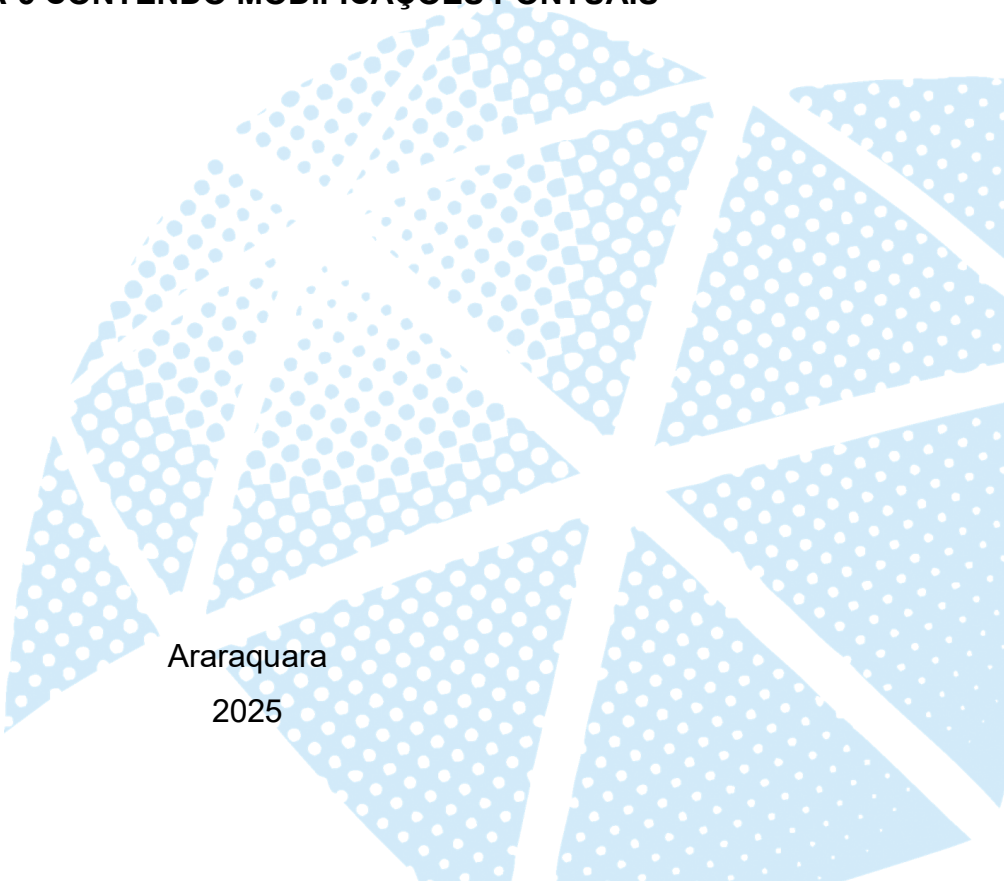


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

LUISA TORRES NEGREIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 CONTENDO MODIFICAÇÕES PONTUAIS**

Araraquara
2025



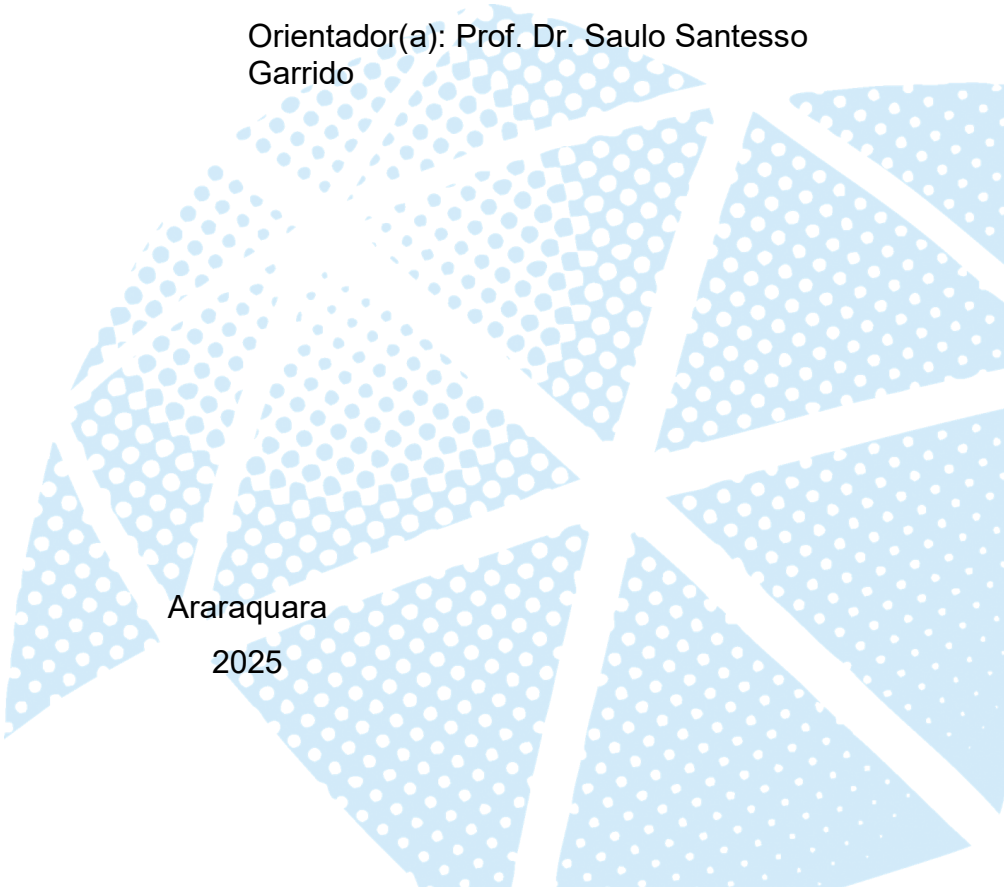
LUISA TORRES NEGREIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 CONTENDO MODIFICAÇÕES PONTUAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharel(a) em Química.

Orientador(a): Prof. Dr. Saulo Santesso
Garrido

Araraquara
2025



N385a

Negreiros, Luisa Torres

Avaliação do efeito antifúngico de peptídeos derivados da
Histatina-5 contendo modificações pontuais / Luisa Torres Negreiros.

-- Araraquara, 2025

36 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química,
Araraquara

Orientador: Saulo Santesso Garrido

1. candidíse bucal. 2. histatina-5. 3. antifúngicos. I. Título.

LUISA TORRES NEGREIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 CONTENDO MODIFICAÇÕES PONTUAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP) Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharela em Química.

Data da defesa: 02/12/2025

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
SAULO SANTESSO GARRIDO
Data: 16/12/2025 20:09:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Prof. Dr. Fernanda Zanolli Freitas

Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Dedico este trabalho à Lily.

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado, pela parceria e apoio. Com você, o eterno retorno é uma dádiva.

À minha família, que foi meu sustentáculo durante meu percurso acadêmico e sempre me ouviram falar sobre Química mesmo sem entender.

Em especial ao meu irmão, que sempre incentivou meu lado cientista desde que éramos crianças.

Aos meus amigos, por todo companheirismo, todas as risadas e choros. Obrigada por terem trilhado este caminho comigo. Principalmente à Julia, Lucas e Thays, que se tornaram parte da minha família.

À doutoranda Gabriela Vieira Silva Zolin, por toda disponibilidade e orientações pertinentes que me guiaram por toda a pesquisa.

Aos integrantes da Unidade de Síntese, Estrutura e Aplicação de Peptídeos e Proteínas (USEAPP) por todo o suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2022/07949-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 13849).

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

“Quando o medo chega, algo está para acontecer.”

(Leigh Bardugo, 2016, p. 226)

RESUMO

A candidíase oral é uma das infecções fúngicas mais comuns na cavidade oral, afetando principalmente pacientes que têm o sistema imunológico suprimido por doenças como HIV e câncer. A candidíase é causada por espécies do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*, que se apresenta como um fungo polimórfico comensal que pode ser encontrado naturalmente na microbiota de boa parte da população mundial e vem desenvolvendo uma resistência ao longo das últimas décadas aos medicamentos antifúngicos utilizados em seu combate. A Histatina-5 é um peptídeo antimicrobiano encontrado naturalmente na saliva humana, apresenta forte atividade antifúngica contra células de *C. albicans*, o que a torna um potencial agente para terapia antifúngica de grande interesse. Sua atividade, entretanto, pode ser prejudicada por interações com moléculas presentes na cavidade oral e alguns mecanismos de resistência à sua ação já foram observados nas células de *C. albicans*. A troca de resíduos de aminoácidos básicos na sequência da Hst5 já provou ser capaz de otimizar a atividade antimicrobiana do peptídeo frente à *C. albicans*, sendo possível que essa otimização se estenda à fragmentos. Este trabalho avalia o efeito de modificações pontuais de resíduos de aminoácidos de peptídeos derivados da Histatina-5 na inibição do crescimento. Os peptídeos foram sintetizados pela Síntese de Peptídeos em Fase Sólida e caracterizados e purificados por HPLC MS. Tanto os peptídeos LN8 Hst5 e LN8Hst5 K5,7H quanto a Hst5 inibiram o crescimento de *C. albicans* nas três cepas testadas. A combinação do LN8 Hst5 com o LN8Hst5 K5,7H foi aditiva nas cepas ATCC 90028 e ATCC 10231. Na cepa padrão, os modelos Bliss, Loewe e ZIP indicaram uma interação sinérgica.

Palavras-chave: candidíase bucal; histatina-5; antifúngicos.

ABSTRACT

Oral candidiasis is one of the most common fungal infections in the oral cavity, mainly affecting patients who have a suppressed immune system due to diseases such as HIV and cancer. Candidiasis is caused by species of the genus *Candida*, especially *Candida albicans*, a commensal fungus naturally found in the microbiota of a large part of the world's population, and that has developed resistance over the last few decades to the antifungal drugs used to treat it. Histatin-5 is an antimicrobial peptide found naturally in human saliva. It has strong antifungal activity against *C. albicans* cells, making it a potential agent for antifungal therapy of great interest. Its activity, however, can be impaired by interactions with molecules present in the oral cavity and some mechanisms of resistance to its action have already been observed in *C. albicans* cells. The exchange of basic amino acid residues in the Hst5 sequence has already been shown to optimize the peptide's antimicrobial activity against *C. albicans*, and it is possible that this optimization extends to fragments as well. This work evaluates the effects of specific amino acid modifications in peptides derived from Histatin-5 on growth inhibition. The peptides were synthesized by Solid Phase Peptide Synthesis and characterized and purified by HPLC MS. Both LN8 Hst5 and LN8Hst5 K5,7H peptides and Hst5 inhibited the growth of *C. albicans* in the three strains tested. The combination of LN8 Hst5 with LN8Hst5 K5,7H was additive in strains ATCC 90028 and ATCC 10231. In the standard strain, the Bliss, Loewe, and ZIP models indicated a synergistic interaction.

Keywords: oral candidiasis; histatin-5; antifungal agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismo de ação de antifúngicos tradicionais	12
Figura 2 –	Mecanismos de ação da Histatina-5	14
Figura 3 –	Representação da síntese e clivagem do peptídeo LN8 Hst5	19
Figura 4 –	Esquema de montagem da placa para CIM	21
Figura 5 –	Esquema de montagem da placa para o ensaio de <i>checkerboard</i>	22
Figura 6 –	Perfil cromatográfico do peptídeo LN8 Hst5 purificado	23
Figura 7 –	Perfil cromatográfico do peptídeo LN8 Hst5 K5,7H purificado	24
Figura 8 –	Perfil cromatográfico da Hst5 purificado	24
Figura 9 –	Espectro de massas obtido para os peptídeos (A) LN8 Hst5, (B) LN8Hst5 K5,7H e (C) Hst5, após purificação, indicando a obtenção dos peptídeos puros e confirmando suas massas moleculares	25
Figura 10 –	Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 90028	27
Figura 11 –	Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 18804	27
Figura 12 –	Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 10231	28
Figura 13 –	Matriz dose-resposta de inibição da combinação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H para a cepa 90028	29
Figura 14 –	Matriz dose-resposta de inibição da combinação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H para a cepa 10231	30
Figura 15 –	Mapa de contorno representando os diferentes valores de δ obtidos no ensaio <i>checkerboard</i> avaliado pelo modelo ZIP para a combinação dos peptídeos na cepa ATCC 90028	32
Figura 16 –	Mapa de contorno representando os diferentes valores de δ obtidos no ensaio <i>checkerboard</i> avaliado pelo modelo ZIP para a combinação dos peptídeos na cepa ATCC 10231	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sequência primária do peptídeo Histatina-5 e dos fragmentos a serem sintetizados. A sequência de aminoácidos referente ao domínio funcional da Hst5 está destacada em vermelho	18
Tabela 2 –	Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas para os peptídeos sintetizados	26
Tabela 3 –	Efeito da interação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H determinados pelo índice de concentração inibitória fracionária, contra <i>C. albicans</i>	31
Tabela 4 –	Pontuação média de sinergia calculada para a combinação entre LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H em diferentes modelos	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Desenho racional e síntese dos peptídeos	18
3.2 Síntese e clivagem da Histatina-5 e dos peptídeos derivados	18
3.3 Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos.....	20
3.4 Preparo do inóculo de Candida albicans	20
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	20
3.6 Ensaio checkerboard para avaliação de efeito sinérgico	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos	23
4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.3 Avaliação do efeito sinérgico.....	28
5 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Com o controle da morbidade e mortalidade causados por infecções bacterianas a partir da descoberta da penicilina na primeira metade do século XX, os casos de infecções fúngicas, antes mascarados, se tornaram cada vez mais aparentes, ganhando grande relevância na saúde mundial. O aumento de intervenções médicas como uso de imunossupressores para realização de transplantes, quimioterapia para tratamento de câncer e a grande prevalência de infecções pelo vírus HIV nas últimas décadas estão entre os fatores que contribuíram ainda mais para o aumento da morbidade e mortalidade em casos de infecções fúngicas (Berkow; Lockhart, 2017).

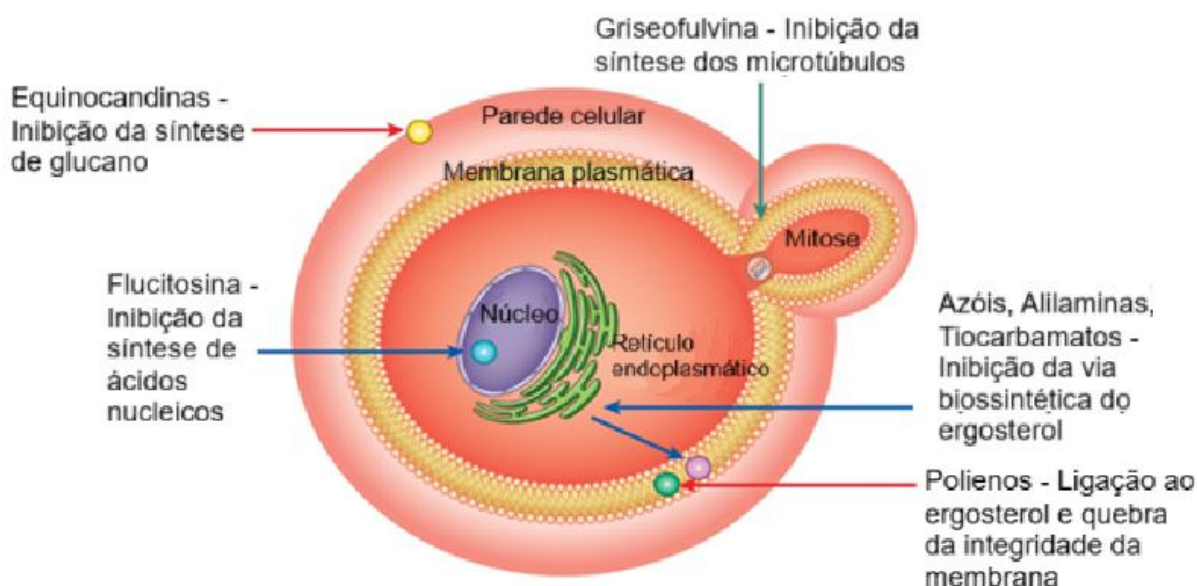
Diante de tal cenário, as espécies fúngicas *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* se tornaram prevalentes em casos de infecção. (Robbins; Wright; Cowen, 2016). Conjuntamente, esses microrganismos são responsáveis pela morte de mais de um milhão de pessoas anualmente, das quais cerca de 75%-80% são causadas especificamente por espécies de *Candida* (Berkow; Lockhart, 2017), sendo a *Candida albicans* a espécie mais comum, responsável por 80% dos casos (Milssop; Fazel, 2016), e, em 2022, foi classificada pela OMS como um dos quatro principais patógenos em um grupo crítico de 19 fungos patogênicos, devido à sua importância na saúde pública (WHO, 2022).

Embora seja um fungo comensal da microbiota humana, encontrado nos tratos oral, intestinal e genital, casos de supressão do sistema imune do hospedeiro podem desencadear a transição morfológica da *C. albicans* entre sua forma de levedura e hifa, sendo a última altamente resistente e invasiva, levando a ocorrência de infecções que podem ser tópicas ou superficiais (candidíase) ou sistêmicas (candidemia) (Robbins; Wright; Cowen, 2016). Quando na forma de hifa, a *C. albicans* ainda é capaz de formar biofilmes, seja em tecidos ou em dispositivos médicos. Os biofilmes são estruturas tridimensionais complexas formadas através de uma matriz extracelular, que agem como uma espécie de revestimento protetor e impermeável, e estão diretamente relacionados com a capacidade do microrganismo de causar infecções, uma vez que o fungo está mais protegido de ataques externos e tem melhores condições de proliferação (Chandra *et al.*, 2001).

Atualmente, o tratamento das infecções é feito com três principais classes de medicamentos: azóis, que inibem a síntese do ergosterol; polienos, que se ligam ao

ergosterol da membrana causando sua ruptura, e as equinocandinas, que inibem a (1,3) β -D-glucano sintase, afetando a síntese de glucano e enfraquecendo a parede celular do fungo. No entanto, nota-se uma crescente resistência aos tratamentos comuns, principalmente em pacientes submetidos a tratamentos prolongados, e uma menor eficácia em cepas resistentes (Lima; Silva; Peixoto, 2025) devido, principalmente, à alta plasticidade genômica do fungo, que possibilita a amplificação ou perda de cromossomos parciais ou inteiros como resposta ao estresse, viabilizando a produção de espécies geneticamente modificadas (Selmecki; Forche; Berman, 2010) e conferindo uma capacidade de evitar os mecanismos de ação de medicamentos que, conseqüentemente, aumenta a resistência antimicrobiana e agrava fortemente a mortalidade e a morbidade da infecção. (Hawser; Douglas, 1995). Dessa forma, a busca por novas moléculas antifúngicas se faz extremamente necessária para o combate desses microrganismos.

Figura 1: Mecanismos de ação de antifúngicos tradicionais



Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, (2018).

Naturalmente, as células epiteliais orais são a primeira linha de defesa contra *C. albicans*, funcionando como uma barreira física. No entanto, o fluxo constante de saliva também atua como um importante mecanismo de depuração mecânica, impedindo a aderência de *Candida* às células epiteliais sendo, portanto, de grande importância para a manutenção do estado comensal de *C. albicans* na boca. Além disso, a saliva é altamente enriquecida em peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial*

peptides - AMPs), que desempenham um papel vital na imunidade inata e na defesa contra a colonização microbiana (Vila *et al.*, 2020).

Histatinas são uma família de peptídeos catiônicos, ricos em histidina e com um vasto espectro de atividade antifúngica, encontrados naturalmente na saliva humana, sendo secretadas pelas glândulas parótidas, sublingual e submandibulares (Sharma *et al.*, 2021). A Histatina-5, fragmento proteolítico da Histatina-3, tem a maior atividade antifúngica contra *C. albicans* (Ikonomova *et al.*, 2019). Sua estrutura flexível composta por 24 aminoácidos permite mudanças em sua conformação. Na cavidade oral, mantém-se linear, porém atinge uma conformação de alfa-hélice quando dentro da membrana celular hidrofóbica da *Candida*. Quase todas suas cargas positivas estão alocadas em uma face, enquanto a outra é apolar, e essa natureza antipática é crucial para sua atividade (Sharma *et al.*, 2021).

Há três formas propostas para a captação da Hst5, as quais podem ocorrer conjuntamente: interação direta com a membrana plasmática, captação mediada pelo transportador e endocitose mediada pelo receptor. Após a entrada do peptídeo na célula fúngica, nota-se a exsudação dos íons potássio intracelular, que acarreta um desequilíbrio e, eventualmente, causa a morte celular. A proteína Trk1 foi identificada como o transportador de íons responsável pela perda de potássio, sendo essencial para a atividade tóxica da Hst5 (Sharma *et al.*, 2021).

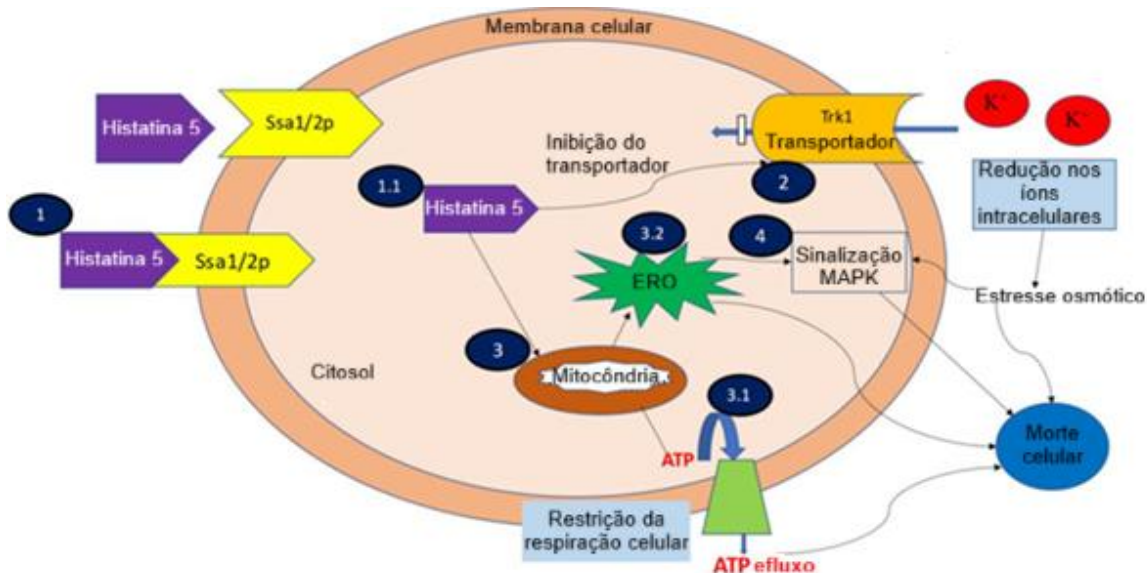
A liberação de ATP intracelular após a incorporação de Hst5 também é considerada uma causa de morte celular em *C. albicans*. Esse ATP liberado media a morte celular ao se ligar aos receptores purinérgicos da membrana celular, P2X. Assim, a redução do ATP intracelular e seu efluxo levam, em última instância, à morte celular fúngica. A mitocôndria é um alvo intracelular amplamente estudado que está envolvido na morte celular. Está documentado que o metabolismo ativo é obrigatório para a morte celular mediada por Hst5 em *C. albicans*. A respiração celular bloqueada por azida de sódio ou outros inibidores mitocondriais clássicos tornou as células resistentes à morte mediada por Hst5. Da mesma forma, as células com déficit energético são consideradas resistentes a esta morte mediada por peptídeos devido às perturbações induzidas na sua bicamada lipídica como consequência da redução de energia. Estudos estabelecem a relação entre a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a morte celular mediada por Hst5. O comprometimento da atividade respiratória leva à produção de EROs e acredita-se que seja a razão para o mecanismo de suicídio celular autoinfligido. Assim, pode-se concluir que a mitocôndria

desempenha um papel significativo na internalização de Hst5, mantendo o potencial de membrana (Sharma *et al.*, 2021).

A via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é estimulada por muitos medicamentos antifúngicos. Os estresses oxidativos e osmóticos induzidos pelo Hst5 são as razões plausíveis para gerar o estresse MAPK Hog1 nas células tratadas com Hst5. Isso fornece a evidência de que a morte celular induzida pelo estresse oxidativo não pode ser negada completamente. As células de *C. albicans* tratadas com Hst5 apresentaram fosforilação de Hog1. Isso induz a produção de glicerol, resultando em estresse osmótico. Essas observações corroboraram o papel pretendido da indução do estresse osmótico como mediador da atividade antifúngica da Hst5. Estudos recentes demonstraram que a integridade da parede celular, MAPK Cek1 e a proteína de ligação Ssa2 também desempenham um papel significativo na ação fungicida da Hst5. Cek1 é responsável por controlar a produção de contrapartes de ligação da Hst5 na parede celular fúngica (Sharma *et al.*, 2021).

A Cek1 fosforilada e a N-acetilglucosamina são as únicas fontes de carbono que tornam as células suscetíveis ao Hst5. Consequentemente, o aumento da retenção localizada do Hst5 leva à morte celular fúngica. No entanto, pode haver uma condição em que a *C. albicans* degrada a Hst 5 empregando proteases aspartílicas, dificultando assim a sua atividade fungicida (Sharma *et al.*, 2021).

Figura 2: Mecanismos de ação da Histatina-5.



Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, (2021).

Estudos indicam que a Hst5 consegue inibir o crescimento de cepas de *C. albicans* em concentrações na faixa de 25 a 800 µg/mL (Moffa *et al.*, 2015) apresentando CIM (concentração inibitória mínima) de 8-16 µg/mL para algumas espécies de *C. albicans* testadas (Han *et al.*, 2016). Entretanto, esse peptídeo ainda não é utilizado para tratamentos clínicos, pois sofre rápida degradação por enzimas proteolíticas presentes na saliva humana capaz de reduzir sua atividade (Sun *et al.*, 2009). Portanto, estratégias que intensifiquem a ação antifúngica e que protejam a Histatina-5 da degradação proteolítica configuram-se como promissoras para viabilizar a aplicação deste peptídeo.

Estratégias como associação a nanopartículas e uso de sistemas de liberação como lipossomas, além de alterações internas no tamanho e sequência de aminoácidos do peptídeo podem ser empregadas para a obtenção de uma molécula com maior atividade antimicrobiana e menor degradação proteolítica comparada a molécula nativa. Nesse cenário, a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), criada em 1963 por Merrifield, pode ser uma excelente aliada na intenção de criar peptídeos híbridos, quiméricos, ou análogos de interesse. Dessa forma, foram sintetizados fragmentos peptídicos contendo uma sequência de aminoácidos compressa no domínio funcional da Hst5. Estudos já determinaram que os fragmentos proteolíticos derivados da degradação da Hst5 na cavidade oral podem reter atividade antimicrobiana similar, ou mesmo superior, ao peptídeo original. As vantagens do uso desses peptídeos menores são a menor chance de degradação e perda de atividade e uma maior facilidade de interação com carreadores de membrana e penetração na célula fúngica (Helmerhorst, 2006).

Outra estratégia empregada é a associação de moléculas bioativas, que, além de diminuir o surgimento de mecanismos de resistência, possibilita uma redução da concentração das moléculas utilizadas, sem causar mudanças na ação antimicrobiana e, como resultado, pode acarretar uma diminuição de possíveis efeitos tóxicos dessas moléculas (Brennan-Krohn; Kirby, 2019; Cui *et al.*, 2015;). Por esse motivo, o uso desses tais peptídeos combinados pode resultar em uma terapia eficaz e inovadora contra infecções por *C. albicans*, capaz de superar e combater a resistência antimicrobiana, com aumento das chances de se obter um resultado positivo no controle da infecção.

Diante do cenário apresentado de crescente resistência antimicrobiana, o uso de alternativas com promissoras atividades antifúngicas e baixa toxicidade, como

peptídeos naturais do organismo humano, bem como o uso de estratégias para otimizar a ação de tais compostos é de grande importância para superar esse enorme problema na saúde pública mundial.

2 OBJETIVOS

O objetivo central deste projeto é avaliar o efeito de modificações pontuais de resíduos de aminoácidos de peptídeos derivados da Histatina-5 na inibição do crescimento do microrganismo *Candida albicans*. Para isso, são propostos os objetivos específicos abaixo:

- Sintetizar os peptídeos LN8 Hst5 e derivados pela metodologia de SPFS;
- Purificar e caracterizar os peptídeos LN8 Hst5 e derivados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia de massas;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos fragmentos LN8 Hst5 e Hst5, para comparação dos resultados;
- Avaliar a ocorrência de sinergismo entre os peptídeos pelo ensaio *checkerboard*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho racional e síntese dos peptídeos

Partindo de estudos que demonstraram que peptídeos semelhantes ao LN8 Hst5, fragmento do domínio funcional do peptídeo Histatina-5, apresentam ação antifúngica elevada contra *Candida albicans* e degradação consideravelmente lenta em contato com a saliva (Zambom, 2025), ele e seu derivado foram sintetizados utilizando a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida. A sequência da Histatina-5 e seus fragmentos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência primária do peptídeo Histatina-5 e dos fragmentos a serem sintetizados. A sequência de aminoácidos referente ao domínio funcional da Hst5 está destacada em vermelho.

Nome	Sequência de aminoácidos
Histatina-5	D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y
0WHst5	W D S H A K R H H G Y K R K F H E K H H S H R G Y
LN8 Hst5	W H G Y K R K F H
LN8 Hst5 K5,7H	W H G Y H R H F H

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

3.2 Síntese e clivagem da Histatina-5 e dos peptídeos derivados

Os peptídeos LN8 Hst5, LN8 Hst5 K5,7H e Hst5 foram sintetizados pelo método de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), de acordo com o protocolo Fmoc/t-Bu, no qual o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) age como protetor dos grupos α -amino, enquanto derivados terc-butil protegem as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Com o primeiro aminoácido já acoplado a uma resina do tipo Wang, a síntese ocorreu pelo processo contínuo de acoplamento e desproteção dos aminoácidos até a obtenção da sequência desejada, como mostra a Figura 3.

É necessária a ativação do grupo carboxila do aminoácido a ser acoplado para a formação da ligação peptídica com o grupo amina do aminoácido já ligado à resina, o que foi possível através dos agentes de acoplamento, N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), utilizados com um excesso molar de três vezes em relação ao grupo amina da resina, em DCM e DMF (1:1). A reação ocorreu por

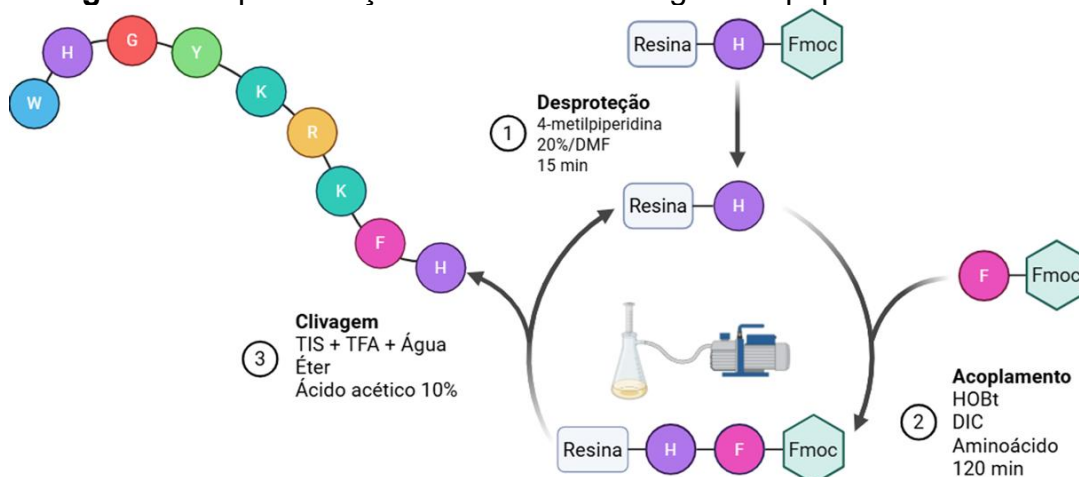
duas horas, e, entre cada novo acoplamento de aminoácido, foram realizadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM) para remoção de excesso de reagentes e subprodutos (Marrifield, 1963).

A verificação de cada acoplamento deu-se pelo teste de ninidrina, que reage em altas temperaturas com grupos amino livres, adquirindo coloração azulada, e, portanto, indicando a eficiência do acoplamento (Kaiser, 1970). Após a comprovação pelo teste de ninidrina, a desproteção do aminoácido foi feita em solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF, por 20 minutos. Caso o acoplamento não tenha sido confirmado pelo teste de ninidrina, uma nova reação foi realizada, empregando metade da quantidade inicial de reagentes.

Uma vez completa a cadeia de aminoácidos, foi realizada uma clivagem com o intuito de isolar o peptídeo formado da resina de partida, e desproteger as cadeias laterais dos aminoácidos acoplados. Para essa etapa, foi utilizada uma solução de clivagem, constituída por 95% de ácido trifluoracético (TFA), 2,5% de água deionizada e 2,5% de triisopropilsilano (TIS), mantida sob leve agitação por três horas, em temperatura ambiente não controlada.

Em seguida, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado, formando um precipitado branco. A mistura foi transferida para tubos tipo "falcon" para separação do precipitado e dos peptídeos não solúveis, através de centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, repetido por três vezes. O peptídeo foi então extraído com ácido acético em solução aquosa 10% (v/v), e, finalmente, liofilizados para a obtenção do material no estado bruto.

Figura 3: Representação da síntese e clivagem do peptídeo LN8 Hst5.



Fonte: Criado com BioRender. Elaborado pela autora, (2025).

3.3 Purificação e caracterização dos peptídeos obtidos

Os peptídeos foram purificados por meio de um sistema de HPLC em modo semi-preparativo, utilizando uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 143 (9,4 × 250 mm e 5 µm). As condições cromatográficas consistiram nos solventes A (0,045% TFA em H₂O) e B (0,036% TFA em ACN), um gradiente de 0,33% min⁻¹ do solvente B por 90 min, uma vazão de 2 mL min⁻¹ e comprimentos de onda de detecção em 220 e 280 nm. 147

A análise qualitativa foi realizada no modo analítico utilizando um sistema de separação Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector UV-Vis Shimadzu LC-10A/C-47A (Shimadzu, Japão), com uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 × 150 mm e 5 µm). Para o modo analítico, foram utilizados os solventes A (0,045% de TFA em H₂O) e B (0,036% de TFA em ACN), com gradientes variando de 5% a 95% do solvente B por um período de 30 min sob uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. Os peptídeos obtidos foram caracterizados e identificados por sistema HPLC acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray em modo positivo, em um espectrômetro de massas Bruker Amazon com analisador ion-trap (Bruker, EUA).

3.4 Preparo do inóculo de *Candida albicans*

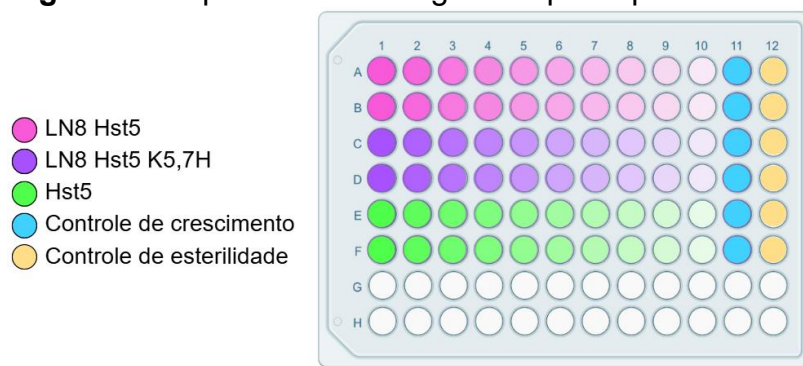
Para o preparo dos inóculos de cepas de *C. albicans*, o microrganismo liofilizado foi reativado em caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi®), incubado em estufa por 24 horas a 37°C. Em seguida, uma alçada de leveduras foi semeada em ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Kasvi®), incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de crescimento, a cultura estoque foi armazenada em geladeira, a 4°C. Para o preparo das suspensões padronizadas, colônias da cultura-estoque foram semeadas em SBD, com incubação por 24 horas a 37°C. Após esse período, a solução de microrganismo foi então padronizada para a concentração de 1x10³ UFC mL⁻¹ através da leitura da densidade óptica a 530 mn.

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços), de acordo com metodologia adaptada da descrita segundo a norma M27-A3 do Manual CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE), 2008. Foram utilizadas as cepas de *C. albicans* de ATCC 10231, ATCC 18804 e ATCC 90028.

Inicialmente, os poços de uma microplaca de 96 poços foram preenchidos com 100 μ L de caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi®). Em seguida, foram acrescentados 100 μ L dos peptídeos solubilizados em água deionizada nos poços da coluna 1 da placa e realizou-se a diluição seriada da coluna 1 até a coluna 10. As colunas 11 e 12 serviram, respectivamente, como controle de crescimento do microrganismo e controle de esterilidade do teste, como representado na Figura 4. Adicionalmente, foram distribuídos 100 μ L das suspensões dos microrganismos padronizada em cada um dos poços das microplacas (exceto na coluna 12). Após a montagem, as placas foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C. Ao fim desse período, a DO em cada poço foi lida em um espectrofotômetro de microplacas (Biotek Epoch) a 595 nm.

Figura 4: Esquema de montagem da placa para CIM.



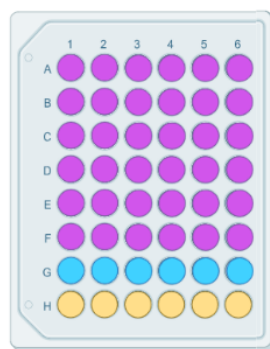
Fonte: Criado com BioRender. Elaborado pela autora, (2025).

3.6 Ensaio *checkerboard* para avaliação de efeito sinérgico

O efeito da combinação dos peptídeos derivados da Histatina-5 foi avaliado pelo ensaio de *checkerboard*. Para isso, foram adicionadas 25 μ L de concentrações variadas do peptídeo LN8 Hst5 nas colunas de 1 a 6 e do peptídeo LN8 Hst5 K5,7H nas linhas de A a F na placa, com 50 μ L de caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Kasvi®) e 100 μ L de inóculo. As linhas G e H foram mantidas, respectivamente, como controle de crescimento e de esterilidade, como ilustrado na Figura 5. A plataforma *SynergyFinder* foi utilizada a fim de avaliar os resultados obtidos.

Figura 5: Esquema de montagem da placa para o ensaio de *checkerboard*.

- LN8 Hst5 + LN8 Hst5 K5,7H
- Controle de crescimento
- Controle de esterilidade



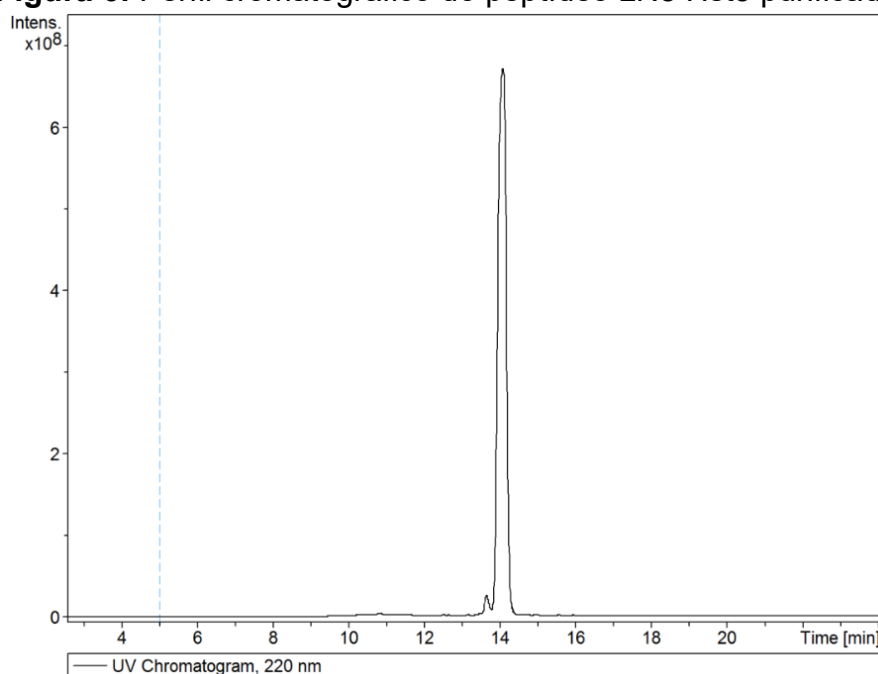
Fonte: Criado com BioRender. Elaborado pela autora, (2025).

4 RESULTADOS

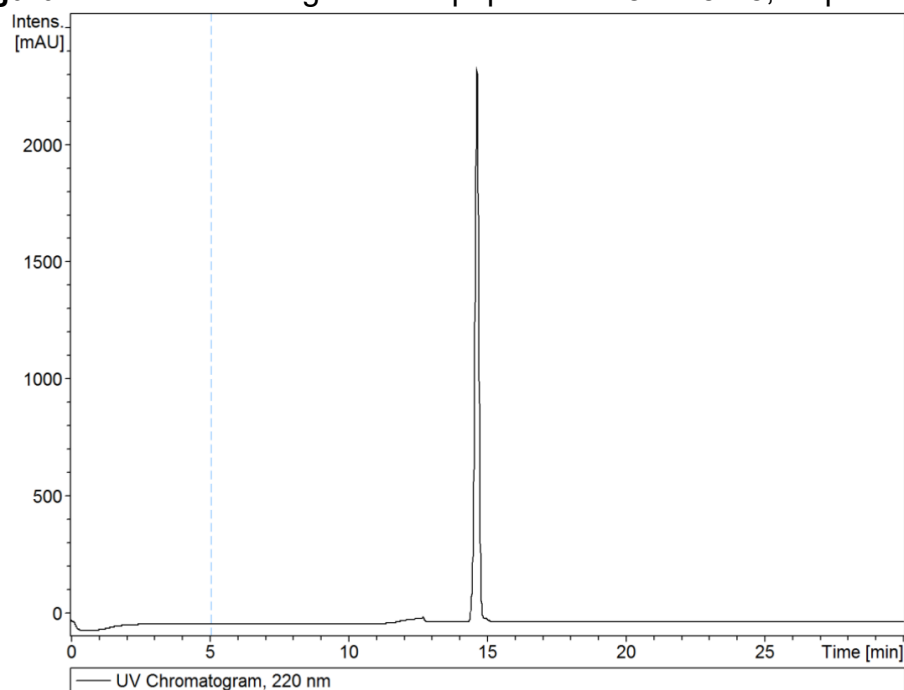
4.1 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados por SPFS (Marrifield, 1963), seguindo a sequência de aminoácidos de cada um, em resina Wang. Foi adicionado ao final de cada cadeia um resíduo de triptofano (W), aminoácido que apresenta emissão de fluorescência no espectro visível, o que permite que os peptídeos sejam detectados por meio de técnicas de espectroscopia de UV-vis. Os peptídeos foram clivados e obtidos com grau de pureza acima de 95% após purificação por HPLC. As figuras 6, 7 e 8 apresentam os perfis cromatográficos do material após a purificação em coluna de fase reversa C-18, de cada um dos peptídeos. Os materiais obtidos foram caracterizados, em seguida, por espectrometria de massas, apresentados na Figura 9, e foram obtidos resultados próximos com o teórico esperado, como apresentado na Tabela 2.

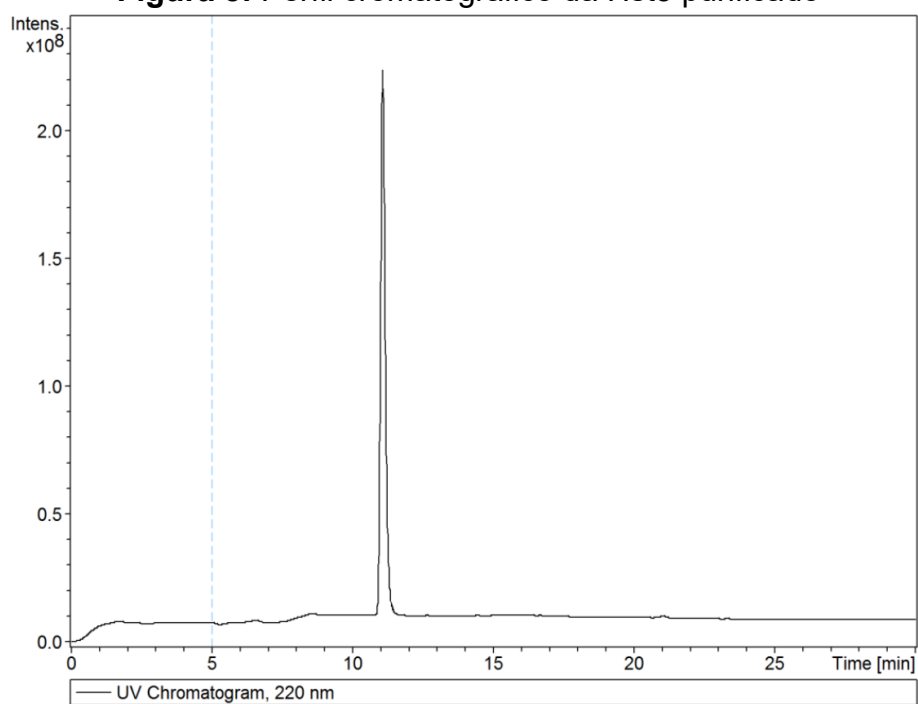
Figura 6: Perfil cromatográfico do peptídeo LN8 Hst5 purificado



Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

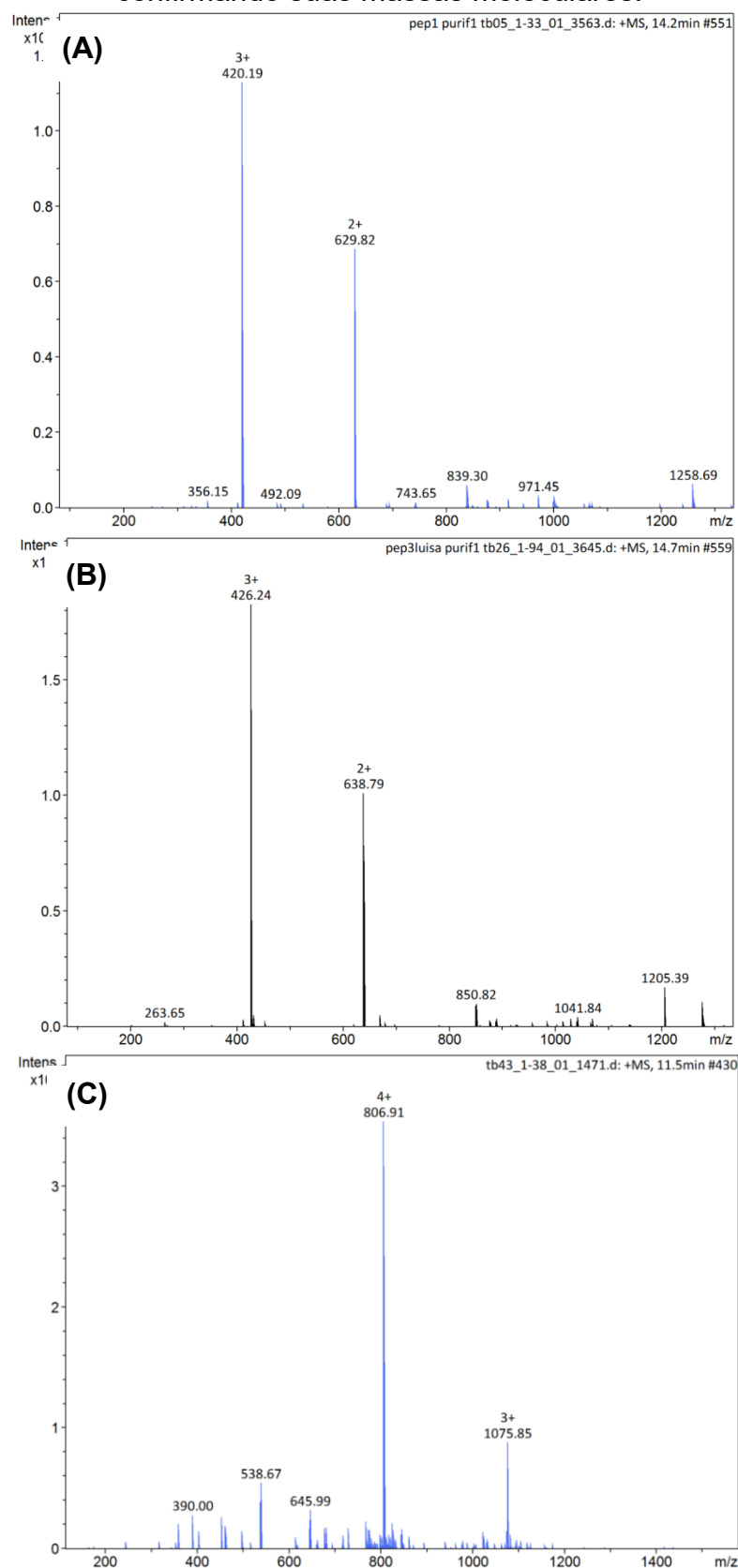
Figura 7: Perfil cromatográfico do peptídeo LN8 Hst5 K5,7H purificado

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Figura 8: Perfil cromatográfico da Hst5 purificado

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Figura 9: Espectro de massas obtido para os peptídeos **(A)** LN8 Hst5, **(B)** LN8Hst5 K5,7H e **(C)** Hst5, após purificação, indicando a obtenção dos peptídeos puros e confirmando suas massas moleculares.



Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Tabela 2: Razões massa/carga teóricas e obtidas após análise de espectrometria de massas para os peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Carga (z)	Razão m/z teórica	Razão m/z experimental	Massa molar teórica (gmol ⁻¹)	Massa molar experimental (gmol ⁻¹)
LN8 Hst5	2	630,21	629,82	1258,43	1257,60
	3	420,48	420,19		
LN8 Hst5 K5,7H	2	639,18	638,79	1276,37	1275,65
	3	426,46	426,24		
Hst5	3	1075,17	1075,85	3222,50	3215,09
	4	806,62	806,91		

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

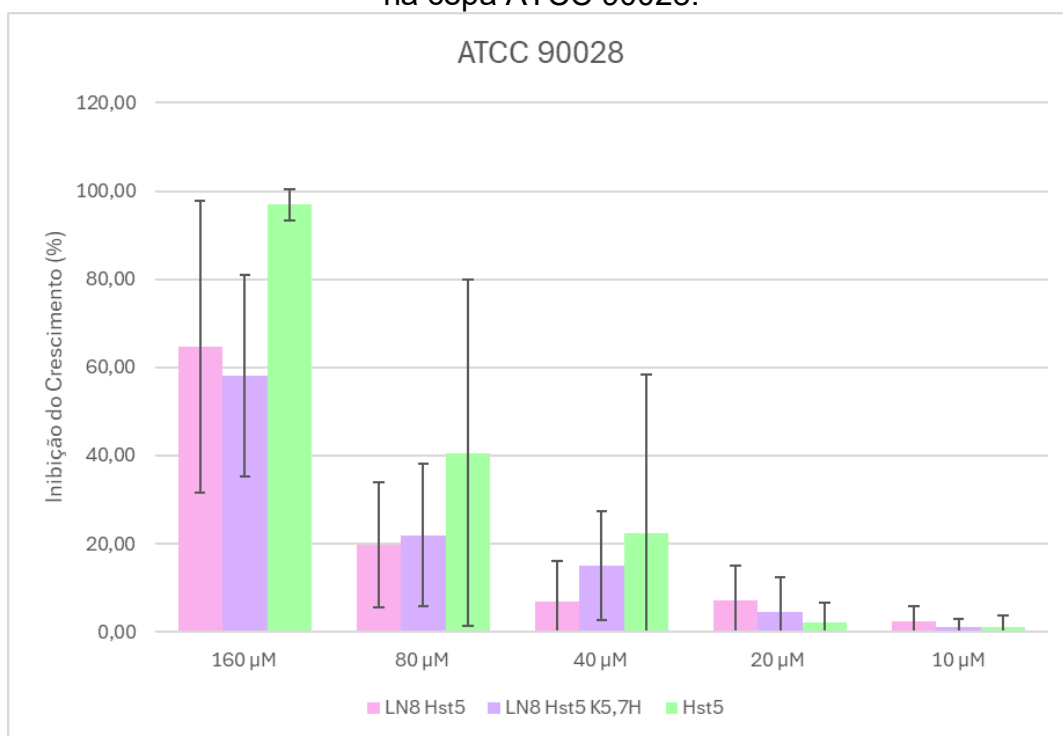
A partir dos valores das massas molares teóricas dos peptídeos, é possível calcular a razão massa/carga teórica, que se espera observar no espectro de massas, pela soma da massa molar de cada peptídeo com a carga teórica referente ao número de prótons (H⁺) e dividindo pelo valor da carga. As razões de massa/carga teóricas e experimentais para cada peptídeo estão apresentadas na Tabela 2, bem como a massa molar de cada um dos peptídeos analisados, obtidas a partir dos dados experimentais.

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

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

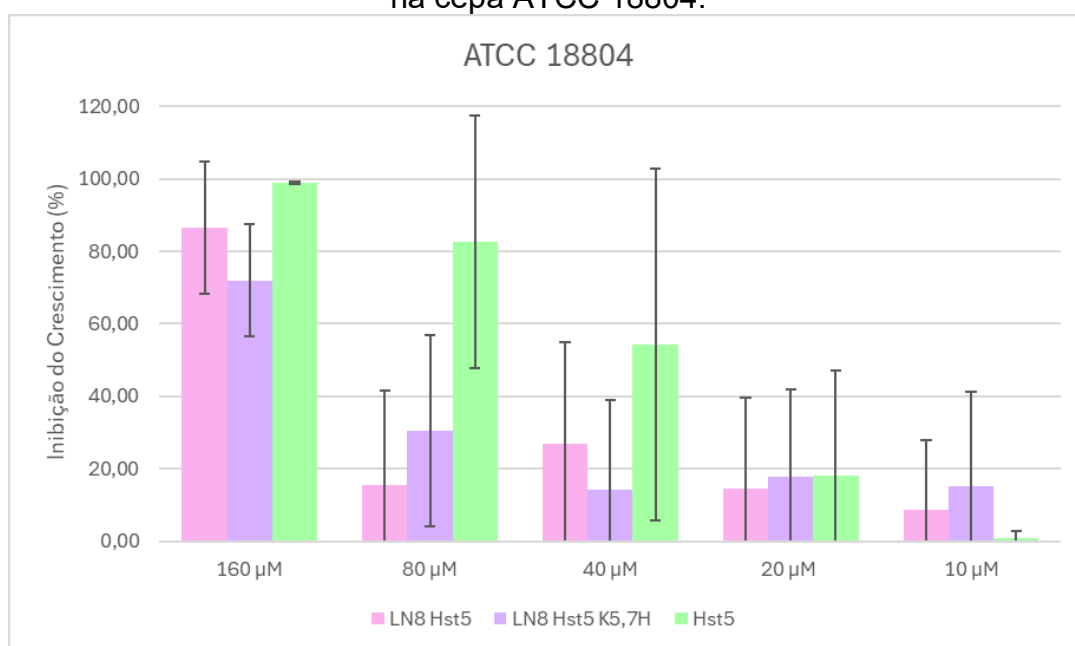
A determinação da concentração inibitória mínima de um antimicrobiano tem o propósito de estabelecer qual a menor concentração necessária de tal agente para inibir o crescimento do microrganismo escolhido. As figuras 10, 11 e 12 ilustram a inibição em porcentagem obtida para cada concentração dos fragmentos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H e para a Histatina-5 nas cepas ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231, respectivamente.

Figura 10: Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 90028.



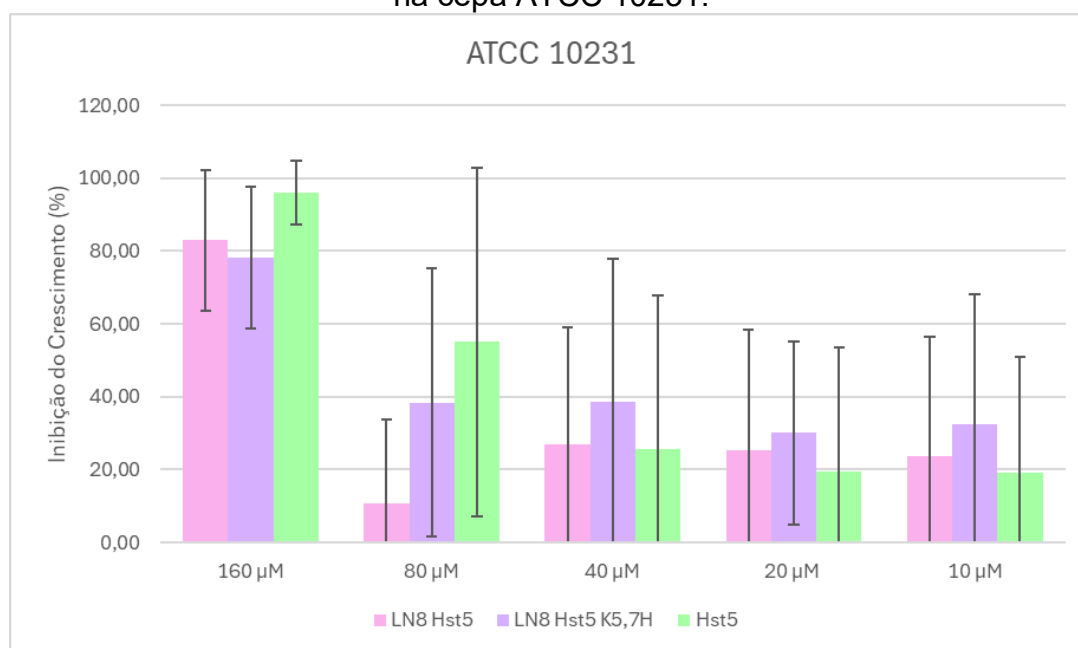
Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Figura 11: Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 18804.



Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Figura 12: Gráfico da inibição de cada peptídeo e da Hst5 para cada concentração na cepa ATCC 10231.



Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Os resultados mostraram que os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H possuem a capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans* em por volta de 60% na concentração de 160 µmol.L⁻¹ para a cepa ATCC 90028. Para as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231, o fragmento não modificado apresenta inibição acima de 80% na concentração de 160 µmol.L⁻¹ e o fragmento modificado acima de 70%. A Histatina-5 exibiu inibição acima de 95% para as três cepas na concentração de 160 µmol.L⁻¹ e, para a cepa ATCC 18804, houve uma inibição de mais de 80% do crescimento para a concentração de 80 µmol.L⁻¹.

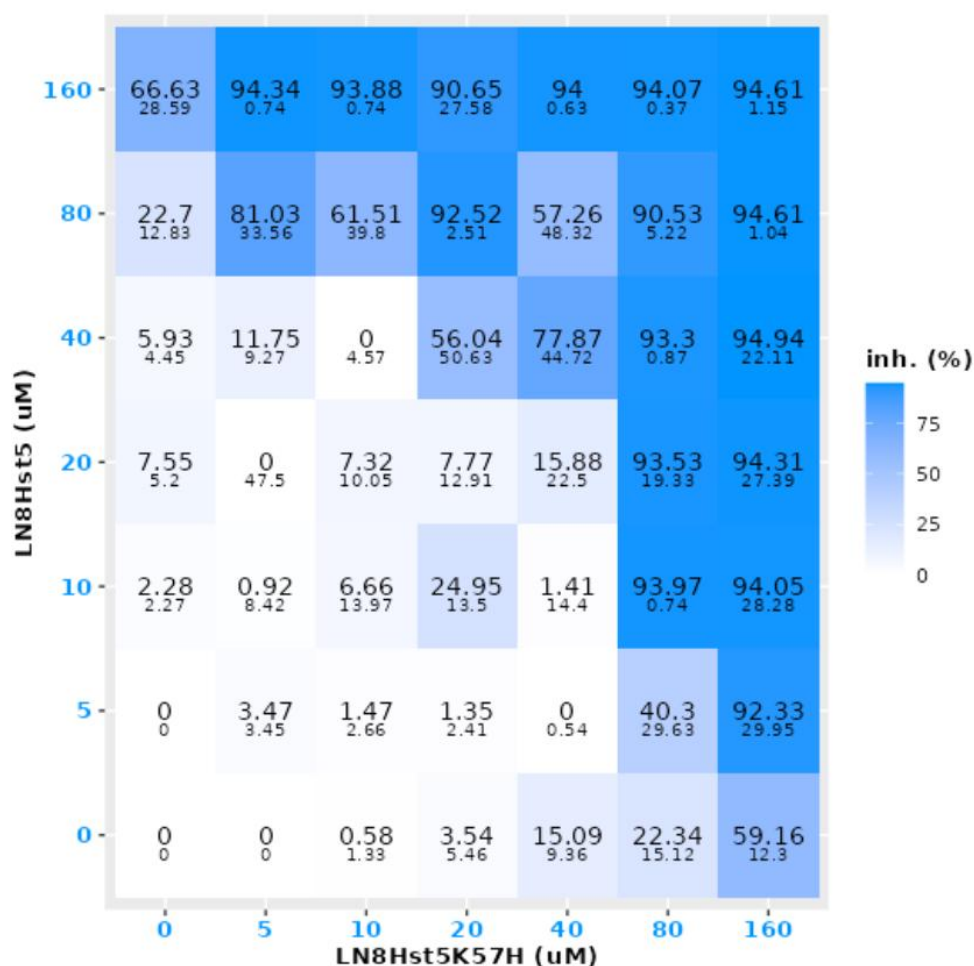
4.3 Avaliação do efeito sinérgico

Sinergismo ocorre quando dois tratamentos, ao invés de agirem de forma independente, interagem entre si, influenciando assim uma resposta biológica. A potencialização da inibição de *C. albicans* é de interesse uma vez que pode permitir a diminuição da dose de administração do composto sem alteração da atividade antimicrobiana, além de possivelmente o tornar eficiente em casos em que já sofre resistência fúngica. Assim, o estudo visou a avaliação de um potencial sinergismo entre os peptídeos.

De forma a determinar o efeito das frações combinatórias, a partir das matrizes de inibição, foi calculada o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), dado pela somatória da razão entre as concentrações inibitórias mínimas dos compostos avaliados isolados e combinados, como apresentado na Equação 1 (Soares, 2014). Foi utilizada a menor combinação de concentrações dos peptídeos que promoveu inibição maior ou igual a 90% (CIM) e a CIM dos compostos peptídicos agindo individualmente, conforme observado na placa de *checkerboard*.

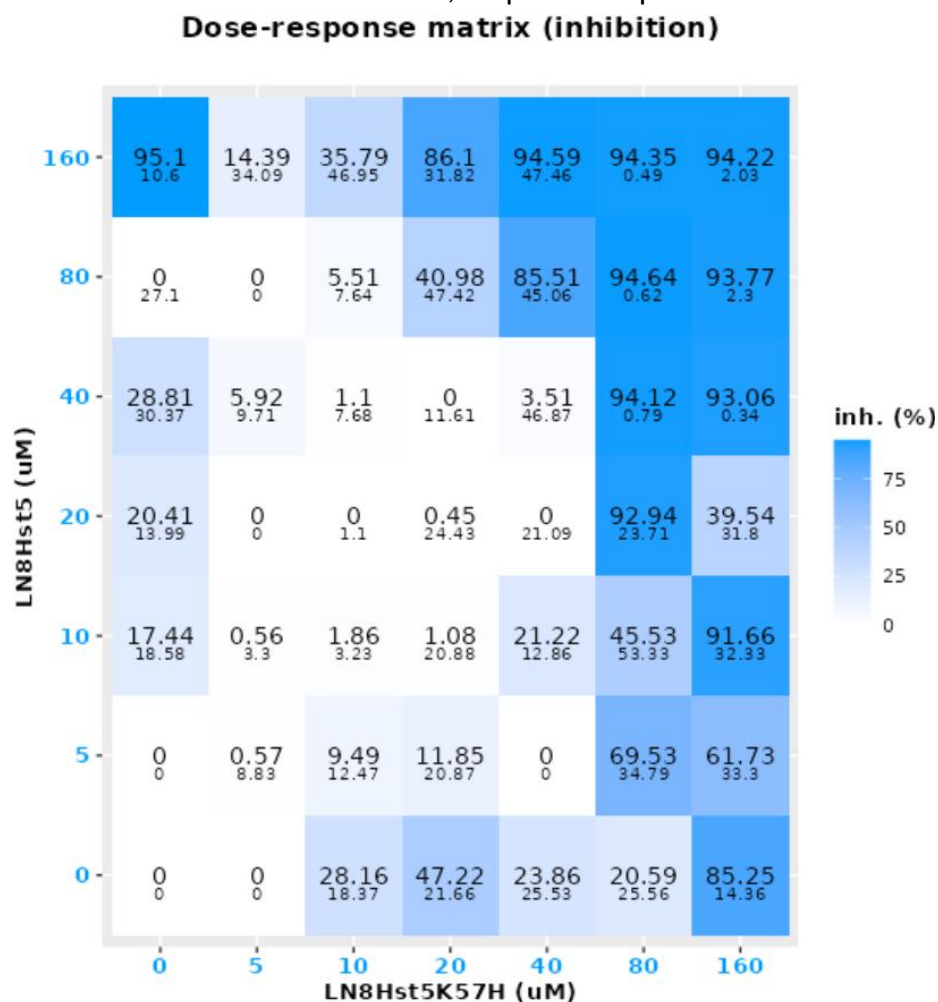
$$ICIF = \left(\frac{CIM_{LN8\ Hst5\ combinado}}{CIM_{LN8\ Hst5}} \right) + \left(\frac{CIM_{LN8\ Hst5\ K5,7H\ combinado}}{CIM_{LN8\ Hst5\ K5,7H}} \right) \quad (1)$$

Figura 13: Matriz dose-resposta de inibição da combinação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H para a cepa 90028.
Dose-response matrix (inhibition)



Fonte: Elaborado pela autora na plataforma SynergyFinder, 2025.

Figura 14: Matriz dose-resposta de inibição da combinação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H para a cepa 10231.



Fonte: Elaborado pela autora na plataforma SynergyFinder, (2025).

O índice de concentração inibitória fracionária indica que a relação entre dois compostos pode ser sinérgica, caso o índice tenha valor menor que 0,5; aditiva, caso o ICIF esteja entre 0,5 e 1; indiferente, quando apresenta valores entre 1 e 2; e antagonista, estando acima de 2 (Kumar, 2012). Os valores obtidos para a combinação de cada composto estudado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Efeito da interação entre os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H determinados pelo índice de concentração inibitória fracionária, contra *C. albicans*.

Microrganismo	Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		CIF	ICIF	Resultado
		Isolado	Combinado			
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	LN8 Hst5	160	10	0,0625	0,5625	Aditiva
	LN8 Hst5 K5,7H	160	80	0,5		
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	LN8 Hst5	160	20	0,125	0,625	Aditiva
	LN8 Hst5 K5,7H	160	80	0,5		

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

O potencial sinergismo entre os peptídeos foi analisado por diferentes métodos, disponíveis na plataforma SynergyFinder, conforme apresentado na Tabela 4. O modelo de independência de Bliss assume um processo aleatório em que as drogas agem independentemente, sendo geralmente aplicado quando as amostras testadas possuem diferentes mecanismos de ação (Yadav, 2015). O modelo de aditividade de Loewe assume que os fármacos possuem curvas de dose-resposta idênticas, uma vez que fármacos idênticos não deveriam apresentar sinergismo ou antagonismo (Tang, 2015). Por fim, o modelo ZIP, se dá pela combinação do processo aleatório assumido pelo modelo de Bliss com a forma paramétrica do modelo de Loewe, propondo avaliar combinações independentemente de seus mecanismos de ação (Yadav, 2015).

Tabela 4: Pontuação média de sinergia calculada para a combinação entre LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H em diferentes modelos.

Microrganismo	Combinação	Método		
		Bliss	Loewe	ZIP
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	LN8 Hst5 / LN8 Hst5 K5,7H	24,146	20,838	23,956
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	LN8 Hst5 / LN8 Hst5 K5,7H	- 5,174	- 2,514	- 2,264

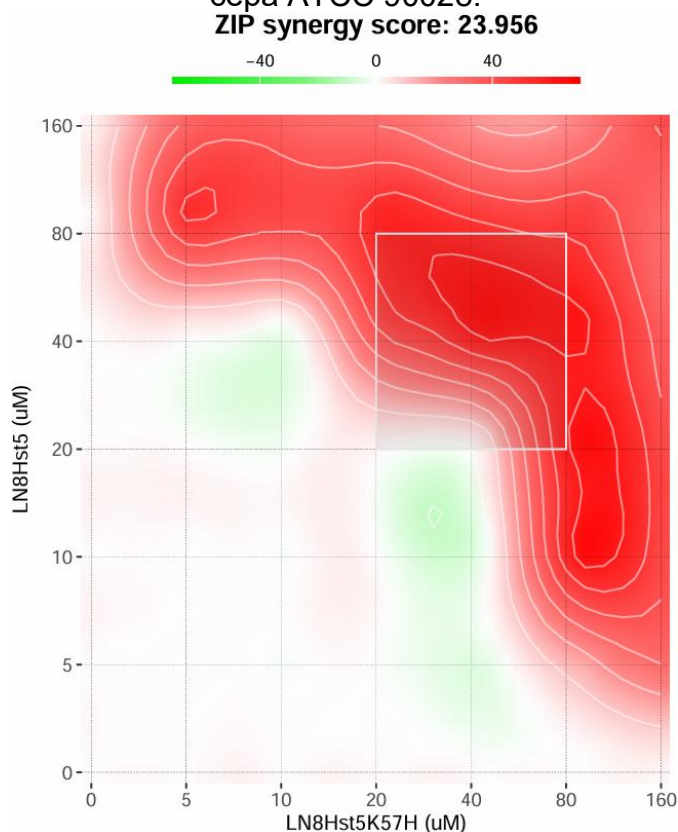
Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Pontuações acima de +10 sugerem a ocorrência de interação sinérgica para as combinações testadas, pontuações abaixo de -10 sugerem antagonismo e pontuações intermediárias indicam aditividade entre as combinações. Pela tabela

acima, é possível observar que todas as combinações para a cepa ATCC 90028 apresentam interação sinérgica, e, para a cepa ATCC 10231, apontam aditividade.

A plataforma SynergyFinder também permite gerar um mapa de contorno que relaciona a pontuação de sinergismo para a combinação de peptídeos a partir dos cálculos realizados. Os gráficos representando as combinações de LN8 Hst5 com LN8 Hst5 K5,7H para as cepas ATCC 90028 e ATCC 10231 são apresentados nas figuras 15 e 16, sendo possível observar os pontos sinérgicos.

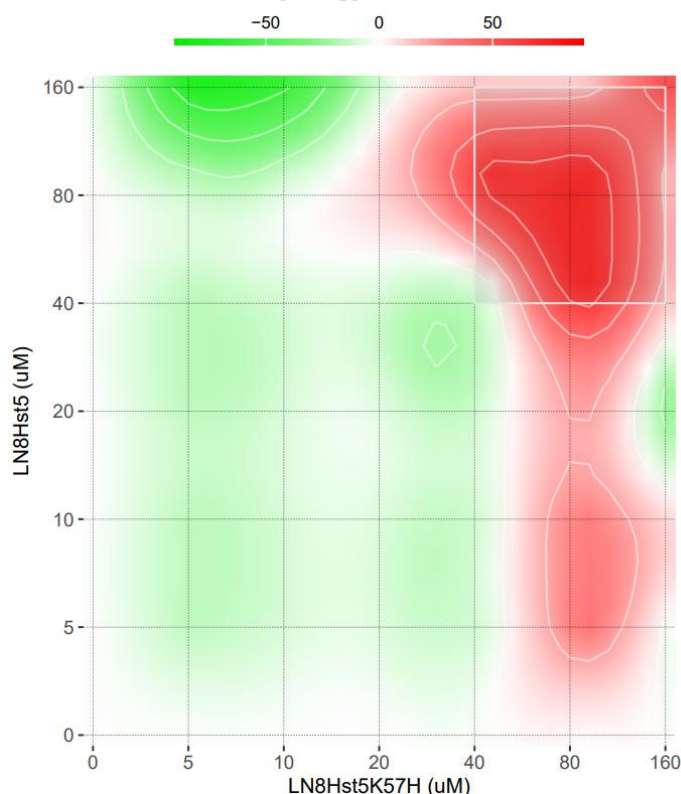
Figura 15: Mapa de contorno representando os diferentes valores de δ obtidos no ensaio *checkerboard* avaliado pelo modelo ZIP para a combinação dos peptídeos na cepa ATCC 90028.



Fonte: Elaborado pela autora na plataforma SynergyFinder, (2025).

Figura 16: Mapa de contorno representando os diferentes valores de δ obtidos no ensaio *checkerboard* avaliado pelo modelo ZIP para a combinação dos peptídeos na cepa ATCC 10231.

ZIP synergy score: -2.264



Fonte: Elaborado pela autora na plataforma SynergyFinder, (2025).

Ambos os gráficos apresentam áreas sinérgicas, com o quadrado destacando a região mais sinérgica considerando inibição e concentração de cada peptídeo. A Figura 13, com a predominância da cor vermelha e sua pontuação de 23,956, reforça a interação sinérgica, enquanto a Figura 14 com uma maior região destacada pela cor verde e pontuação de - 2,264 indica aditividade entre os compostos.

Pode-se dizer, portanto, que a combinação dos peptídeos é efetiva para a melhora da atividade antimicrobiana frente às cepas ATCC 90028 e ATCC 10231 de *C. albicans*. Os resultados obtidos pelos índices de concentração inibitória fracionada mostram que a ação dos peptídeos combinados é aditiva nas duas cepas testadas, como pode ser observado pelas matrizes de dose-resposta, apresentadas nas figuras 8 e 9, na qual a presença de um dos peptídeos teve grande a influência na ação do outro, nas concentrações nas quais não há inibição pelos compostos peptídicos isolados.

5 CONCLUSÃO

Diante da problemática da resistência antimicrobiana, novos tratamentos para casos de infecção por *Candida albicans* são necessários, dessa forma, os peptídeos LN8 Hst5 e LN8 Hst5 K5,7H foram escolhidos pela sua promissora atividade antimicrobiana. Os peptídeos foram efetivamente sintetizados e caracterizados através da estratégia de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.

Os fragmentos de Histatina-5 testados foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* em uma concentração de 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ nas três cepas testadas, com o fragmento sem a modificação pontual apresentando valores de inibição maiores que o modificado, porém a Histatina-5 exibiu um valor de inibição de crescimento maior que os outros peptídeos.

A combinação do LN8 Hst5 com o LN8 Hst5 K5,7H foi aditiva em ambas as cepas pelo ICIF e pelos modelos Bliss, Loewe e ZIP na ATCC 10231. Na cepa padrão, os três modelos indicaram uma interação sinérgica.

REFERÊNCIAS

- BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237–245, jul. 2017.
- BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. When one drug is not enough: context, methodology, and future prospects in antibacterial synergy testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 3, p. 345–358, 1 set. 2019.
- CHANDRA, J. *et al.* Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **Journal of Dental Research**, v. 80, p. 903–908, 2001.
- CUI, J. *et al.* Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 19 maio 2015.
- HAN, J. *et al.* Antifungal activity and action mechanism of Histatin 5-Halocidin hybrid peptides against *Candida ssp.* **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1-18, Feb. 2016.
- HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **American Society for Microbiology**, [s. l.], v. 39, ed. 9, 1 jan. 1995.
- HELMERHORST, E. J.; HOF, W. V. 'T; VEERMAN, E. C. I.; SIMOONS-SMIT, I.; AMERONGEN, A. V. N. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. **Biochemical Journal**, v 326, p. 39–45, ago. 1997.
- HELMERHORST, E.J.; ALAGL, A. S.; SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061– 1070, dez. 2006.
- IANEVSKI, A.; GIRI, K. A.; AITTOKALLIO, T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 739–743, 5 July 2022.
- IKONOMOVA, S. P. *et al.* Effects of histatin 5 modifications on antifungal activity and kinetics of proteolysis. **Protein Science**, v. 29, n. 2, p. 480-493, 2019.
- KAISER, E. *et al.* Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595–598, Apr. 1970.
- KUMAR, S. N. *et al.* Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.
- LIMA, J. M. S. D.; SILVA, Y. F.; PEIXOTO, F. B. O imunocomprometimento e a relação com o desenvolvimento da candidíase oral: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 8 8, n. 1, p. 01-11, jan./feb., 2025.
- MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis: the synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, July. 1963

MILSSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487-494, Aug. 2016.

MOFFA, E. B. *et al.* Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–7, Aug. 2015

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268–280, Apr. 2004.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. FUNK-0002-2016, Oct. 2016.

SHARMA, P. *et al.* Envisaging antifungal potential of histatin 5: a physiological salivary peptide. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 1070, 2021.

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

SUN, X.; SALIH, E.; OPPENHEIM, F. G.; HELMERHORST, E. J. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. **The FASEB Journal**, v 23, p. 2691–2701, ago. 2009.

TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What is synergy? The Saariselka Agreement revisited. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 181, 2015.

VILA, T. *et. al.* Oral candidiasis: a disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 15, 2020.

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**, 2022.

YADAV, B. *et al.* Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 13, p. 504–13, 2015