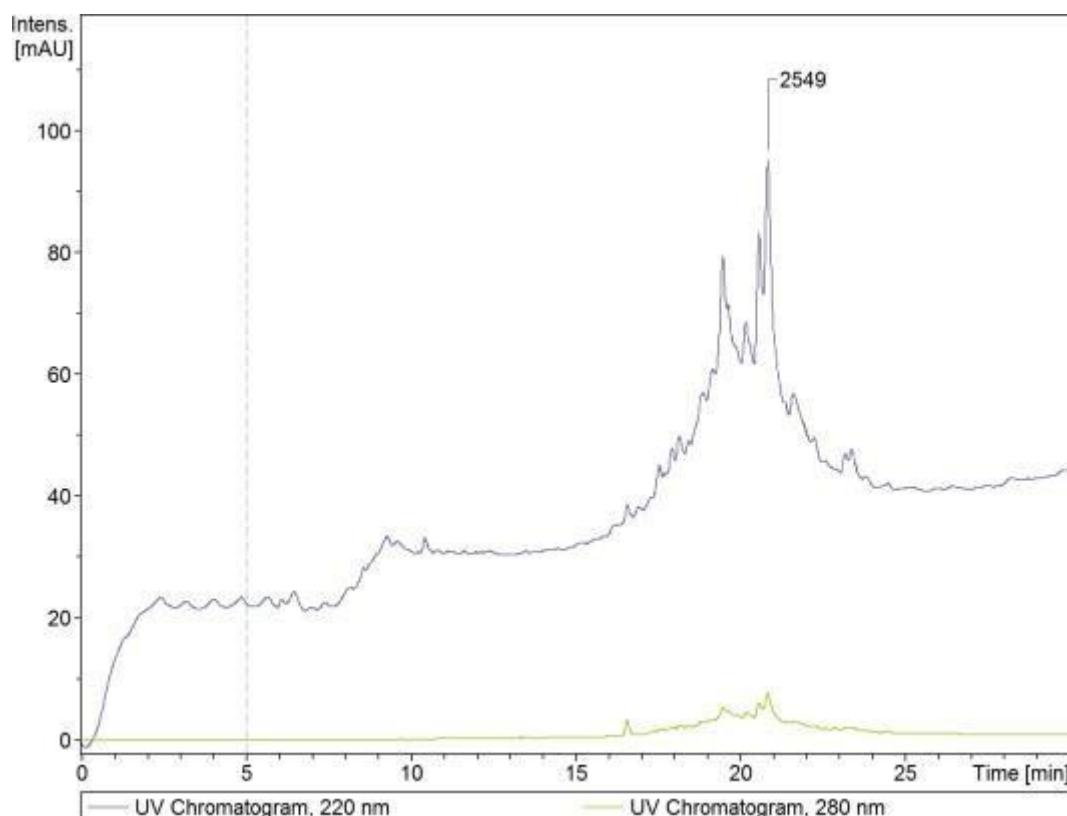
Fonte: Autor

Figura 2 - Cromatograma peptídeo his-CRBR04 bruto e puro



Fonte: Autor

Figura 3 Cromatograma peptídeo CRBR04-his bruto



Fonte: Autor

Posteriormente, na busca por peptídeos antimicrobianos com atividade aprimorada e cadeias peptídicas mais curtas, empregou-se uma técnica de machine learning. Essa análise foi conduzida a partir dos dados obtidos dos peptídeos CRBR04 e his-CRBR04.

O software preditivo realizou o truncamento da sequência do peptídeo his-CRBR04, gerando fragmentos do peptídeo original. Através de uma análise computacional, atribuiu-se uma pontuação para cada fragmento que relacionava a probabilidade de atividade antimicrobiana frente ao MTB, na qual quanto maior a pontuação atribuída, maiores seriam as probabilidades de o fragmento apresentar atividade antimicrobiana. Foram considerados peptídeos anti-MTB aqueles que apresentaram uma pontuação $>0,2$.

Através dessa análise computacional, foi possível observar que os peptídeos que continham uma histidina na sua extremidade N-terminal, apresentavam uma maior probabilidade de atividade frente ao bacilo, quando comparados aos seus análogos sem esse resíduo. Além disso, verificou-se que

os peptídeos que continham um alto número de aminoácidos relacionados a extremidade C-terminal da molécula original estavam correlacionados a uma baixa pontuação. Sugerindo que esses resíduos por ação alostérica ou conformacional atrapalhavam interação do peptídeo com seu alvo, reduzindo sua atividade. Com base nas predições obtidas, selecionou-se os peptídeos com maiores pontuações para serem sintetizados e posteriormente avaliados em ensaios *in vitro*. As sequências selecionadas, juntamente com suas pontuações encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Escores dos truncamentos do peptídeo CRBR04

Peptídeo	Estrutura	Pontuação sem histidina	Pontuação com histidina	Diferença
CRBR04	WLIAGLAANFLPQILSKIARKS	0,6905	0,6986	0,0080
VC7	HWLIAGLA	1,1554	1,4066	0,2511
VC8	HWLIAGLAA	0,9350	1,1516	0,2165
VC9	HWLIAGLAAN	1,0832	1,1881	0,1048
VC10	HWLIAGLAANF	1,0523	1,1534	0,1010

Fonte: Autor

Os novos peptídeos selecionados foram sintetizados em resina Rink-amida, uma vez que resultados prévios observados por outros autores relatam maiores atividades anti-TB advindos de compostos sintetizados nesses suportes. A purificação ocorreu forma similar ao apresentado anteriormente, porém os fragmentos do peptídeo CRBR04 apresentavam uma alta insolubilidade em solventes aquosos, como pode ser visto na tabela 3, o que dificultou a purificação por modo gradiente em fase reversa utilizando uma coluna C18. Dessa forma, foi necessário implementar uma etapa de pré-purificação utilizando o HPLC em modo isocrático, com objetivo de reduzir a complexidade da amostra antes da purificação em modo gradiente. Sendo assim, a purificação desses compostos se mostrou comprometida, apresentando menores graus purezas em relação aos análogos previamente obtidos, como é possível observar nos cromatogramas das figuras 4, 5, 6, 7. Os espectros de massa dos compostos podem ser observados nas figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e

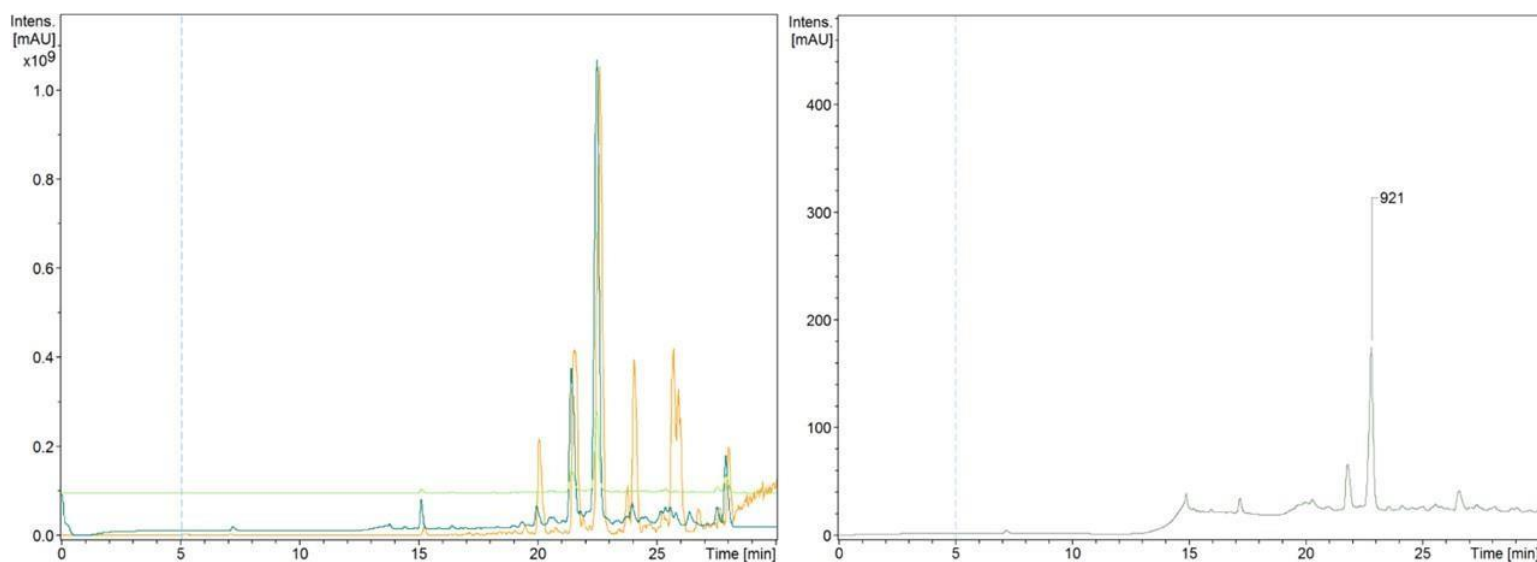
suas respectivas análises encontram-se compiladas na tabela 4, confirmando a identidade molecular dos compostos mesmo diante das dificuldades de purificação.

Tabela 3 - Estrutura primária dos fragmentos do peptídeo CRBR04 e informações sobre hidrofobicidade, carga e peso molecular

Peptídeo	Sequência	Índice Gravy	Carga (pH=7)	Peso molecular (g/mol)
VC7	HWLIAGLA	1,4	0,1	921,1
VC8	HWLIAGLAA	1,44	0,1	992,1
VC9	HWLIAGLAAN	0,95	0,1	1106,2
VC10	HWLIAGLAANF	1,18	0,1	1235,4

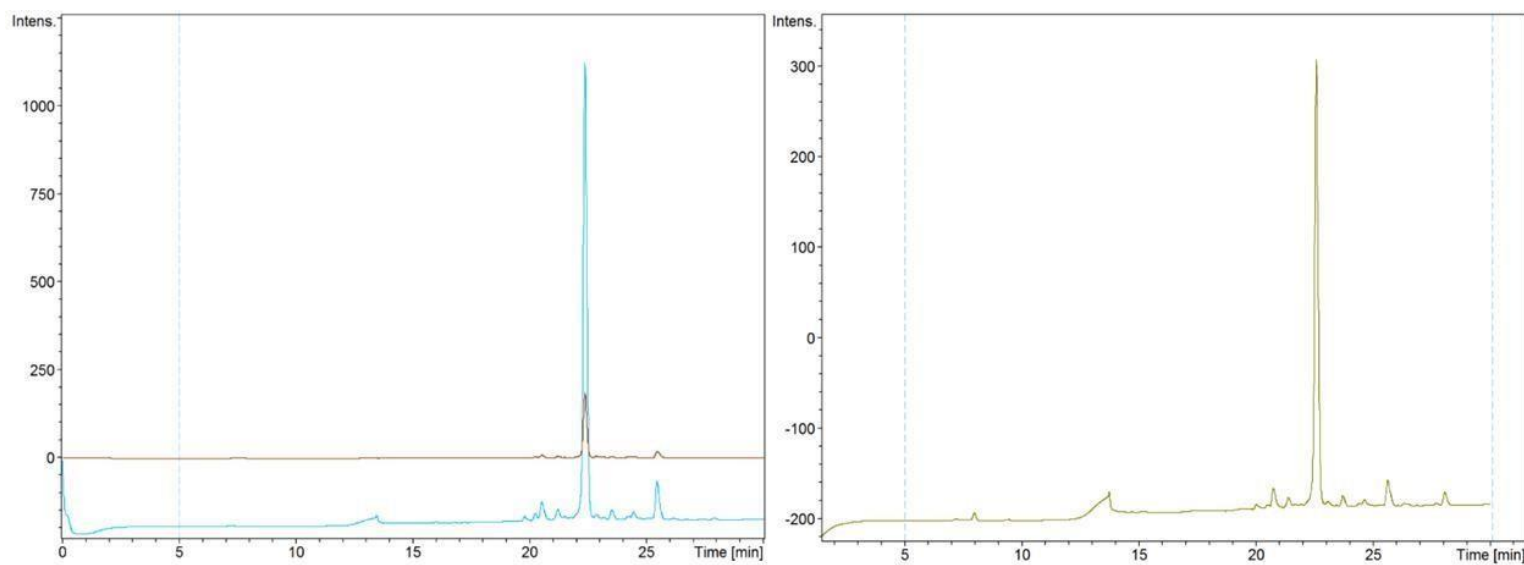
Fonte: Autor

Figura 4 - Cromatograma peptídeo VC7 bruto e puro



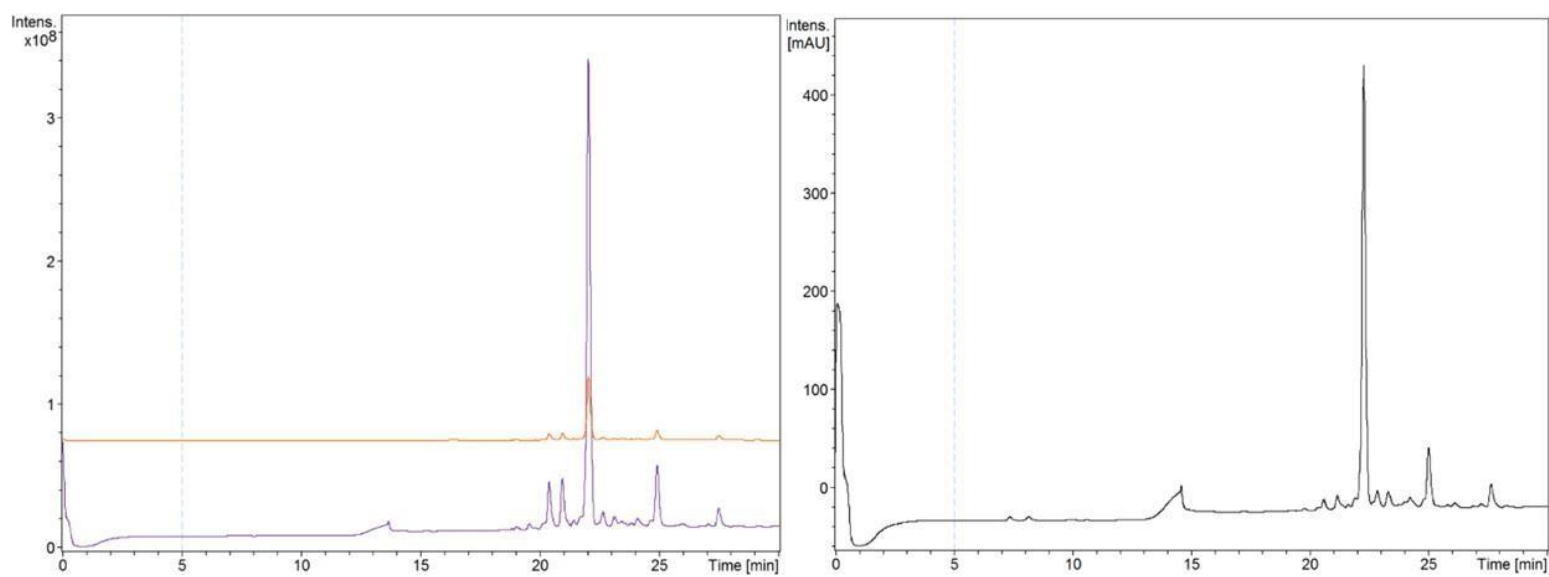
Fonte: Autor

Figura 5 - Cromatograma peptídeo VC8 bruto e puro



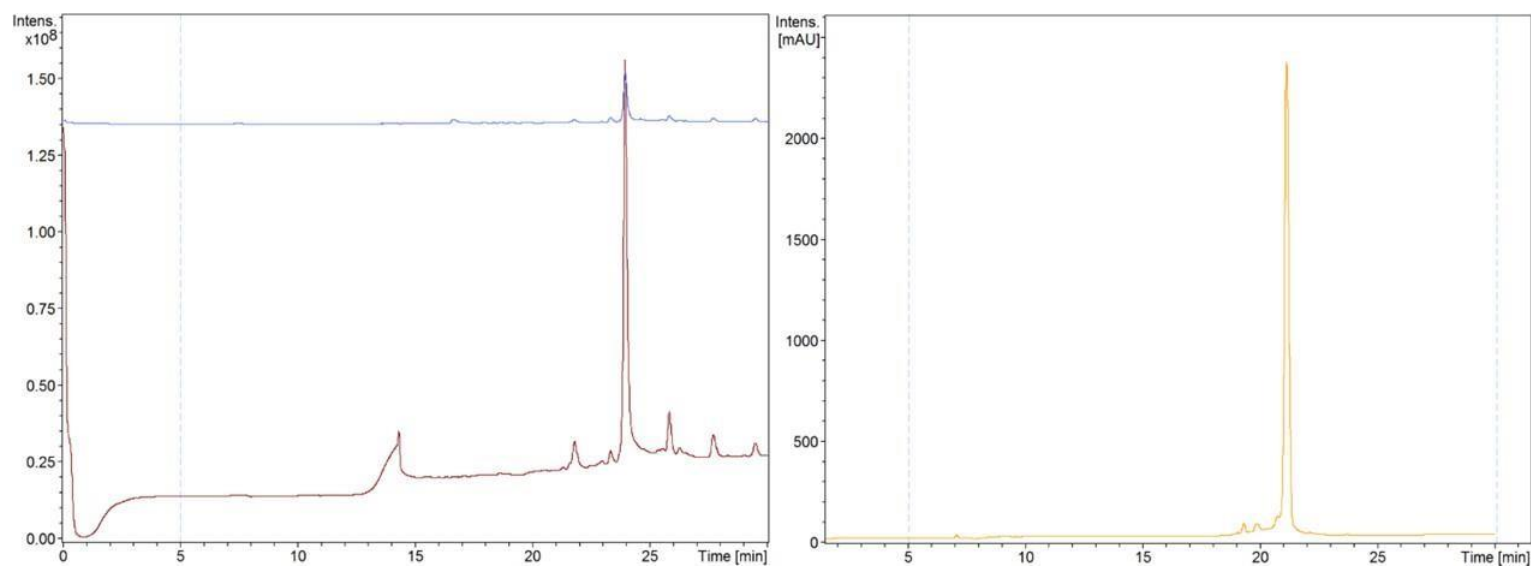
Fonte: Autor

Figura 6 - Cromatograma peptídeo VC9 bruto e puro



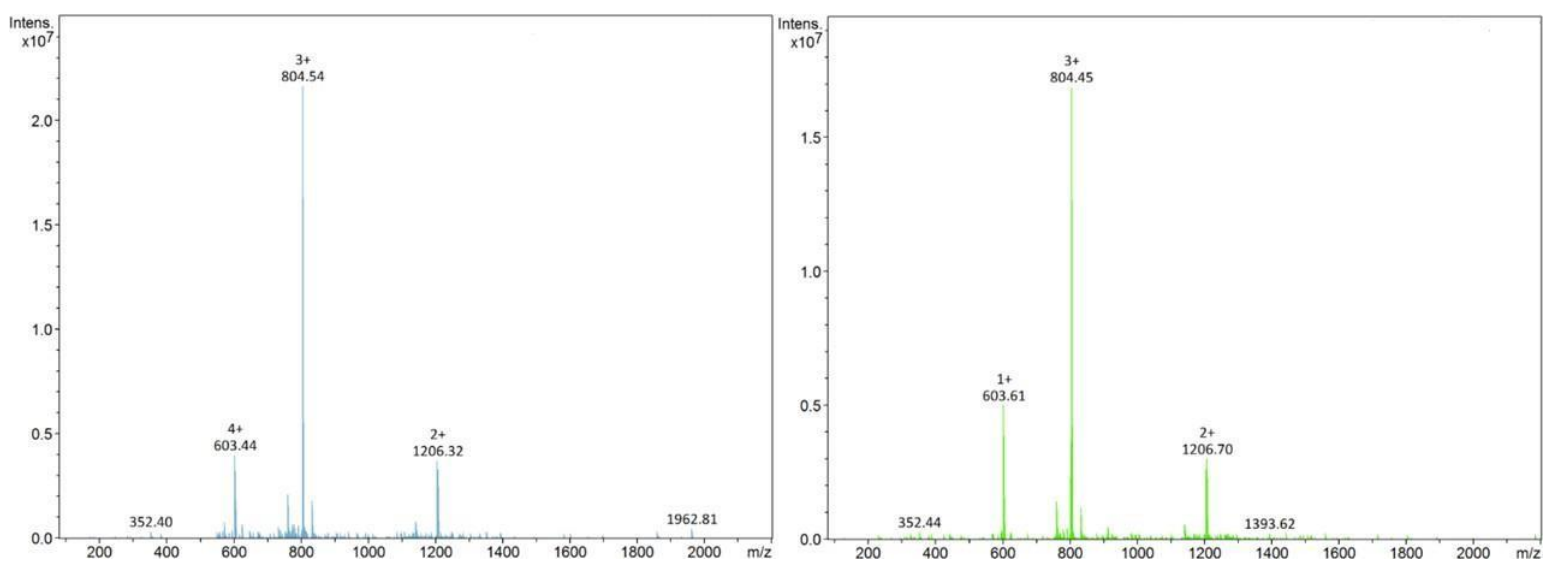
Fonte: Autor

Figura 7 - Cromatograma peptídeo VC10 bruto e puro



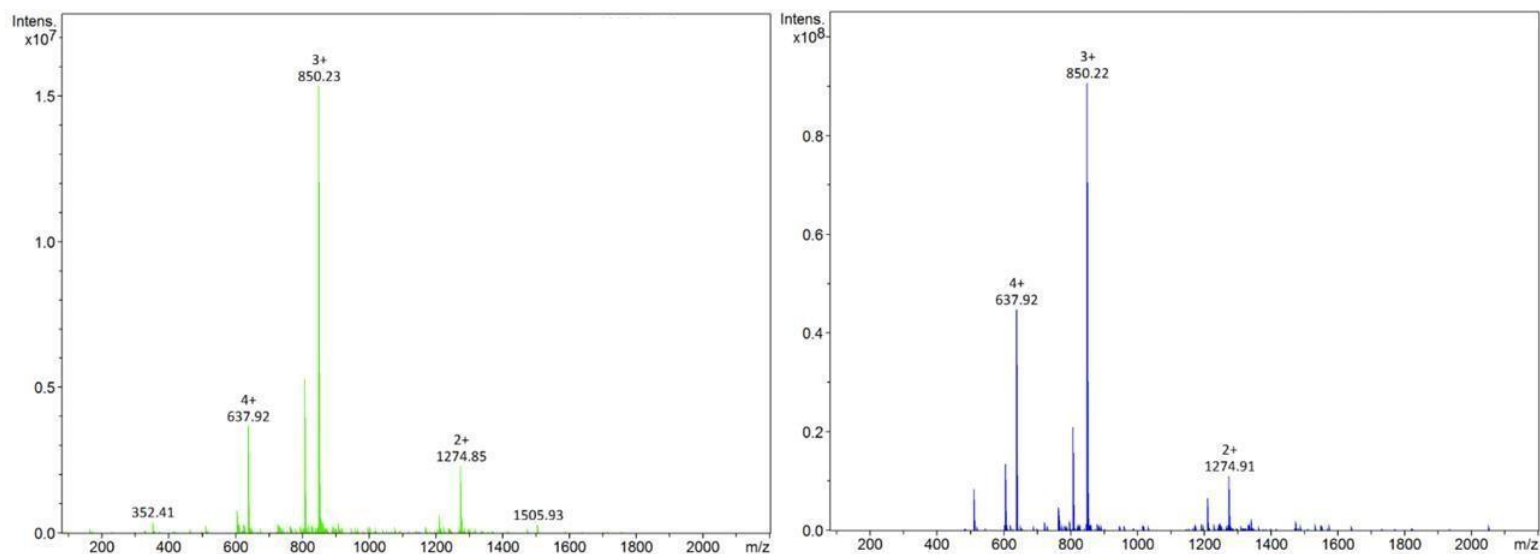
Fonte: Autor

Figura 8 - Espectro de massas peptídeo CRBR04 bruto e puro



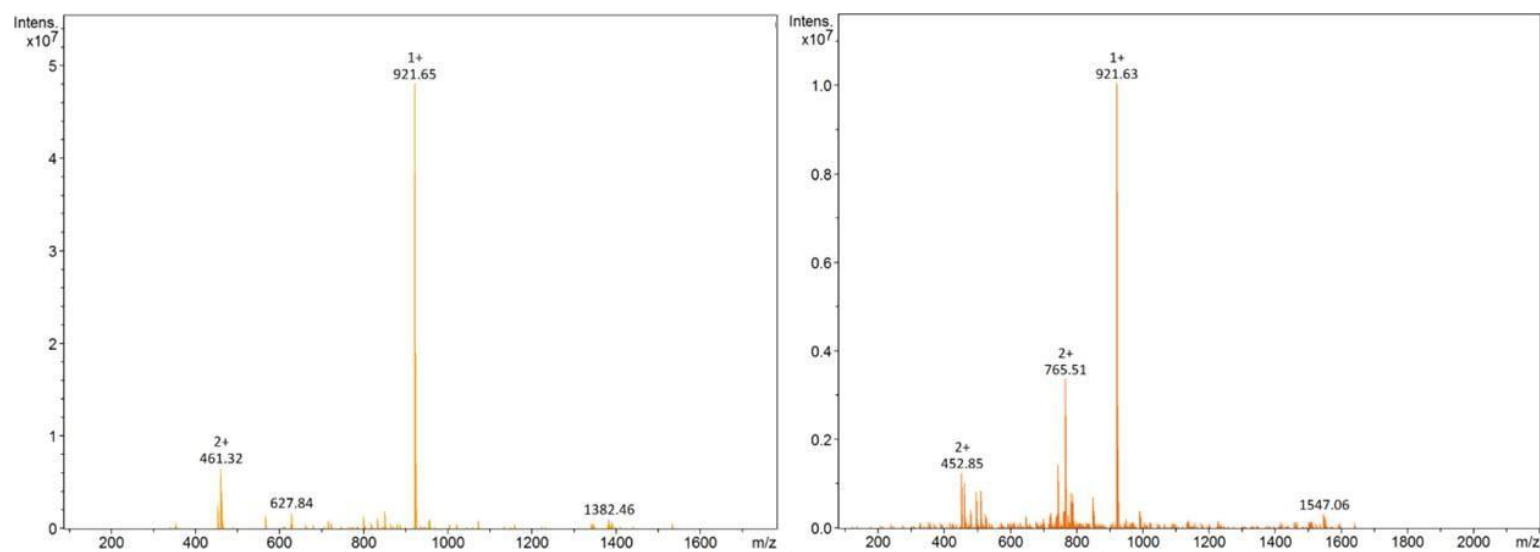
Fonte: Autor

Figura 9 - Espectroscopia de massas peptídeo his-CRBR04 bruto e puro



Fonte: Autor

Figura 10 - Espectroscopia de massas peptídeo VC7 bruto e puro



Fonte: Autor

Figura 11 - Espectroscopia de massas peptídeo VC8 bruto e puro

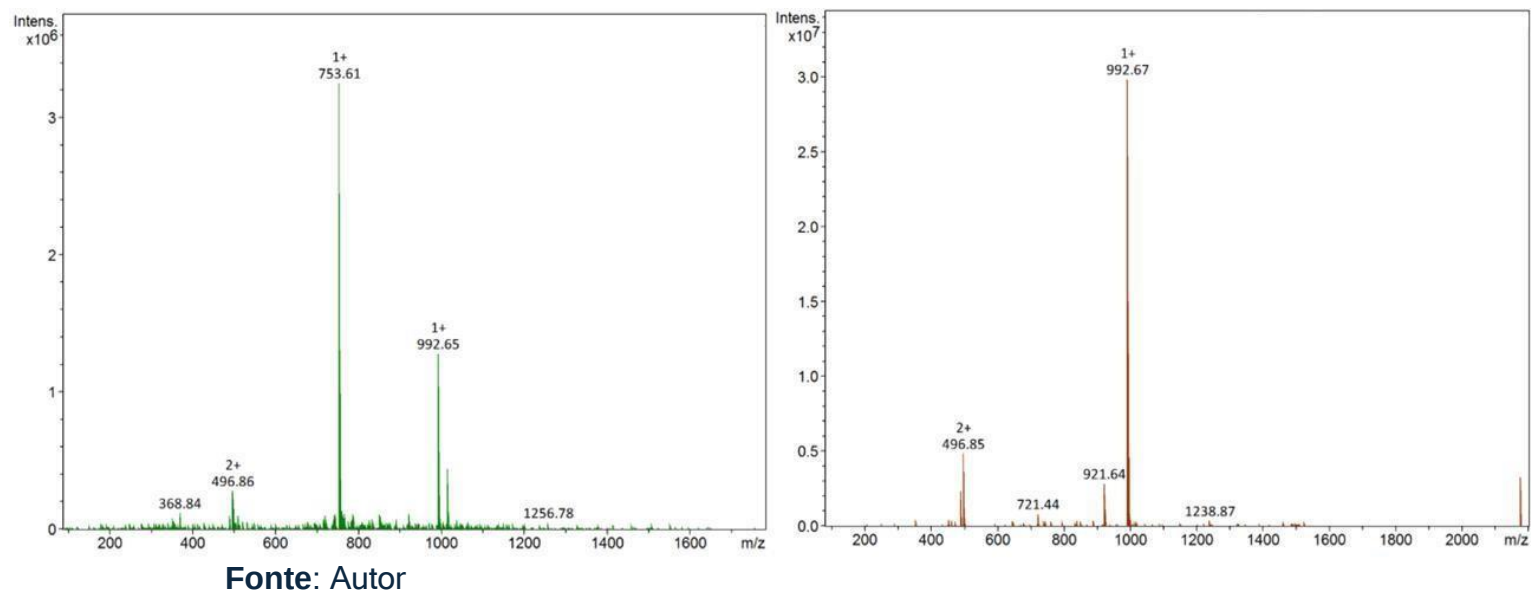
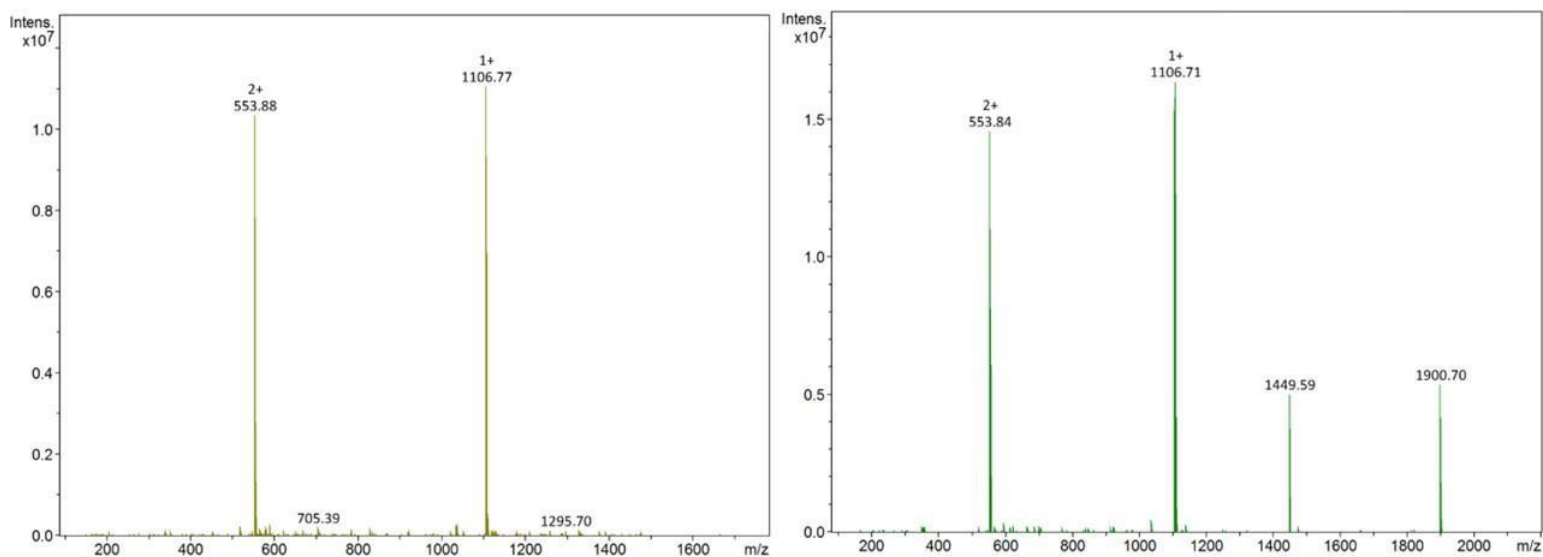
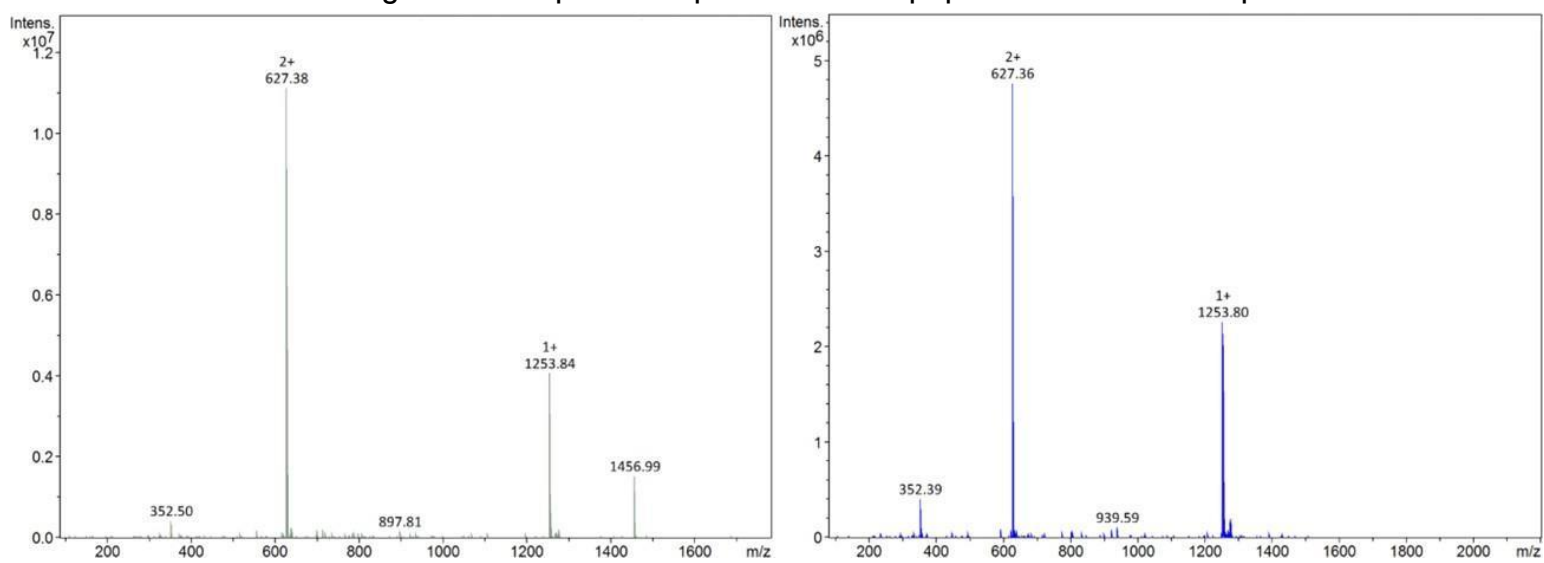


Figura 12 Espectroscopia de massas peptídeo VC9 bruto e puro



Fonte: Autor

Figura 13 - Espectroscopia de massas peptídeo VC10 bruto e puro



Fonte: Autor

Tabela 4 - Relação massa/carga teórica e experimental obtidas após a síntese dos peptídeos

Peptídeo	Carga (z)	Razão m/z teórica	Razão m/z experimental	Massa molecular teórica (g/mol)
CRBR04	+2	1205,45	1206,7	2410,9
	+3	803,63	804,45	
	+4	602,72	603,61	
His-CRBR04	+2	1274,02	1274,91	2548,04
	+3	849,34	850,22	
	+4	637,01	637,92	
VC7	+1	921,1	921,63	921,1
	+2	765,51	1531,02	
	+2	452,85	905,7	
VC8	+1	992,17	992,67	992,17
	+2	496,08	496,85	
VC9	+1	1106,28	1106,71	1106,28
	+2	553,14	553,84	
VC10	+1	1253,45	1253,80	1253,45
	+2	626,72	627,36	

Fonte: Autor

4.2 Ensaios biológicos

4.2.1 Concentração inibitória mínima

No primeiro momento, os peptídeos foram submetidos ao ensaio de contração inibitória mínima frente a cepa padrão do MTB H₃₇Rv (ATCC 27294), sendo considerado o CIM₉₀ do composto como a menor concentração capaz de inibir pelo menos 90% do crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados desse ensaio podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados ensaio de concentração inibitória mínima H37Rv

Composto	CIM ₉₀ (µg/ml)
CRBR04	>100
His-CRBR04	>100
VC07	90 ± 7,2
VC08	>100
VC09	>100
VC10	>100

Fonte: autor

Apesar da literatura afirmar a ação do peptídeo CRBR04 frente a cepas sensíveis aos medicamentos da terapia de MTB, os ensaios realizados no nosso laboratório não demonstraram essa atividade frente a esses microrganismos. Tal perda de atividade do peptídeo pode estar correlacionada com o tipo de resina utilizada durante a síntese que causam algumas alterações estruturais na molécula devido a alterações na carga líquida da molécula. Na síntese original do peptídeo CRBR04 foi utilizada uma resina no tipo Rink-amida, a qual deixa nas extremidades dessa molécula os grupamentos acetil (CH₃) e amida (CONH₂), enquanto a resina wang amina (NH₂) e carboxila (COOH). Essas modificações na estrutura do peptídeo podem ter reduzido sua interação do peptídeo com a membrana bacteriana, impedindo sua atividade antimicrobiana.

Da série de fragmentos do peptídeo CRBR04 desenhados a partir da indicação dos ensaios *in silico*, apenas o peptídeo VC07 demonstrou atividade anti-MTB. Como a diferença entre os peptídeos VC se trata de somente a adição de um aminoácido da sequência do peptídeo original, podemos afirmar que a adição de aminoácidos na porção C-terminal da molécula inibiu a atividade antimicrobiana do peptídeo. Apesar de ser possível observar esse fato, ainda são necessários ensaios que aprofundem o entendimento do mecanismo de

ação dessas moléculas para que seja possível a elaboração de teorias que justifiquem essa perda de atividade.

Pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis* podem apresentar coinfeções com outros microrganismos patogênicos, incluindo bactérias e fungos oportunistas. Esse fenômeno está frequentemente associado à imunossupressão causada pela tuberculose, bem como a alterações na estrutura pulmonar, como bronquiectasias, cicatrizes fibrosas e fibrose pulmonar, as quais comprometem a funcionalidade desse órgão. A presença de coinfeções bacterianas em indivíduos com tuberculose está correlacionada a um aumento na ocorrência de complicações clínicas, podendo agravar o prognóstico desses pacientes.⁴⁴

De forma a avaliar a atividade desses peptídeos frente a diferentes grupos bacterianos, foram selecionadas representantes de bactérias de interesse clínico: *E. coli* e *S. aureus*, representando bactérias gram negativas e gram positivas, respectivamente. No entanto, o ensaio demonstrou a ausência de atividade desses peptídeos frente aos representantes desse grupo, como é possível observar na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados ensaio concentração inibitória mínima *E.coli* e *S. aureus*

Composto	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
CRBR04	>25	>25
His-CRBR04	>25	>25
VC07	>25	>25
VC08	>25	>25
VC09	>25	>25
VC10	>25	>25

Fonte: Autor

Infecções fúngicas também representam riscos quando coinfectam pacientes com tuberculose. Espécies do gênero *Candida* são fungos que estão presentes na microbiota, possuindo em 90% dos casos uma relação comensal com o organismo humano. No entanto desbalanços imunológicos podem levar a doenças. Dessa forma, compostos que consigam eliminar esses patógenos

demonstram-se necessários para a terapia.⁴⁵ O peptídeo CRBR04 e VC7 demonstraram atividade frente a espécies de *Candida albicans* como é possível observar na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados ensaio concentração inibitório mínima *Candida albicans*

Composto	CIM ₉₀ (µg/ml)		
	ATCC 90028	ATCC 18804	ATCC 10231
CRBR04	143,58 ± 6,54	153,38 ± 2,01	152,184 ± 2,72
VC7	37,80 ± 0,19	102,05 ± 35,82	138,69 ± 17,07
VC8	>160	>160	>160
VC9	>160	>160	>160
VC10	>160	>160	>160

Fonte: autor

Os peptídeos foram testados frente a três diferentes cepas de *Candida albicans*, a ATCC 90028, 18804 e 10231 representado uma cepa padrão, uma cepa sensível com maior perfil de virulência e uma cepa resistente a alguns fármacos utilizados na terapia (anidulafungila e azóis), respectivamente. A partir desses resultados é possível observar que novamente os únicos fármacos que apresentaram atividade foram o CRBR04 e o VC7, porém com diferenças significativas nas suas atividades.

Outros peptídeos previamente estudados apresentaram desempenho similar em comparação às moléculas avaliadas neste trabalho, como é o caso da Histatina-5, um peptídeo endógeno presente na saliva humana com reconhecida atividade antifúngica. Quando submetido aos mesmos testes frente às cepas de *Candida albicans* utilizadas neste estudo, a Histatina-5 apresentou valores de CIM₉₀ na ordem de 128 µg/ml para as cepas ATCC 90028 e 18804, e de 256 µg/ml para a cepa resistente.⁴⁶

O peptídeo CRBR04 manteve uma atividade constante frente as cepas fúngicas testadas. Essa manutenção da atividade sugere que o mecanismo de ação desse peptídeo não sofre a influência dos mecanismos de resistência e virulência das cepas ATCC 18804 e 10231, podendo estar

correlacionado com a indução de danos à membrana. Enquanto o peptídeo VC7, demonstrou variações na sua atividade, apresentou maiores CIM₉₀ quando desafiado frente a cepas mais virulentas e resistentes, indicando um mecanismo de ação diferente do peptídeo CRBR04. Essa variação na atividade pode estar relacionada à possível internalização do peptídeo, a qual o torna suscetível a mecanismos de resistência fúngica, como as bombas de efluxo, que podem expulsá-lo do interior celular, resultando na redução de sua atividade.

A perda completa da atividade dos fragmentos do peptídeo ocorreu a partir da adição da alanina na extremidade C-terminal do peptídeo VC7. Tal perda de atividade pode ser causada devido a cadeia lateral hidrofóbica do resíduo de alanina as quais podem ter interferido na internalização do peptídeo ou prejudicado a interação com o alvo dessa molécula.

4.2.2 Biofilme

Os ensaios destinados à avaliação da inibição de biofilmes podem ser conduzidos em três etapas distintas: pré-formado, pré-maduro e maduro, permitindo observar a evolução do biofilme e a forma como os compostos interagem com diferentes estágios de desenvolvimento. No ensaio de pré-formação, as células planctônicas passam inicialmente por um período de adesão ao fundo da placa, seguido pela formação de colônias e pela transição das formas leveduriformes de *Candida albicans* para sua forma filamentosa, estabelecendo uma monocamada no fundo do poço.⁴⁷ Dessa forma, o modelo permite avaliar a capacidade do composto em impedir a formação inicial do biofilme.

Conforme observado na tabela 8, apenas o peptídeo CRBR04 foi capaz de impedir a formação dessa estrutura, enquanto o peptídeo VC7 não demonstrou a mesma eficácia. A perda de atividade do VC7 pode ser explicada pelo aumento da densidade celular adicionada por poço, bem como pela maior disponibilidade de carboidratos no meio de cultura, que possivelmente promoveu alterações metabólicas nos fungos, comprometendo a atividade do composto.⁹

O ensaio de biofilme pré-maduro envolve uma pré-incubação da placa por 24 horas, permitindo que o biofilme se estabeleça parcialmente, sem adesão completa ao fundo do poço. Nessa etapa, o biofilme passa a apresentar uma estrutura tridimensional composta por uma mistura de células leveduriformes, hifas e pseudohifas. Além disso, inicia-se a formação de uma matriz polissacarídica, frequentemente associada ao perfil de resistência dos biofilmes aos fármacos utilizados na terapia. Conforme observado na Tabela 8, ambos os peptídeos testados demonstraram incapacidade de eliminar o biofilme pré-maduro. Esse resultado pode ser explicado pela presença da matriz extracelular, que possivelmente dificultou a interação dos peptídeos com a membrana plasmática das células, impedindo, assim, a manifestação de sua atividade antimicrobiana.⁴⁷⁻⁴⁹

A última etapa desta sequência consistiria na avaliação da atividade dos compostos frente a um biofilme maduro, previamente incubado por 48 horas, estágio no qual a matriz extracelular se encontra em maior quantidade. No entanto, como foi observada falha no tratamento durante o estágio de pré-maduro, este ensaio não foi realizado.⁴⁷

Tabela 8 - Resultados perfil de inibição da formação de biofilmes de *Candida albicans*

Peptídeo	Inibição Biofilme (µg/ml)	
	Pré formação	Pré-maduro
CRBR04	310,7 ± 1.1	≥ 320
VC7	≥ 320	≥ 320
DMSO	≥ 320	≥ 320

Fonte: Autor

4.2.3 Ensaios celulares

Com o objetivo de avaliar a segurança dos peptídeos desenvolvidos, foram realizados ensaios de citotoxicidade frente a linhagens celulares. Para tal, determinou-se o valor da concentração inibitória média (IC₅₀), definido como a menor concentração do composto capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%.

Os valores obtidos de IC_{50} estão representados na Tabela 9, e permitem inferir a janela terapêutica dos peptídeos testados frente aos modelos celulares selecionados.

Tabela 9 - Resultado ensaio de citotoxicidade frente a Caco-2

Peptídeo	IC ₅₀ (µg/ml)
	Caco-2
CRBR04	52,22 ± 10,43
VC7	180,10 ± 23,40
VC8	>250
VC9	>250
VC10	>250

Fonte: Autor

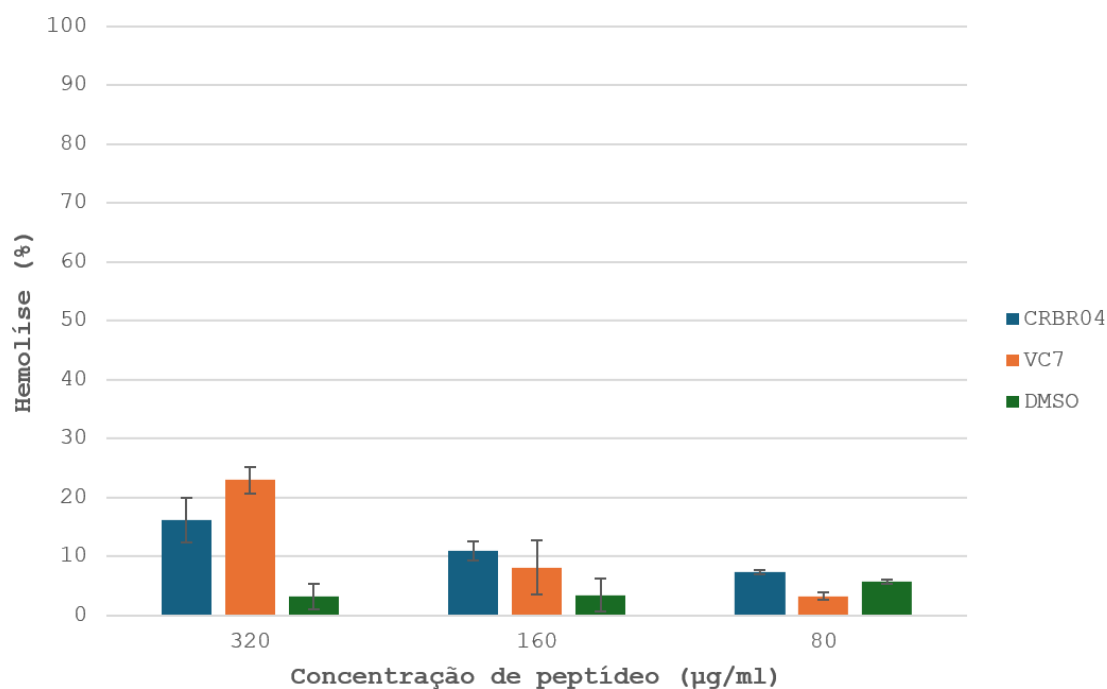
Os resultados obtidos frente à linhagem Caco-2 indicam que o peptídeo CRBR04 demonstrou elevada citotoxicidade frente às células Caco-2, com valores reduzidos de IC_{50} , evidenciando que concentrações muito baixas já são suficientes para comprometer a viabilidade celular. Enquanto o peptídeo VC7, apresenta uma menor citotoxicidade frente a esses tipos celulares, porém os resultados obtidos dessa molécula também não demonstram uma margem de segurança adequada. Tal comportamento indica um perfil de segurança limitado para aplicações que envolvam esse tipo celular para ambos os compostos.

4.2.4 Hemolítico

O ensaio de hemólise foi conduzido em colaboração com o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de peptídeos, seguindo o protocolo CEEA nº 61293316.4.0000.5426.

A atividade hemolítica é definida pela maior concentração do composto capaz de lisar pelo menos 50% das hemácias presentes na amostra. Dessa forma, é possível afirmar que nas concentrações testadas nenhum dos peptídeos que apresentaram atividades antimicrobianas demonstraram-se hemolíticos, como é possível observar na figura 14.

Figura 14 - Ensaio hemolítico



Fonte: Autor

Estudos relatam uma relação entre a estrutura primária de proteínas e a atividade hemolítica, indicando que moléculas ricas em resíduos de cisteína, fenilalanina, glicina e serina apresentam maior potencial de lise celular. Em contrapartida, moléculas que possuem resíduos de triptofano, lisina, metionina e asparagina demonstram menor propensão a induzir hemólise, sendo consideradas como peptídeos de baixo potencial hemolítico.⁵⁰

Embora o peptídeo CRBR04 apresente uma maior proporção de aminoácidos associados à atividade hemolítica, na concentração de 320 µg/ml ele demonstrou um menor potencial de lise ($16,18 \pm 3,78\%$) quando comparado ao peptídeo VC7 ($22,95 \pm 3,2\%$). Esse comportamento pode ser atribuído à maior hidrofobicidade do peptídeo VC7, a qual favorece interações apolares com as membranas das hemácias, que possuem elevada concentração de fosfatidilcolina, característica que as torna mais neutras em comparação às membranas bacterianas ou fúngicas. Dessa forma, a afinidade aumentada destes compostos justifica o maior rompimento dessas células.⁵⁰⁻⁵³

5 CONCLUSÃO

Dos peptídeos planejados, foram obtidos o peptídeo padrão (CRBR04), um dos seus análogos (HCRBR04) e quatro fragmentos do peptídeo padrão, os quais foram escolhidos a partir de técnicas de *machine learning* (VC07, VC08, VC09, VC10). Porém, a purificação desses peptídeos foi comprometida devido a grande apolaridade dessas amostras. Apesar dos picos mais proeminentes nos ensaios de espectrometria de massas pertencerem aos peptídeos desejados, foram encontrados sinais em menores que indicavam a presença de contaminantes em baixas concentrações.

O peptídeo CRBR04, apresentou uma perda total de sua atividade quando sintetizado em resina Wang sugerindo que as cargas das suas extremidades C-terminal e N-Terminal comprometeram a sua atividade antimicrobiana. Esses resultados indicam que as extremidades constituídas por uma amida (N-terminal) e um grupamento acetila (C-terminal) possuem um papel importante na estrutura desses peptídeos para sua atividade frente ao MTB. Curiosamente, apesar dessa ausência de atividade anti-MTB, esse peptídeo demonstrou atividade frente a *Candida albicans*.

A maioria dos fragmentos do peptídeo CRBR04 que foram desenhados com base em predições computacionais para apresentar atividade anti-MTB mostraram-se inativas frente a bactérias, fungos e células humanas. Exceto o peptídeo VC7, o qual apresentou uma baixa atividade frente ao MTB e uma atividade intermediária frente à *Candida albicans*, tanto da cepa padrão, quanto para isolados clínicos e cepas resistentes ao tratamento convencional. A modificação da estrutura do peptídeo VC7 através da adição de uma alanina na porção C-terminal da molécula resultou na perda total de atividade, indicando que esse aminoácido interferiu negativamente na interação do peptídeo com seu alvo molecular ou impediu sua internalização nas células alvo, sejam bactérias ou fungos.

A comparação entre os peptídeos CRBR04 e VC7 revelou diferenças marcantes em suas atividades antifúngicas, bem como no comportamento frente a diferentes cepas de *Candida albicans*, incluindo isolados clínicos com distintos perfis de resistência e biofilmes formados por cepas resistentes. Esses dados

sugerem que os dois peptídeos podem atuar por mecanismos de ação distintos, os quais ainda não estão elucidados e requerem estudos adicionais para melhor compreensão.

A avaliação do perfil de toxicidade frente a células Caco-2 demonstrou a baixa toxicidade seletiva de ambos os compostos em relação às cepas fúngicas, indicando uma possível limitação para seu emprego terapêutico em razão aos danos celulares observados. Por outro lado, quando avaliados quanto ao potencial hemolítico, ambos os peptídeos apresentaram baixa capacidade de lise de eritrócitos humanos, em concentrações de até 320 µg/mL, sugerindo uma atividade hemolítica reduzida. Dessa forma, destaca-se a necessidade de ensaios complementares envolvendo outras linhagens celulares, a fim de ampliar a compreensão dos mecanismos de ação e da toxicidade desses compostos.

REFERÊNCIAS

1. ROKAS, Antonis. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nature Microbiology*. **Nature Research**, 2022. DOI: 10.1038/s41564-022-01112-0.
2. KÖHLER, Julia R.; HUBE, Bernhard; PUCCIA, Rosana; CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016.
3. THAMBUGALA, Kasun M.; DARANAGAMA, Dinushani A.; TENNAKOON, Danushka S.; JAYATUNGA, Dona Pamoda W.; HONGSANAN, Sinang; XIE, Ning. Humans vs. Fungi: An Overview of Fungal Pathogens against Humans. **Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13050426.
4. DENNING, David W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428-e438, 2024. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8. Disponível em:
5. KIM, Joon; SUDBERY, Peter. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, 2011. DOI: 10.1007/s12275-011-1064-7.
6. KHOSRAVI, A. R.; MANSOURI, P.; SAFFARIAN, Z.; VAHEDI, G.; NIKAEIN, D. Chronic mucocutaneous candidiasis, a case study and literature review. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, p. 206-210, 2018. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.02.004.
7. RAMÍREZ-SOTELO, Uriel; GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela; MORA-MONTES, Héctor M. Signaling Pathways Regulating Dimorphism in Medically Relevant Fungal Species. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 14, 2025. DOI: 10.3390/pathogens14040350.
8. MOLERO, Gloria; DíEZ-OREJAS, Rosalía; NAVARRO-GARCÍA, Federico; MONTEOLIVA, Lucía; PLA, Jesús; GIL, Concha; SÁNCHEZ-PÉREZ, Miguel; NOMBELA, César. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **INTERNATL MICROBIOL**, v. 1, p. 95-106, 1998.
9. VALENTINE, Marisa; WILSON, Duncan; GRESNIGT, Mark S.; HUBE, Bernhard. Vaginal *Candida albicans* infections: host-pathogen-microbiome interactions. **FEMS Microbiology Reviews**. Oxford University Press, , 2025. DOI: 10.1093/femsre/fuaf013.

10. PAPPAS, Peter G.; LIONAKIS, Michail S.; ARENDRUP, Maiken Cavling; OSTROSKY-ZEICHNER, Luis; KULLBERG, Bart Jan. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.26.
11. RANDELOVIĆ, Marina; IGNJATOVIĆ, Aleksandra; ĐORĐEVIĆ, Milica; GOLUBOVIĆ, Maša; STALEVIĆ, Marko; RANČIĆ, Nataša; OTAŠEVIĆ, Suzana. Superficial Candidiasis: Cluster Analysis of Species Distribution and Their Antifungal Susceptibility In Vitro. **Journal of Fungi**, v. 11, 2025. DOI: 10.3390/jof11050338.
12. CHAHINE, Adam; FAROOQI, Sarah; MARZVANYAN, Anna; MICHAEL, Mary; CHAVEZ-FRAZIER, Arianne; GUZMAN, Nilmarie. Mucocutaneous Candida Infections in Immunocompromised Patients. **Current Dermatology Reports**. Springer, , 2022. DOI: 10.1007/s13671-022-00356-7.
13. LASS-FLÖRL, Cornelia; KANJ, Souha S.; GOVENDER, Nelesh P.; THOMPSON, George R.; OSTROSKY- ZEICHNER, Luis; GOVRINS, Miriam Alisa. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, 2024. DOI: 10.1038/s41572-024-00503-3.
14. EPARAMBATH, Sarika et al. Candida albicans—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. **Medical Mycology**, v. 62, 2024. DOI: 10.1093/mmy/myae045.
15. JING, Danrui; LIANG, Guanzhao; LI, Xiaofang; LIU, Weida. Progress in molecular diagnosis and treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. **Frontiers in Immunology, Frontiers Media SA**, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1343138.
16. KHOSRAVI, A. R.; MANSOURI, P.; SAFFARIAN, Z.; VAHEDI, G.; NIKAEIN, D. Chronic mucocutaneous candidiasis, a case study and literature review. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, p. 206-210, 2018. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.02.004.
17. LOPES, José Pedro; LIONAKIS, Michail S. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. **Virulence. Taylor and Francis Ltd.**, , 2022. DOI: 10.1080/21505594.2021.2019950.
18. TALAPKO, Jasminka; JUZBAŠIĆ, Martina; MATIJEVIĆ, Tatjana; PUSTIJANAC, Emina; BEKIĆ, Sanja; KOTRIS, Ivan; ŠKRLEC, Ivana. Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 1-19, 2021. DOI: 10.3390/jof7020079.

19. FENG, Yanru; LU, Hui; WHITEWAY, Malcolm; JIANG, Yuanying. Understanding fluconazole tolerance in *Candida albicans*: implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive fungal infections. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **Elsevier Ltd**, 2023. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.10.019.
20. MORACA, Francesca et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity correlation study of a series of imidazol-based compounds as *Candida albicans* inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 665-673, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.07.001.
21. MAERTENS, Johan A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1-10, 2004. DOI: 10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x.
22. Organização Mundial Da Saúde (OMS). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **Genebra: OMS**, 2022.
23. COSIO, Terenzio et al. Biological Features, Antimicrobial Susceptibility and Phenotypic Characterization of *Candidozyma auris* CDC B11903 Grown at Different Temperatures. **Journal of Fungi**, v. 11, 2025. DOI: 10.3390/jof11090625.
24. VELAYATI, Ali Akbar; FARNIA, Parissa. Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli. **BoD-Books on Demand**, 2012.
25. VILCHÈZE, Catherine; KREMER, Laurent. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis* : The Koch Paradox . **Microbiology Spectrum**, v. 5, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.tb2-0003-2015.
26. TAKAYAMA, Kuni; WANG, Cindy; BESRA, Gurdval S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.1.81-101.2005.
27. CAMBIER, C. J.; FALKOW, Stanley; RAMAKRISHNAN, Lalita. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell. Cell Press**, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.024.
28. WEI, Xiujian; YUE, Lingfeng; ZHAO, Bing; JIANG, Nan; LEI, Hongrui; ZHAI, Xin. Recent advances and challenges of revolutionizing drug-resistant tuberculosis treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 277, p.

- 116785, 2024. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2024.116785.
29. SINGH, Vinayak. Tuberculosis treatment-shortening. *Drug Discovery Today*. **Elsevier Ltd**, 2024. DOI: 10.1016/j.drudis.2024.103955.
30. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis report 2024. **Geneva: World Health Organization**; 2024. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>. Acesso em: 1 Set. 2025
31. YANG, Bin et al. A review on the screening methods for the discovery of natural antimicrobial peptides. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 15, n. 1, p. 101046, 2025. DOI: 10.1016/J.JPHA.2024.101046. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177924001436>. Acesso em: 16 set. 2025.
32. CRESTI, Laura; CAPPELLO, Giovanni; PINI, Alessandro. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application—A Long History to Be Concluded. *International Journal of Molecular Sciences*. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2024. DOI: 10.3390/ijms25094870.
33. E. GREBER, Katarzyna; DAWGUL, Małgorzata. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 17, n. 5, p. 620-628, 2017. DOI: 10.2174/15680266166666160713143331.
34. JI, Shuaiqi; AN, Feiyu; ZHANG, Taowei; LOU, Mengxue; GUO, Jiawei; LIU, Kexin; ZHU, Yi; WU, Junrui; WU, Rina. Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **Elsevier Masson s.r.l.**, 2024. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.116072.
35. ZHOU, Xiaowei et al. Enhanced Antimicrobial Activity of N-Terminal Derivatives of a Novel Brevinin-1 Peptide from The Skin Secretion of *Odorrana schmackeri*. *Toxins*, v. 12, n. 8, 2020. DOI: 10.3390/TOXINS12080484. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32751489/>. Acesso em: 20 set. 2025.
36. ABRAHAM, Parvin; JOSE, Leny; MALIEKAL, Tessy Thomas; KUMAR, R. Ajay; KUMAR, K. Santhosh. B1CTcu5: A frog-derived brevinin-1 peptide with anti-tuberculosis activity. *Peptides*, v. 132, 2020. DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2020.170373.
37. SIWACH, Ankit; VERMA, Prabhakar Kumar. Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds. *BMC Chemistry*. **BioMed**

Central Ltd, 2021. DOI: 10.1186/s13065-020-00730-1.

38. NARASIMHAN, Balasubramanian; SHARMA, Deepika; KUMAR, Pradeep; YOGESHWARI, Perumal; SRIRAM, Dharmarajan. Synthesis, antimicrobial and antimycobacterial evaluation of [2-(substituted phenyl)-imidazol-1-yl]-pyridin-3-yl-methanones. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 720-727, 2011. DOI: 10.3109/14756366.2010.548331.
39. USMANI, Salman Sadullah; BHALLA, Sherry; RAGHAVA, Gajendra P. S. Prediction of antitubercular peptides from sequence information using ensemble classifier and hybrid features. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 381377, 2018. DOI: 10.3389/FPHAR.2018.00954/BIBTEX.
40. USMANI, Salman Sadullah; KUMAR, Rajesh; KUMAR, Vinod; SINGH, Sandeep; RAGHAVA, Gajendra P. S. AntiTbPdb: A knowledgebase of anti-tubercular peptides. **Database**, v. 2018, 2018. DOI: 10.1093/database/bay025.
41. MERRIFIELD, Robert B. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85.14 (1963): 2149-2154. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00897a025>.
42. PALOMINO, Juan Carlos; MARTIN, Anandi; CAMACHO, Mirtha; GUERRA, Humberto; SWINGS, Jean; PORTAELS, Françoise. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002.
43. ODDO, Alberto; HANSEN, Paul R. Hemolytic activity of antimicrobial peptides. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc., 2017. v. 1548p. 427-435. DOI: 10.1007/978-1-4939-6737-7_31.
44. BIR, Raunak et al. Prevalence of Co-infection of Culture-Proven Bacterial Pathogens in Microbiologically Confirmed Pulmonary Tuberculosis Patients From a Tertiary Care Center. **Cureus**, 2024. DOI: 10.7759/cureus.66482.
45. SILVA, Danielle L.; PERES, Nalu T. A.; SANTOS, Daniel A. Key fungal coinfections: epidemiology, mechanisms of pathogenesis, and beyond. **mBio. American Society for Microbiology**, 2025. DOI: 10.1128/mbio.00562-25.
46. ZAMBOM, Carolina R. et al. Reducing Functional Domain of Histatin 5

Improves Antifungal Activity and Prevents Proteolytic Degradation. **Microorganisms**, v. 13, 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13051091.

47. GORDON RAMAGE; KACY VANDEWALLE; BRIAN L. WICKES; JOSÉ L. LÓPEZ-RIBOT. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 18, p. 163-170, 2001.

48. ZARNOWSKI, Robert et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biology**, v. 16, 2018. DOI: 10.1371/journal.pbio.2006872.

49. MATHÉ, Lotte; VAN DIJCK, Patrick. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, p. 251-264, 2013. DOI: 10.1007/s00294-013-0400-3.

50. RATHORE, Anand Singh; KUMAR, Nishant; CHOUDHURY, Shubham; MEHTA, Naman Kumar; RAGHAVA, Gajendra P.S. Prediction of hemolytic peptides and their hemolytic concentration. **Communications Biology**, v. 8, 2025. DOI: 10.1038/s42003-025-07615-w.

51. GONG, Yi; XUE, Qunhang; LI, Jun; ZHANG, Shicui. Antifungal peptides from living organisms. *Frontiers in Microbiology*. **Frontiers Media SA**, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1511461.

52. MEHTA, Kanchan; SHARMA, Prince; MUJAWAR, Shama; VYAS, Ashish. Role of Antimicrobial Peptides in Treatment and Prevention of *Mycobacterium Tuberculosis*: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **Springer Science and Business Media B.V.**, 2022. DOI: 10.1007/s10989-022-10435-9.

53. UL HAQ, Ihtisham; MARYAM, Sajida; SHYNTUM, Divine Y.; KHAN, Taj A.; LI, Fan. Exploring the frontiers of therapeutic breadth of antifungal peptides: A new avenue in antifungal drugs. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **Oxford University Press**, 2024. DOI: 10.1093/jimb/kuae018.