



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
—JÚLIO DE MESQUITA FILHO— - CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PRISCILA MARANGONI PORTO RICCIARDELLI

**"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 PARA O TRATAMENTO DE CANDIDOSE BUCAL "**

ARARAQUARA

2016

PRISCILA MARANGONI PORTO RICCIARDELLI

**"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA
HISTATINA-5 PARA O TRATAMENTO DE CANDIDOSE BUCAL "**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista —Júlio
de Mesquita Filho”, para obtenção do grau
de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Profº. Drº. Saulo Santesso Garrido

ARARAQUARA

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu cuidado a cada dia, por capacitar-me e ajudar-me a superar alguns medos, mostrando-me que sou capaz. Por ensinar-me a ter mais fé e por todas as oportunidades que colocou em meu caminho. Toda honra e toda glória sejam dadas à Ele.

“Tudo posso naquele que me fortalece.” (Fp 4.13)

Ao meu marido, Bruno Ricciardelli, pela paciência, pelo cuidado e principalmente pelo amor. Seu apoio foi e é essencial.

À minha família, Gilson, Adriana e Guilherme Porto, pelo incentivo, por sempre acreditarem no meu potencial, pelo apoio em todos os sentidos, emocional e financeiro. Sem vocês, nada disso seria possível.

Às minhas amigas, Nicole Fernandes e Daniela Rodarte, que mesmo a quilômetros de distância, sempre se fizeram presentes em minha vida, e mais ainda nesses seis anos de graduação. Obrigada pela verdadeira amizade.

À futura doutora Aline Buda, que em meio a tantos desafios e dificuldades do dia-a-dia, sempre esteve pronta para me ajudar e o melhor de tudo, desconstrair o meu dia. Obrigada pela amizade.

Ao meu orientador, Saulo Santesso Garrido, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Bioquímica, pela paciência e disponibilidade. Obrigada pela orientação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de ação da Histatina-5 na *Candida albicans*. Histatina-5 permeia a membrana celular (A), é atraída para a mitocôndria (B), induz ao lançamento de ATP (C) e prejudica a respiração celular (E). Perda de ATP ativa um mecanismo de morte celular (D). Histatina-5 gera espécies oxigênio reativas (G) e detém a fase G1 do ciclo celular do núcleo (F).

Figura 2. Mecanismo de ação: histatina-5 quela metais extracelulares (micronutrientes) e proporciona um ambiente desfavorável ao desenvolvimento da célula fúngica (à esquerda); histatina-5 quela metais intracelulares e desregula a homeostase celular, causando morte da *Candida albicans* (à direita).

Figura 3. Princípio da Síntese Orgânica em Fase Sólida.

Figura 4. Teste de ninidrina demonstrando coloração da reação na presença de grupos aminas livres ou protegidas com o grupamento Fmoc.

Figura 5. Figura representativa do sistema utilizado para a síntese orgânica em fase sólida e clivagem dos análogos peptídicos

Figura 6. Imagem de Histatina-5 no interior de blastósporos e hifas de *Candida albicans*, obtida por microscópio de fluorescência (InCell Analyzer 2000 – GE Health Care Bio-Sciences).

Quadro 1. Sequência de aminoácidos da estrutura primária da Histatina-5 (Hst-5) e derivados estruturais deste peptídeo. (Hst-5'): contém carboxifluoresceína (CF) na extremidade amino-terminal; (Hst-5GH): apresenta o aminoácido histidina (His) na posição dos resíduos de glicina (Gly) da estrutura nativa; (Hst-5GH'): possui CF na extremidade amino-terminal; (Hst-5SC): apresenta o aminoácido cisteína (Cys) na

posição dos resíduos de serina (Ser) da estrutura nativa; (Hst-5SC'): possui CF na extremidade amino-terminal.

Quadro 2. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC, no Tempo 1 (acima) e Tempo 2 (abaixo). Nota-se o monômero da Histatina-5SC (pico à esquerda) e formação do dímero da Histatina-5SC (pico à direita).

Quadro 3. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5, bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 4. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5', bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5GH, bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 6. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5GH', bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 7. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC, bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 8. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC', bruto (acima) e após purificação (abaixo).

Quadro 9. Espectro de massas da Histatina-5.

Quadro 10. Espectro de massas da Histatina-5'.

Quadro 11. Espectro de massas da Histatina-5GH.

Quadro 12. Espectro de massas da Histatina-5GH'.

Quadro 13. Espectro de massas da Histatina-5SC.

Quadro 14. Espectro de massas da Histatina-5SC'.

Quadro 15. Perfil do espectro de massas do peptídeo Histatina-5SC dímero. Os picos em destaque são referentes a a $M/Z = 11$ e $M/Z=9$ da massa do peptídeo ($6102,8 \text{ g.mol}^{-1}$).

Quadro 16. Ensaio de atividade de crescimento de *Candida albicans* na presença de diferentes concentrações dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC.

Quadro 17. Gráfico dos resultados do ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC, no crescimento de células planctônicas.

Quadro 18. Gráfico dos resultados do ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_b) das células de biofilme de *Candida albicans* em contato com soluções dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC em diferentes concentrações.

Quadro 19. Gráfico dos resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com soluções dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC em diferentes concentrações.

Quadro 20. Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC frente a fibroblastos de hamster (teste MTT).

Quadro 21. Gráfico do ensaio do potencial Killing dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC frente a culturas de *Candida albicans*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pesos moleculares teóricos e obtidos por espectrometria de massas dos análogos peptídicos sintetizados. Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, UNESP-Araraquara. Realizada em 26 de Novembro de 2013.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hist 1: Histatina 1

Hist 2: Histatina 2

Hist 3: Histatina 3

Hist 5: Histatina 5

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EROs: Espécies Oxigênio Reativas

Zn: Zinco

Ni: Níquel

Cu: Cobre

Ca: Cálcio

Fe: Ferro

Sod5: Superóxido dismutase

SOFS: Síntese Orgânica em Fase Sólida

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIM_b: Concentração Inibitória Mínima das Células de Biofilme

XTT: (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

MTT: (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo)

IC50: Concentração necessária para inibir 50% das células

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

CF: Carboxifluoresceína

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Síntese, purificação e caracterização da Histatina-5 e seus análogos peptídicos.....	21
3.2. Dimerização da Histatina-5SC	25
3.3. Avaliação da Atividade Antifúngica: Micro-organismos e Condições de Crescimento.....	27
3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Células Planctônicas.....	27
3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM _b) das Células em Biofilme	28
3.6. Ensaio de XTT	29
3.7. Contagem do Número de Colônias Viáveis	30
3.8. Ensaio de Citotoxicidade dos Peptídeos Estudados	30
3.8.1. <i>Cultura e Manutenção das Células</i>	30
3.8.2. <i>Quantificação das Células</i>	31
3.8.3. <i>Contato da Solução de Histatina-5 e demais derivados peptídicos com as células</i>	32
3.9. Avaliação da Atividade Mitocondrial (Teste MTT)	32
3.10. Killing Assay Candida albicans	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1. Síntese, purificação e caracterização da Histatina-5 e seus análogos peptídicos.....	35
4.2. Avaliação da Atividade Antifúngica.....	46
4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Células Planctônicas.....	48
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM _b) das Células em Biofilme	49
4.5. Ensaio de XTT em Células de Biofilme	50
4.6. Avaliação da Atividade Mitocondrial (Teste MTT)	52
4.7. Killing Assay Candida albicans	53
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

7. DADOS FINAIS.....	63
----------------------	----

RESUMO

Os peptídeos têm sido amplamente estudados e demonstrados como uma estratégia promissora no combate a micro-organismos patogênicos, devido aos inovadores mecanismos de ação que apresentam e a menor indução de resistência nos micro-organismos. Os peptídeos da família das Histatinas, naturalmente presentes na saliva humana, são os principais agentes que auxiliam na cicatrização e oclusão de feridas, re-epitelização e, além disso, dispõem de mecanismos de ação contra micro-organismos, em especial, a *Candida albicans*. O agente etiológico da Candidíase bucal é a *Candida albicans*, um patógeno de origem fúngica, que acomete indivíduos de todas as idades, indivíduos imunologicamente debilitados e, especialmente, os usuários de próteses dentárias. Um importante fator de virulência da *Candida albicans* é a habilidade de formar biofilmes, estrutura comunitária microbiana revestida por exopolissacarídeos, capaz de aderir-se a superfícies lisas. Os biofilmes associam-se com a capacidade de causar infecções, com o desenvolvimento de resistência contra o sistema imune do hospedeiro e contra os antifúngicos. O uso indiscriminado e a exposição prolongada aos antifúngicos induz o surgimento de resistência a esses medicamentos, além disso existem cepas de *Candida albicans* resistentes ao tratamento com antifúngicos azólicos. Devido a isso surge a necessidade de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. O objetivo desse estudo consiste no desenvolvimento de análogos da Histatina-5 com algumas modificações estruturais, a fim de potencializar a ação terapêutica já comprovada dos peptídeos da família das Histatinas. A Histatina-5GH apresenta maior carga positiva que os demais peptídeos devido a troca de duas glicinas na estrutura da Histatina-5 por duas histidinas. Por sua vez, a Histatina-5SC possui o resíduo de serina C-terminal substituído por um resíduo de cisteína, o qual possui o grupo

sulfidrila em sua cadeia lateral, a fim de originar dímeros. Os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método de Síntese Orgânica em Fase Sólida, utilizando-se a estratégia Fmoc e partindo de Resina Wang como suporte polimérico. A purificação ocorreu pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguida de caracterização dos mesmos em espectrômetro de massas. Acredita-se que essas modificações estruturais darão origem a peptídeos com maior potencial terapêutico, reduzida indução de resistência nos micro-organismos, menor toxicidade e conseqüentemente menos efeitos adversos, além de maior adesão ao tratamento pelos indivíduos acometidos pela *Candida albicans*, sendo um inovador e promissor peptídeo para o tratamento dessa patologia.

PALAVRAS-CHAVE: Histatinas, *Candida albicans*, Candidiose bucal, biofilmes.

1. INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é uma levedura com característica diploide, podendo apresentar dimorfismo fúngico invertido. Ao contrário do que acontece com os demais fungos, a *Candida albicans* encontra-se na natureza na forma leveduriforme e torna-se patogênica quando na forma miceliana. Esse fungo apresenta diferentes morfologias. Na fase unicelular, a levedura pode desenvolver brotos e originar hifas verdadeiras. Entre as fases de broto e hifa, a *Candida albicans* pode apresentar a forma de pseudo-hifa, isto é, leveduras alongadas e unidas entre si. Essas mudanças de morfologia são induzidas por variações ambientais, principalmente de pH e temperatura.

A cavidade oral é habitada por leveduras do gênero *Candida*, desde o nascimento, em especial a *Candida albicans*. Elas habitam a cavidade bucal como leveduras saprófitas e fazem parte da microbiota normal, mas assumem a forma patogênica invasiva filamentosa quando expostas a algumas condições.

Apesar de não ser uma enfermidade mortal, a candidiose oral pode causar moléstias em diferentes níveis, ela interfere no paladar e na deglutição, reduzindo o apetite, também é porta de entrada para outras complicações como: candidiose orofaríngea, laringeana, esofágica e sistêmicas.

A *Candida albicans* é um dos principais patógenos de origem fúngica que acomete até mesmo os indivíduos mais saudáveis. Habita a superfície de mucosas, tanto oral como vaginal, podendo disseminar na corrente sanguínea e conduzir a infecções sistêmicas, além de sensibilizar o sistema imune e prejudicar a microbiota natural do organismo humano.

Alguns fatores de virulência estão relacionados com a patogênese da candidiose, como:

- presença de adesinas, da família do gene *ALS* (*agglutinin-like sequence*), responsável por codificar glicoproteínas de superfície, associadas com a adesão na superfície do hospedeiro;
- dimorfismo fúngico: levedura, pseudo-hifa, hifa verdadeira e clamiconídeos;
- mananas e manoproteínas: modulam o sistema imune do hospedeiro (ativam e desativam);
- toxinas, como: candida-toxina;
- sobrevivência dentro de fagócitos;
- adaptação ao ambiente oxidativo;
- variação de temperatura e pH;
- sequestro do ferro a partir da transferrina, candidiose hematogênica (BARBEDO & SGARBI 2010).

O número de pessoas que sofrem com a candidiose bucal aumenta quando levamos em conta alguns fatores que predispõem ao desenvolvimento do fungo, como: extremos de idade (recém-nascidos e idosos), trocas de epitélio, tabagismo, alterações hormonais e salivares, alterações de barreira de mucosa, alterações nutricionais e imunológicas, portadores de AIDS, pacientes em terapia com quimioterápicos e, em especial, usuários de próteses dentárias (BARBEDO & SGARBI 2010; VICENT et al. 2010).

As próteses dentárias, utilizadas em sua maior parte por idosos, tornam-se verdadeiros reservatórios de *Candida albicans* quando a higiene oral é escassa. A formação de biofilmes torna o grupo geriátrico mais susceptível à irritação da mucosa oral, infecções sistêmicas e estomatites.

A natureza da superfície dessas próteses também está associada às propriedades do biofilme formado, como: a afinidade do micro-organismo pela

superfície, a aderência do mesmo e a biomassa acumulada. Além disso, favorece a reprodução de determinada espécie de micro-organismo ou, até mesmo, a transição de um estágio de vida para outro de maior virulência; no caso da *Candida albicans*, a passagem da forma levedura para a forma de hifa, fenômeno possível de ocorrer principalmente em próteses formadas por hidroxiapatita (LI et al. 2010).

Os biofilmes são caracterizados como uma estrutura microbiana comunitária capaz de aderir a superfícies lisas, como próteses dentárias, e revestir-se em uma matriz de material exopolissacarídico. A *Candida albicans*, em especial, produz mais biofilmes que qualquer outra espécie de *Candida*, e quando comparada com outras espécies, seu biofilme é constituído por uma camada basal de blastoconídeos e uma matriz densa de exopolissacarídeos e hifas. A habilidade da *Candida albicans* em formar biofilmes está diretamente relacionada à capacidade de causar infecções, sendo considerado um fator de virulência importante, uma vez que biofilmes associam-se à resistência contra o sistema imune do hospedeiro e aos antifúngicos.

A resistência aos antimicrobianos induzida por biofilmes está associada à limitada penetração de drogas na matriz, diferenças fenotípicas devido ao decréscimo de desenvolvimento ou falta de nutrientes, indução de superfícies expressas por genes de resistência (BARBEDO & SGARBI 2010).

A saliva contém mais de 1000 proteínas diferentes, é um fluído essencial para a manutenção da saúde oral, secretada pelas glândulas salivares. Estudos demonstram que a saliva é importante para a cicatrização de feridas na boca, fenômeno até então atribuído à presença de fatores de crescimento.

Atualmente, tem-se também demonstrado que os peptídeos da família das Histatinas (Hist 1, Hist 2 e Hist 3), também presentes na saliva, são os principais agentes que auxiliam na atividade de cicatrização de feridas. Em concentrações de

equilíbrio homeostático, elas possuem poder de ativação celular, oclusão de feridas e re-epitelização.

A re-epitelização envolve interação estereoespecífica com receptores de membranas, sendo então sua quiralidade essencial para essa atividade. Esses efeitos terapêuticos são essenciais para o tratamento da candidose bucal, uma vez que ela causa irritação tecidual e, nos piores casos, infecções (POLLOCK et al. 1984).

Além disso, as Histatinas foram consideradas, por mais de três décadas, como substâncias capazes de atuar contra micro-organismos (OUDHOFF et al. 2009).

Os peptídeos antimicrobianos agem rapidamente, raramente induzem o surgimento de resistência em micro-organismos, além de apresentarem amplo espectro de ação (Denninson et al. 2007; McCubbin et al. 2011; Kamysz et al. 2006; Pini et al. 2012).

Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos que envolvem a ruptura da membrana celular, em geral, ocorrem por três vias diferentes:

- ruptura da bicamada lipídica: os peptídeos ligam-se fortemente na superfície da membrana, até atingirem uma concentração limiar, e então promovem uma ruptura na bicamada lipídica, por meio da lise dos fosfolipídeos que a compõem. Esse mecanismo ocorre independentemente da quiralidade na qual se encontra o peptídeo.
- formação de poros na membrana celular: com uma conformação helicoidal, os peptídeos agregam-se e adotam uma estrutura cilíndrica numa posição perpendicular à membrana, e dessa forma abrem espaços entre os fosfolipídeos de membrana, mecanismo conhecido como —~~bar~~rel-stave”. Os

peptídeos podem ainda ligar-se fortemente nas porções polares dos fosfolipídeos de membrana, promovendo uma torção da bicamada, mecanismo conhecido como “torcional pore” (Ambroggio et al. 2005; Fernandez et al. 2009; Castro et al. 2006).

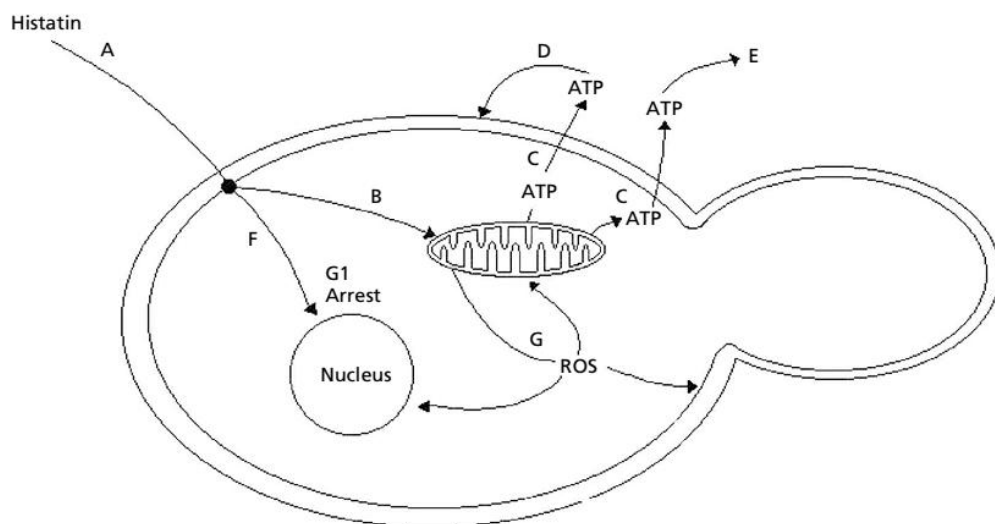
- “lipid clustering”: mecanismo que consiste na indução dos peptídeos para agrupar os componentes aniônicos de lipídeos zwitteriônicos (Epand et al. 2010; Teixeira et al. 2012).

A Histatina-5, especificamente, tem como alvo a mitocôndria da *Candida albicans*. Após cruzar a membrana plasmática, a Histatina-5 é atraída para a mitocôndria devido a similaridades estruturais que possui com as pré-sequências da mitocôndria; isso ocorre também devido a presença do difosfatidilglicerol na membrana da mitocôndria, um fosfolipídeo de membrana carregado negativamente, que atrai a Histatina-5, que por sua vez apresenta carga positiva, em direção à mitocôndria (HELMERHOST et al. 1999). Ao ligar-se na mitocôndria, a Histatina-5 induz o lançamento de ATP para o citoplasma.

Estudos demonstram que quando exposta à Histatina-5, a *Candida albicans* apresenta baixos níveis de ATP no meio intracelular e elevados no extracelular. Observa-se que os níveis de ATP ficam inalterados quando as células são tratadas com desacopladores de respiração, cianeto seguido de exposição a Histatina-5, o que indica que a respiração é um fenômeno essencial para o mecanismo de ação da Histatina-5 (HELMERHOST et al. 1999; KOSHLUKOVA et al. 1999). Esses estudos demonstram que há uma relação entre a morte celular com o efluxo de ATP. Acredita-se que o ATP extracelular ativa um receptor “purigenic-like”, o qual leva a célula à morte, responsável por seu efeito fungicida (KOSHLUKOVA et al. 1999).

A perda de ATP, por si só, é suficiente para causar morte celular, no entanto estudos recentes demonstram que a atividade fungicida da Histatina-5 é mediada também pela geração de espécies oxigênio reativas (EROs) (HELMERHOST et al. 2001). A *Candida albicans*, quando tratada com Histatina-5, induz a formação de EROs, as quais podem comprometer a estrutura da membrana celular ou sua função, ou ainda induzir a dano letal no DNA. Também foi relatado a interferência no ciclo celular da *Candida albicans* em presença da Histatina-5, comprometendo as células na fase G1 e, ao mesmo tempo, na regulação do volume celular homeostático, tudo isso devido a perda de ATP (BAEV et al. 2002).

Figura 1: Mecanismo de ação da Histatina-5 na *Candida albicans*. Histatina-5 permeia a membrana celular (A), é atraída para a mitocôndria (B), induz ao lançamento de ATP (C) e prejudica a respiração celular (E). Perda de ATP ativa um mecanismo de morte celular (D). Histatina-5 gera espécies oxigênio reativas (G) e detém a fase G1 do ciclo celular do núcleo (F).



Fonte: Kavanagh & Dowd (2004).

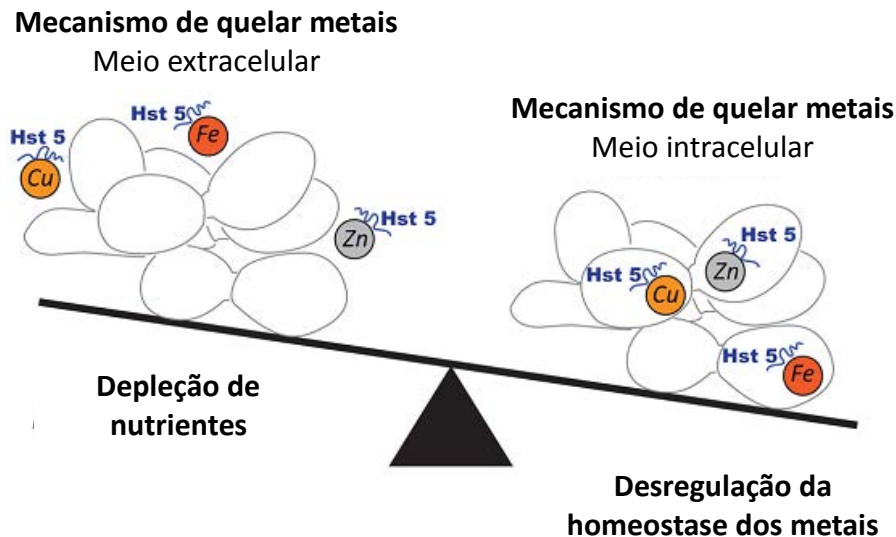
A Histatina-5 é capaz de ligar-se a metais naturalmente presentes na saliva, como: Zn, Ni, Cu, Ca e Fe (GARHAMMER et al. 2005; MATOS DE SOUZA et al. 2008; MIKULEWICZ et al. 2012). Esse mecanismo desestabiliza a alfa hélice da Histatina-5, o que gera conseqüências para a *Candida albicans* (BREWER et al.

2000). A ligação com o Zn, por exemplo, catalisa a fusão de lipídeos de vesículas e aumenta a atividade bactericida da Histatina-5 (MELINO et al. 1999; RYDENGARD et al. 2006). Enquanto a ligação com o Cu aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (CABRAS et al. 2007; HOUGHTON et al. 2009; TAY et al. 2009) e, consequentemente, a produção de EROs.

O Zn e o Cu são metais constituintes da superóxido dismutase (Sod5), enzima presente na mitocôndria da *Candida albicans*, e que podem ser quelados pela Histatina-5, alterando a função da Sod5. O Fe é um metal essencial para a sobrevivência de organismos, pois é cofator de proteínas envolvidas na transferência de elétrons, e por isso quando quelado pela Histatina-5 resulta em importantes consequências para a sobrevivência da célula.

A Histatina-5 é capaz de quelar metais que são micronutrientes importantes para a sobrevivência das células, produzindo um ambiente com condições nutricionais limitadas, o que interfere negativamente no desenvolvimento da *Candida albicans*. Metais intracelulares também podem ser quelados, interferindo nas funções vitais da célula fúngica. A mitocôndria, por exemplo, é uma organela sensível às mudanças de disponibilidade de Fe que, ao desestabilizar a homeostase desse metal, causa a morte de células de *Candida albicans*. Outra questão importante, é que o complexo Hist-5:Fe produz interações que servem como fonte para a geração de EROs, as quais oxidam importantes proteínas mitocondriais, induzindo a morte celular (PURI et al. 2014).

Figura 2: Mecanismo de ação: Histatina-5 quela metais extracelulares (micronutrientes) e proporciona um ambiente desfavorável ao desenvolvimento da célula fúngica (à esquerda); Histatina-5 quela metais intracelulares e desregula a homeostase celular, causando morte da *Candida albicans* (à direita).



Fonte: Adaptado de Puri & Edgerton (2014).

A *Candida albicans* é naturalmente sensível às drogas antifúngicas de uso sistêmico, no entanto a administração indiscriminada e a exposição prolongada induz o surgimento de resistência a esses medicamentos. Além disso, existem formas clínicas de candidiose orais crônicas resistentes ao tratamento com antifúngicos azólicos. A partir disso, surge a necessidade de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, com diferentes mecanismos de ação, indução de resistência reduzida, com menos efeitos adversos e maior potencial terapêutico (BARBEDO & SGARBI 2010; POLLOCK et al. 1984).

Os micro-organismos, como a *Candida albicans*, exibem pequeno e, em alguns casos, nenhum mecanismo de resistência aos peptídeos antimicrobianos, sendo dessa forma vistos como uma promissora solução contra a resistência aos antibióticos (Dennison et al. 2007; McCubbin et al. 2011; Kamysz et al. 2006; Pini et al. 2012).

Estudos demonstram que os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por apresentarem carga positiva e estrutura anfipática. A glicina, presente na Histatina-5, é um aminoácido que apresenta grupo R apolar e alifático; enquanto a histidina, presente na Histatina-5GH, possui grupo R carregado positivamente; a troca de duas glicinas por duas histidinas dará origem a um peptídeo (Histatina-5GH) com carga ainda mais positiva. A Histatina-5 possui carga positiva de 5,6 em pH 7,0; enquanto a Histatina-5GH apresenta, no mesmo pH, carga positiva de 5,8. É importante ressaltar que a saliva humana possui pH em torno de 7,0 e que essas serão as cargas expressas por esses peptídeos quando estiverem nesse fluido biológico, com isso espera-se maior potencial antifúngico da Histatina-5GH (WELLING et al. 2013).

A dimerização de peptídeos tem-se apresentado como um caminho promissor para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. A formação de dímeros a partir de peptídeos antimicrobianos tem apresentado excelentes vantagens farmacotécnicas, como: o aprimoramento da atividade antimicrobiana e da solubilidade dessas moléculas, a alteração de seu mecanismo de ação, além de resistência a ação de proteases. No entanto, sabe-se também que, em alguns casos, a dimerização pode gerar moléculas com menor atividade antimicrobiana ou com ganho de toxicidade (Yang et al. 2009; Zhu and Shin 2009b; Lorenzón et al 2012).

O fenômeno da dimerização também será explorado nesse projeto. A troca de uma serina na Histatina-5 por uma cisteína dará origem a Histatina-5SC, tanto serina como cisteína possuem grupo R polar e não carregado. No entanto, a cisteína possui grupamento sulfidril, o qual será oxidado a fim de formar ligações dissulfeto com outro monômero de Histatina-5SC, formando dímeros; uma vez que duas

moléculas unidas (dímero) irão interagir com a *Candida albicans*, espera-se potencializar o efeito antifúngico da Histatina-5SC (Hara et al. 2001; Dempsey et al. 2003; Pini et al. 2005; Dewan et al. 2009; Liu et al. 2010).

A boa solubilidade em água tanto da Histatina-5GH como da Histatina-5SC também é uma importante propriedade química dessas moléculas a ser considerada, uma vez que esses peptídeos são projetados para serem administrados pela via oral, a qual possui fluído biológico abundante em água.

2. OBJETIVOS

Avaliar a efetividade dos peptídeos Histatina-5GH e Histatina-5SC dímero contra os biofilmes de *Candida albicans* formados sobre a estrutura de próteses dentárias removíveis, obviamente comparando-os com os efeitos do peptídeo Histatina-5 presente naturalmente na saliva humana; para que enfim possamos avaliar o aumento ou redução de atividade desses derivados estruturais com relação a Histatina-5.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese, purificação e caracterização da Histatina-5 e seus análogos peptídicos

A síntese da Histatina-5 e seus derivados estruturais (Quadro 1) ocorreu empregando-se o método de Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS).

Quadro 1: Sequência de aminoácidos da estrutura primária da Histatina-5 (Hst-5) e derivados estruturais deste peptídeo. (Hst-5'): contém carboxifluoresceína (CF) na extremidade amino-terminal; (Hst-5GH): apresenta o aminoácido histidina (His) na posição dos resíduos de glicina (Gly) da estrutura nativa; (Hst-5GH'): possui CF na extremidade amino-terminal; (Hst-5SC): apresenta o aminoácido cisteína (Cys) na posição do resíduo de serina (Ser) C-terminal da estrutura nativa; (Hst-5SC'): possui CF na extremidade amino-terminal.

(Hst-5) $^+NH_3$ -Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr-COO $^-$

(Hst-5') **CF**-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr-COO $^-$

(Hst-5-GH) $^+NH_3$ -Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-**His**-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-**His**-Tyr-COO $^-$

(Hst-5-GH') **CF**-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-**His**-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-**His**-Tyr-COO $^-$

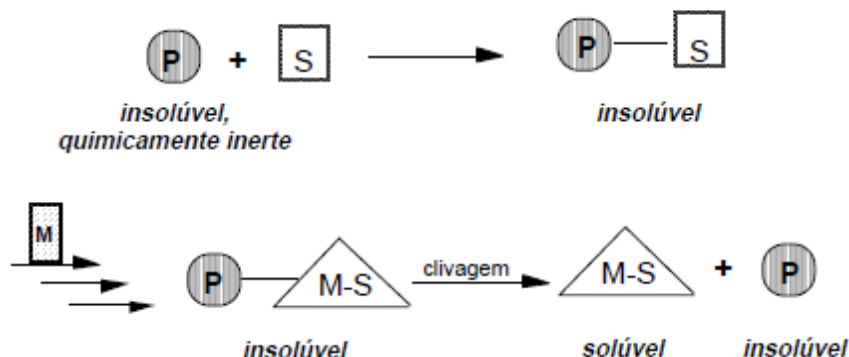
(Hst-5-SC) $^+NH_3$ -Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-**Cys**-His-Arg-Gly-Tyr-COO $^-$

(Hst-5-SC') **CF**-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-**Cys**-His-Arg-Gly-Tyr-COO

Fonte: Moffa (2013).

A técnica utiliza polímeros insolúveis (poliestireno) e consiste em manter os peptídeos em questão ancorados a esses polímeros por meio de uma ligação covalente. Tais polímeros possuem regiões de alta reatividade, conhecidas como: sítio ativo, ligantes ou “~~inkers~~”, onde o substrato ficará ancorado. O uso de polímeros insolúveis oferece uma grande vantagem, possibilita a lavagem da resina e a remoção de solventes e reagentes sem perder o polímero, através de filtração à vácuo (MARQUARDT & LIMA 2001).

Figura 3: Princípio da Síntese Orgânica em Fase Sólida. P= Polímero; S= Substrato; M= Modificações Químicas; M-S= Produto da Síntese.



Fonte: Marquardt & Eifler-Lima (2001).

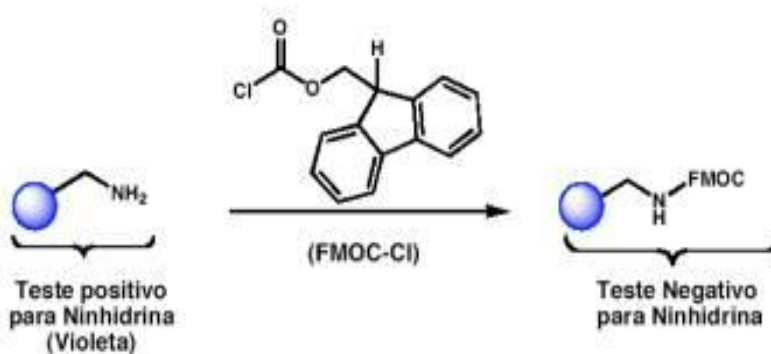
A Síntese Orgânica em Fase Sólida (STEWART & YOUNG; 1984; KENT, 1988; LOYD-WILLIAMS et al., 1997; AMBLARD et al., 2005) foi empregada manualmente, de acordo com o protocolo padrão, que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butilícos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (FIELDS & NOBLE, 1990).

Para essa síntese foi escolhida a Resina Wang com o primeiro aminoácido da sequência previamente incorporado e com grau de substituição variável, de acordo com a sequência de cada peptídeo a ser sintetizada, usando Diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes, em relação à quantidade de Resina Wang de partida, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em DCM:DMF (1:1), por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF. O emprego de

solventes com diferentes polaridades é proposital, visa compactar e descompactar a resina, de forma a expulsar impurezas presentes nos poros da estrutura polimérica.

A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

Figura 4. Teste de ninidrina demonstrando coloração da reação na presença de grupos aminas livres ou protegidas com o grupamento Fmoc.



Fonte: Kaiser et al. (1970).

Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e Diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos. O uso de DMF para acoplamento e desproteção deve-se ao rendimento máximo (95%) que a associação da Resina Wang com esse solvente oferece durante a reação de polimerização.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a 25°C por 3 horas. Peptídeos, denominados brutos, serão precipitados e lavados com éter dietílico gelado e

centrifugados (seis vezes), dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados.

A purificação dos peptídeos foi feita por Cromatografia Líquida de Média Eficiência (CLME-Beckman), usando uma coluna de fase reversa Jupiter C18 (250 x 10 mm; 5 μ m; 300 Å) com um gradiente convexo de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA) variável, fluxo de 4,0 mL/min e detecção a 220 nm. CLAE analítica será feita em um cromatógrafo Shimadzu, empregando uma coluna de fase reversa SCL-10AVP C18 New column (150 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 1 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

A caracterização dos produtos, após a purificação, foi realizada através da determinação da massa molecular dos mesmos, empregando espectrometria de massas (modo eletrospray positivo - ES/MS⁺). Espectrômetro de massas Bruker, modelo Amazon-ion trap, operando em modo eletrospray positivo, acoplado a sistema de Cromatografia Líquida de Ultraperformance (UFLC) Shimadzu, configurando um sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/ESI-MS).

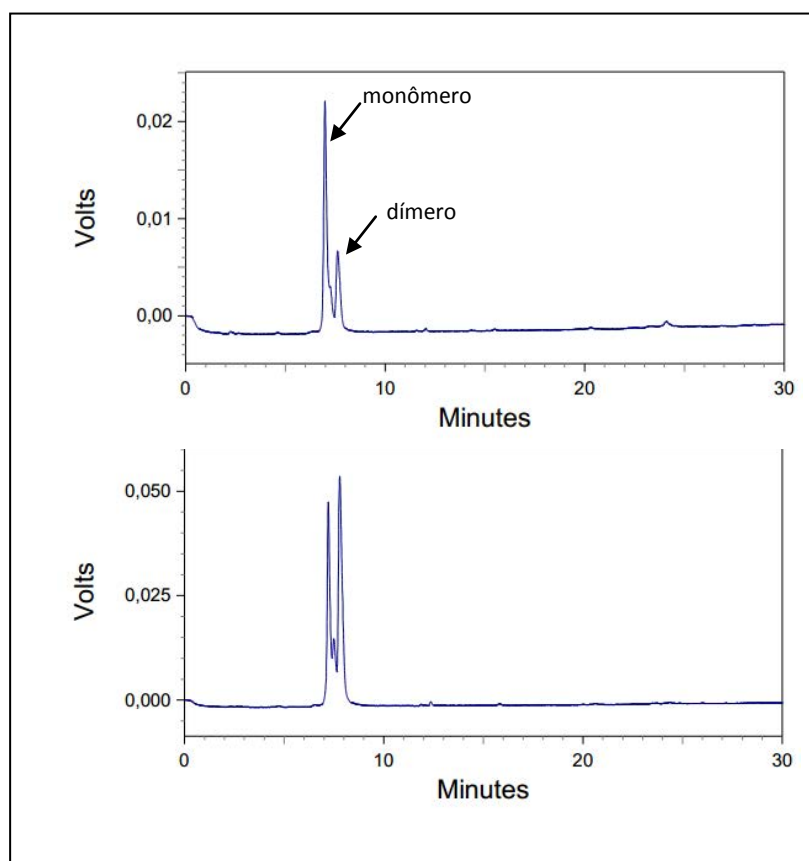
3.2. Dimerização da Histatina-5SC

Utilizou-se 350mg de Histatina-5SC e 8ml de solução NaOH de pH 7,6. A solução permaneceu sob borbulhamento de ar sob agitação branda, através de um agitador magnético, por 72hs em câmara fria, a 5°C. Durante o procedimento, a solução foi sempre mantida em pH entre 7,5 e 8,5.

A reação foi acompanhada em CLAE analítica, (cromatógrafo Shimadzu, empregando uma coluna de fase reversa SCL-10AVP C18 New column (150 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 1 a 50% de solvente B (A: água,

0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm). Nessa fase, observou-se a redução do primeiro pico (tempo de retenção: 6,978 minutos), referente à Histatina-5SC (monômero); e formação do segundo pico (tempo de retenção: 7,610 minutos), referente ao dímero da Histatina-5SC, de acordo com o quadro 2, abaixo.

Quadro 2: Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC, no Tempo 1 (acima) e Tempo 2 (abaixo). Nota-se o monômero da Histatina-5SC (pico à esquerda) e formação do dímero da Histatina-5SC (pico à direita).



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3. Avaliação da Atividade Antifúngica: Micro-organismos e Condições de Crescimento

Para avaliar a atividade antifúngica da solução de Histatina-5 (Hst-5) e de seus derivados estruturais Histatina-5GH e Histatina-5SC, foi utilizado o micro-organismo *C. albicans* (ATCC 90028). A espécie de *Candida* foi semeada em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, a 37 °C, por 48 horas. Em seguida, duas alçadas da levedura recém cultivada foram transferidas para o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) com 50 mM de glicose. A espécie cultivada foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos e lavada duas vezes com solução salina divisora de fosfato estéril (PBS -NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2) e agitada por 15 segundos. As células de *Candida* foram então re-suspensas em RPMI. As densidades ópticas da suspensão de *Candida* foram padronizadas na concentração de 1×10^7 células/ml para os testes de células planctônicas e de biofilmes (THEIN et al. 2007).

3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Células Planctônicas

A determinação da Mínima Concentração Inibitória (CIM) foi realizada em placas de cultura de 96 orifícios, de acordo com o protocolo recomendado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. Wayne (Penn): CLSI; M27-A3; 2008.). Os valores de CIMs foram determinados por incubação estática das suspensões do micro-organismo, por 24 horas a 37 °C, expostos ao contato com a solução de Histatina-5 e dos derivados, a qual é constituída pelo peptídeo concentrado e meio de cultura RPMI, em diferentes diluições (100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%). Após 24 horas de

contato, o valor da CIM foi determinado como a menor concentração da solução de Histatina-5 e dos demais peptídeos que inibiu o crescimento de micro-organismos observado pela turvação ou não do meio de cultura. A seguir, uma alíquota de cada orifício foi diluída e plaqueada para determinação da concentração mínima fungicida pela contagem do número de colônias viáveis. As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões distintas.

3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_b) das Células em Biofilme

Biofilmes de *Candida* foram formados em placas de cultura de 96 orifícios. Alíquotas de 200 µl das suspensões de *Candida* padronizadas foram transferidas para orifícios da placa de cultura e incubadas por 90 minutos (fase de adesão), a 37 °C, em um agitador orbital (75 rpm). Após esse período, os orifícios foram lavados cuidadosamente com 300 µL de PBS estéril. Em seguida, meio de cultura (RPMI), foi adicionado nos orifícios e mantido por 48 horas, em um agitador orbital (37 °C; 75 rpm), para desenvolvimento dos biofilmes. Após a formação dos biofilmes, a solução de cada peptídeo foi diluída (100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56; 0,78%) em solução salina divisora de fosfato estéril (PBS; NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2), obtendo-se, assim, várias concentrações da solução avaliada. Essas soluções foram mantidas em contato com os biofilmes formados por um período de 24 horas, a 37 °C. Após esse período, o valor da CIM_b foi determinado como a menor concentração da solução de Histatina-5 que inibiu o crescimento de biofilmes observado pelo ensaio de XTT e pela contagem do número de colônias viáveis. As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões distintas.

3.6. Ensaio de XTT

O ensaio de XTT foi realizado para avaliação do crescimento dos micro-organismos (células planctônicas e biofilmes) após contato com várias concentrações da solução de peptídeos avaliados. O XTT (sal amarelo) é reduzido, por enzimas presentes nas células metabolicamente ativas, em um produto solúvel em água – formazano, o qual é medido espectrofotometricamente. Para esse ensaio, a solução de XTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) foi preparada utilizando-se água ultra pura, a uma concentração de 1mg/ml e mantida a -70 °C até o momento dos experimentos. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes de cada experimento. A solução de XTT preparada em todos os experimentos consiste de PBS com 200 mM de glicose, solução de XTT previamente preparada e menadiona, na seguinte proporção: 158 µl, 40 µl; e 2 µl, respectivamente. Para os testes de CIM das células planctônicas, as suspensões de micro-organismos após contato com as soluções de Histatina-5, foram transferidas para microtubos e centrifugadas (5.000 x g por 2 min) para descarte do sobrenadante. Em seguida, a solução de XTT foi adicionada nos microtubos que foram então incubados, a 37°C, por 3 horas. Após esse período, alíquotas de 200 µl do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidas para orifícios de uma placa de cultura de 96 orifícios. Para os testes de CIM realizados em biofilmes, a solução de XTT foi preparada e adicionada nas próprias placas de 96 orifícios contendo os biofilmes. Essas placas foram então incubadas, a 37°C, por 3 horas. Os resultados da reação química do ensaio de XTT (absorbância) foram medidos utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 492 nm.

3.7. Contagem do Número de Colônias Viáveis

Para a quantificação das células, as placas de 96 orifícios utilizadas nos testes de adesão e formação de biofilme foram sonicadas em ultrassom para o desprendimento das células. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em solução salina estéril por meio da transferência de alíquotas de 100 µl da solução original. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas e quatro alíquotas de 10 µl de cada diluição foi semeada em uma placa de Petri contendo SDA. A seguir, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias digital e o número de colônias determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: $\text{UFC/ml} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 4) e q equivale à quantidade, em ml, semeada de cada diluição nas placas (0,010 ml = 10 µl).

3.8. Ensaios de Citotoxicidade dos Peptídeos Estudados

3.8.1. Cultura e Manutenção das Células

O efeito citotóxico da solução de Histatina-5 e dos derivados estruturais Histatina-5GH e Histatina-5SC, foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, fibroblastos de hamster (L929 – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP - Brasil) foram propagados em meio de cultura de DMEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂ (Costar, CorningIncorporated, Corning – NY – USA). Esses frascos foram incubados em estufa para cultura de células (Forma Scientific,

Marietta – OH – USA) com fluxo de 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de três dias de incubação, até que se procedesse ao teste de citotoxicidade. Para isso, foi colocado 1 ml de tripsina com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 ml foi colocado em novo frasco, sendo acrescentados 9 ml de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma pipeta graduada e um pipetador automático. Cada frasco foi, então, tampado e levado à estufa para a formação de nova confluência de células.

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e radiação ultravioleta. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

3.8.2. Quantificação das Células

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa colocando-se tripsina. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL e levada para centrifuga (Fanem Ltda, São Paulo – SP – Brasil), por 10 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/mL de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 µL foram retirados e adicionados a 90 µL de corante azul de Tripán (Merck -

Indústrias Químicas Rio de Janeiro – RJ – Brasil). Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg – Alemanha) onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Nikon – modelo YS 100, Tokyo – Japão) com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura para posterior utilização no teste de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.

3.8.3. Contato da Solução de Histatina-5 e demais derivados peptídicos com as células

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT que tem como princípio a redução do sal MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo), pela desidrogenase mitocondrial das células vivas (descrito a seguir). Posteriormente, as concentrações (IC₅₀) da Histatina-5 e demais derivados peptídicos, diluídas em meio de cultura, foram aplicadas diretamente sobre as células previamente cultivadas em placas de 24 compartimentos. Os extratos permaneceram em contato com as células pelo tempo adicional de 24 horas em incubadora, na temperatura de 37° C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Nas mesmas condições experimentais, compartimentos da placa contendo células e meio de cultura sem peptídeo foram utilizados como controle.

3.9. Avaliação da Atividade Mitocondrial (Teste MTT)

Por esta técnica, o sal MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo) é incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenasesuccínica das células viáveis reduzem o MTT, produzindo cristais de formazan cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em

espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior será a concentração do composto azul produzido e, assim, maior o número de células viáveis. Para a realização do teste, 100 µL da suspensão composta de $1,0 \times 10^5$ células/mL, foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 50 µl de meio de cultura novo foram colocados em cada orifício da placa juntamente com 50 µL da solução de Histatina-5 ou dos demais derivados peptídicos, sendo incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (análise em quadruplicata). Quatro orifícios da placa não receberam o extrato contendo solução de peptídeo e receberam apenas 100 µL de meio de cultura novo suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/mL de gentamicina (grupo controle negativo). Após o período de incubação de 24 horas, 10 µL de sal metiltetrazolium (MTT) foram adicionados a cada orifício da placa, a qual permaneceu incubada por um período de 3 horas, a 37°C, para a formação dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial. Em seguida, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada orifício da placa, a qual foi agitada levemente até ocorrer a dissolução dos cristais de formazan. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. É importante ressaltar, também, que todos os procedimentos foram realizados duas vezes em dias diferentes. Dessa forma, cada condição experimental ficou com um número de oito réplicas.

3.10. Killing Assay *Candida albicans*

Esse ensaio visa quantificar a morte de células de *Candida albicans* em condições desfavoráveis de crescimento contendo, por exemplo, agentes fungicidas como os peptídeos aqui estudados. Para isso, preparou-se solução estoque de cada peptídeo na concentração 2 mg/mL com tampão fosfato de potássio pH 7,0. Em uma microplaca adicionou-se 20 µL da solução estoque de cada peptídeo, em duplicata. Em seguida, diluiu-se os peptídeos com o mesmo tampão na proporção de 1:1, com auxílio de micropipeta multicanal.

Separadamente, em um tubo de ensaio, colocou-se a solução tampão usada na diluição dos peptídeos e, com uma alça de drigalski, adicionou-se o conteúdo do toque de 5 colônias de células de *Candida albicans* que estavam em incubação durante dois dias, a 30°C, em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD).

Após homogeneização da suspensão de células do tubo, adicionou-se 50 µL da suspensão de levedura nos pocinhos da microplaca contendo as soluções de peptídeos e nos controles. As placas são cobertas com plástico e tampa para evitar a evaporação e incubadas por 1 hora e meia, a 37°C.

Durante esse período, adicionou-se 9 mL de PBS (1L de tampão fosfato de potássio 10 mM e 9 g NaCl) em 48 tubos de ensaio esterilizados e nos tubos controle.

Após o período de incubação, pipetou-se 50 µL de cada poço da microplaca no tubo correspondente, devidamente numerado, contendo 9 mL de PBS estéril e agitou-se no vortex. Em seguida, pipetou-se 25 µL de cada tubo nas placas de ASD correspondentes espalhando as células pelas placas com uma bagueta de vidro. Cada placa foi incubada em estufa por 48 hs, a 30°C.

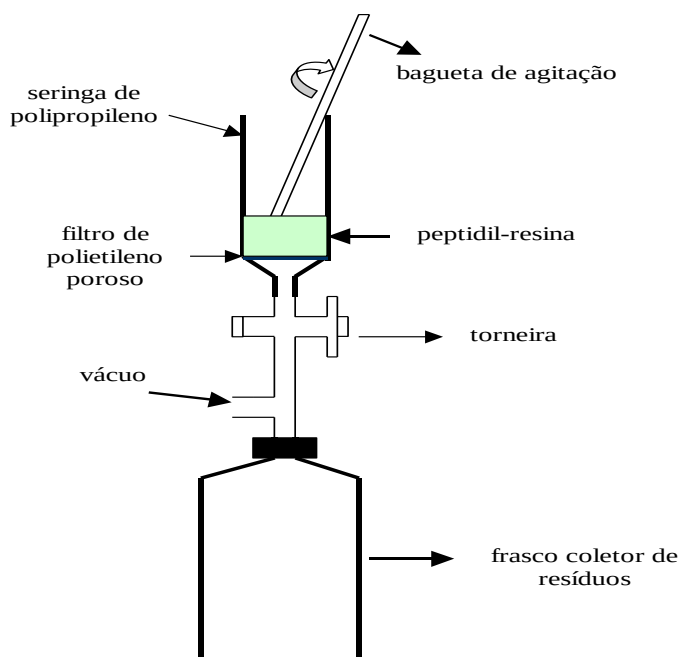
Em seguida, fez-se a contagem das células em cada placa. A porcentagem de viabilidade celular é determinada comparando o número de células viáveis nas placas com a média do número de células presente em três controles positivos de crescimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. *Síntese, purificação e caracterização da Histatina-5 e seus análogos peptídicos*

A síntese da Histatina-5 e seus análogos peptídicos foram realizados pelo método de Síntese Orgânica em Fase Sólida, de acordo com a metodologia descrita no item 3.1. E a clivagem de cada um deles também ocorreu conforme descrito nesse mesmo item. O sistema utilizado para a síntese de peptídeos, assim como para o acoplamento de CF está esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Figura representativa do sistema utilizado para a síntese orgânica em fase sólida e clivagem dos análogos peptídicos.



Fonte: Garrido (2007).

Partiu-se de 250mg de resina: Fmoc-Tyr-Wang (tbu), Nova Biochem, com grau de substituição inicial de 0,76mmol/g e escala de 3 equivalentes de excesso molar (0,57mmol), para a síntese de cada análogo peptídico.

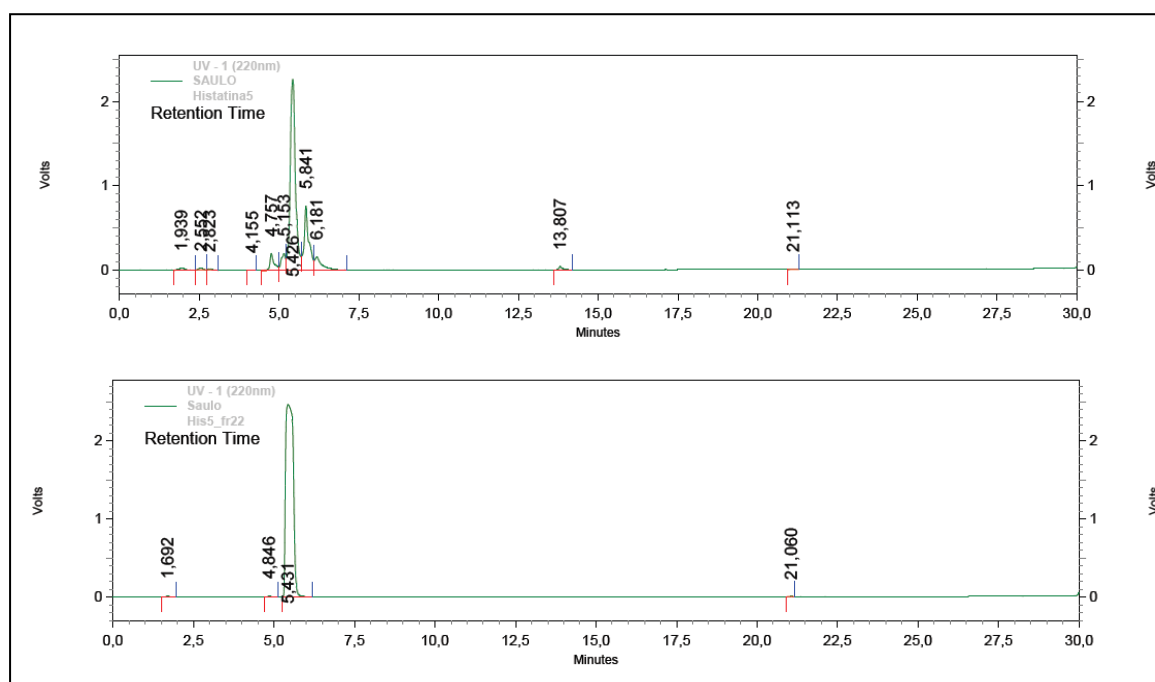
- Histatina-5: houve um ganho de massa de 0,9100 g, o que corresponde a uma massa final de 1,1600 g de peptidil-resina.
- Histatina-5': utilizou-se 200 mg da Histatina-5 para o acoplamento de carboxifluoresceína, a qual foi posteriormente clivada.
- Histatina-5GH: houve um ganho de massa de 0,8027 g, o que corresponde a uma massa final de 1,0527 g de peptidil-resina. Foi utilizado 500 mg de Histatina-5GH para a clivagem.
- Histatina-5GH': utilizou-se 200 mg da Histatina-5GH para o acoplamento de carboxifluoresceína, a qual foi posteriormente clivada.
- Histatina-5SC: houve um ganho de massa de 0,8590 g, o que corresponde a uma massa final de 1,1090 g de peptidil-resina. Foi utilizado 500 mg de Histatina-5SC para a clivagem.
- Histatina-5SC': utilizou-se 300 mg da Histatina-5SC para o acoplamento de carboxifluoresceína, a qual foi posteriormente clivada.

Os produtos obtidos do processo de clivagem foram liofilizados e posteriormente analisados por CLAE em escala analítica, nas condições descritas no item 3.1., a fim de se obter o perfil dos peptídeos no estado bruto.

Basendo-se no tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise por CLAE foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa (CLME), coletando-se as frações correspondentes a cada peptídeo. Tais frações foram analisadas novamente

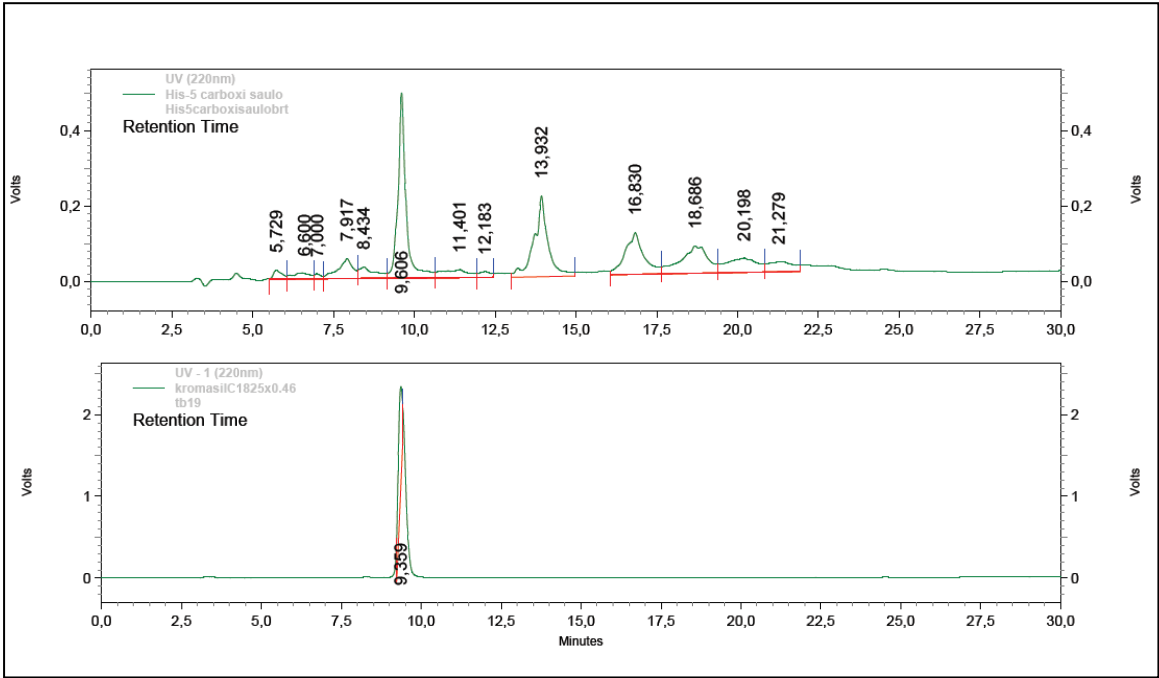
em escala analítica, nas mesmas condições, a fim de se juntar aquelas frações que representavam os peptídeo correspondentes; o objetivo dessa etapa é obter os peptídeos no estado mais puro possível. Os gráficos que representam as cromatografias desta etapa de purificação estão representados nos Quadros 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Quadro 3. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5, bruto (acima) e após purificação (abaixo).



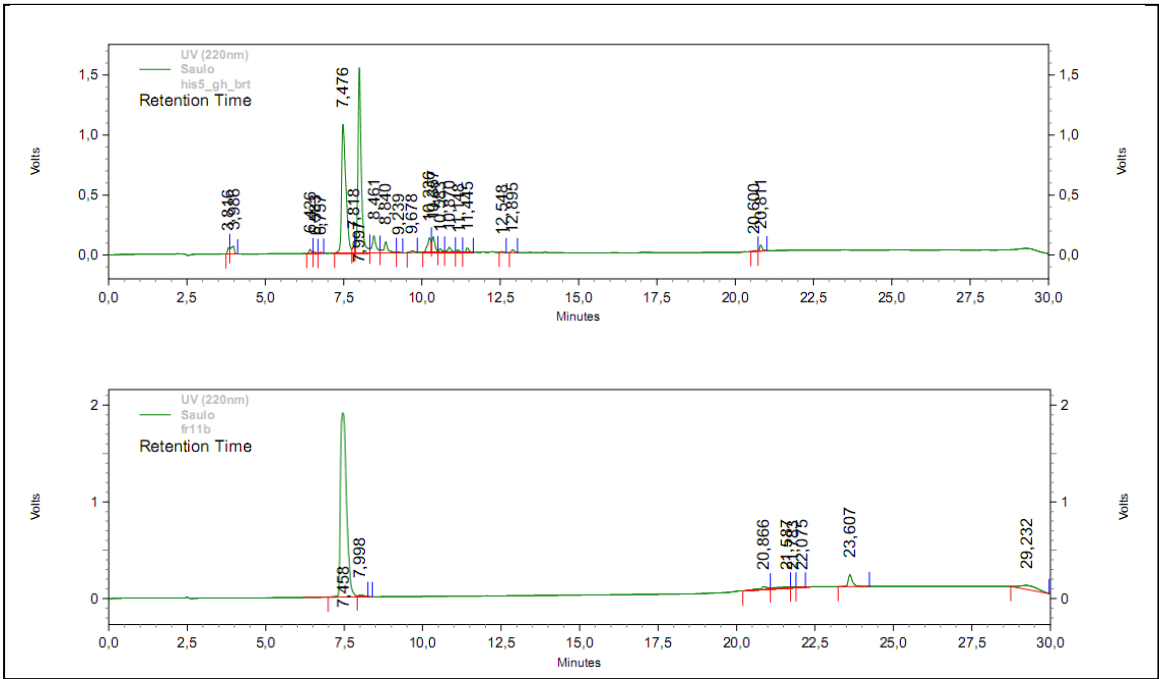
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 4. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5', bruto (acima) e após purificação (abaixo).



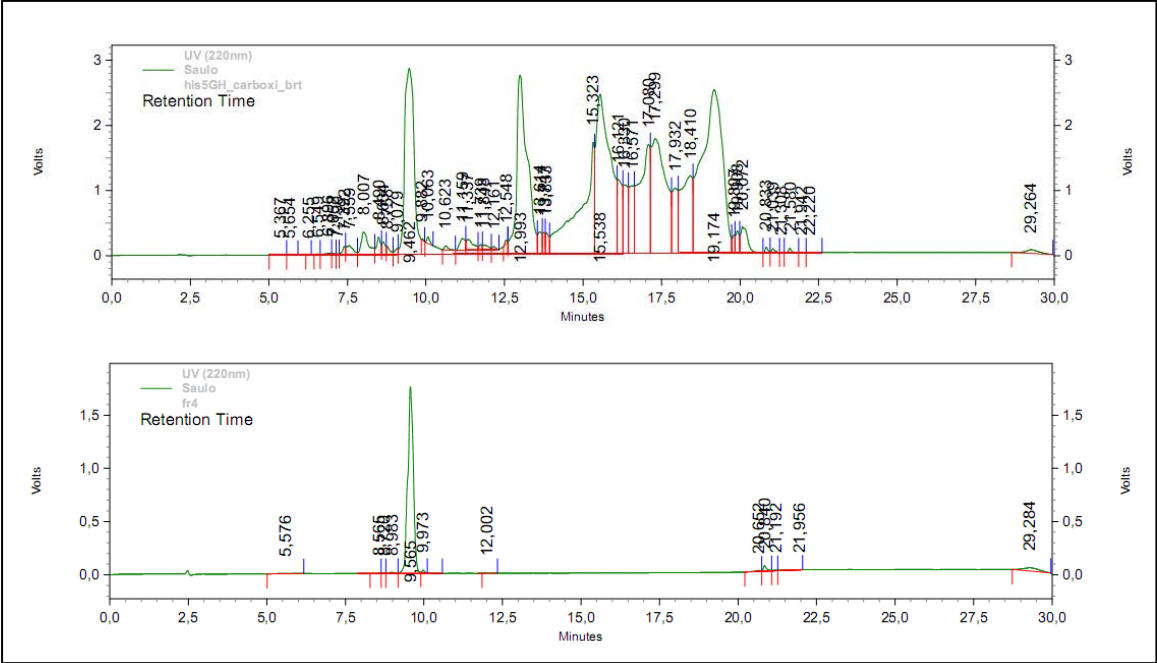
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5GH, bruto (acima) e após purificação (abaixo).



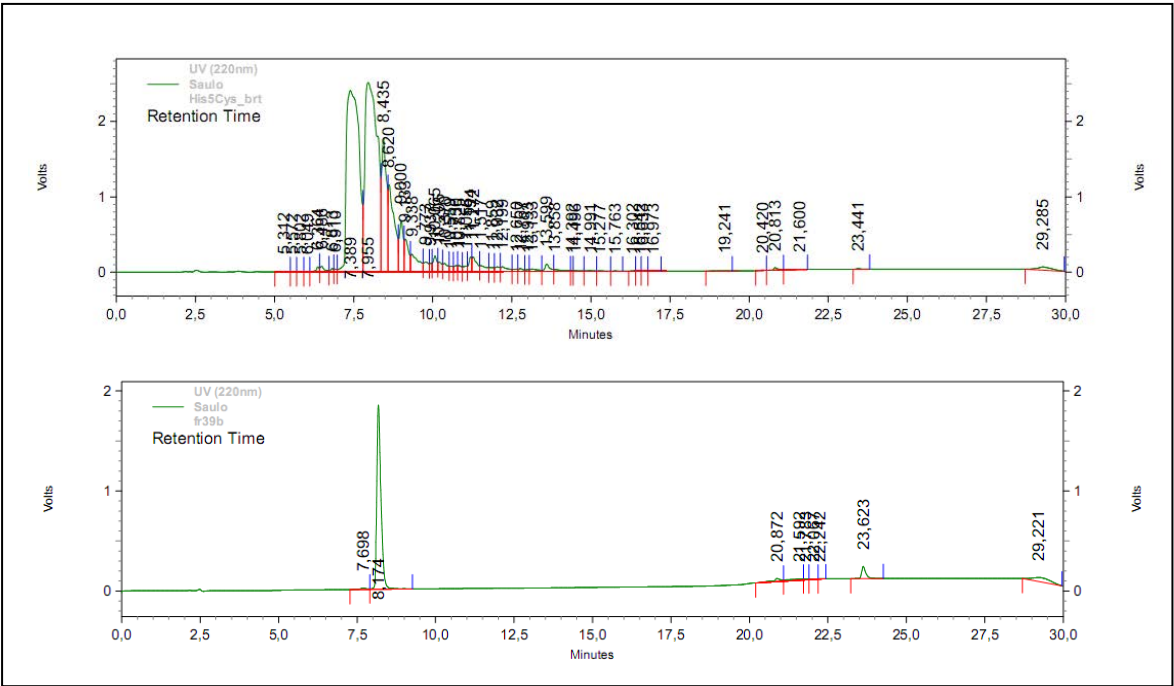
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 6. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5GH¹, bruto (acima) e após purificação (abaixo).



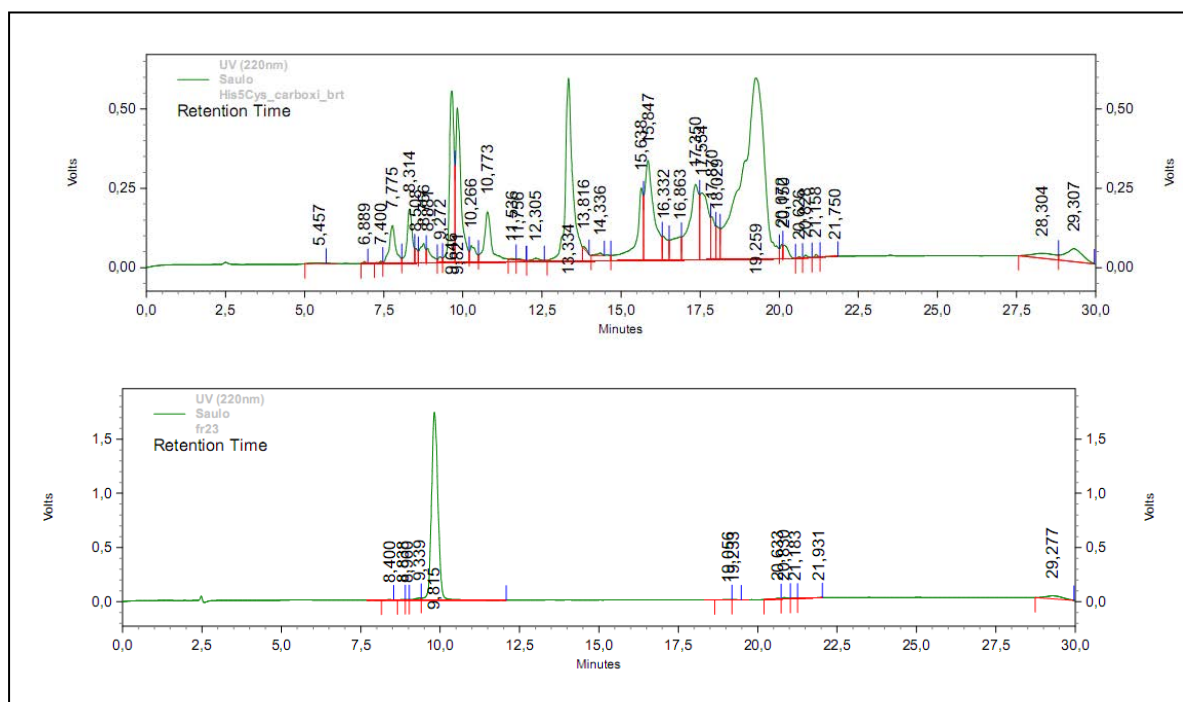
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 7. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC, bruto (acima) e após purificação (abaixo).



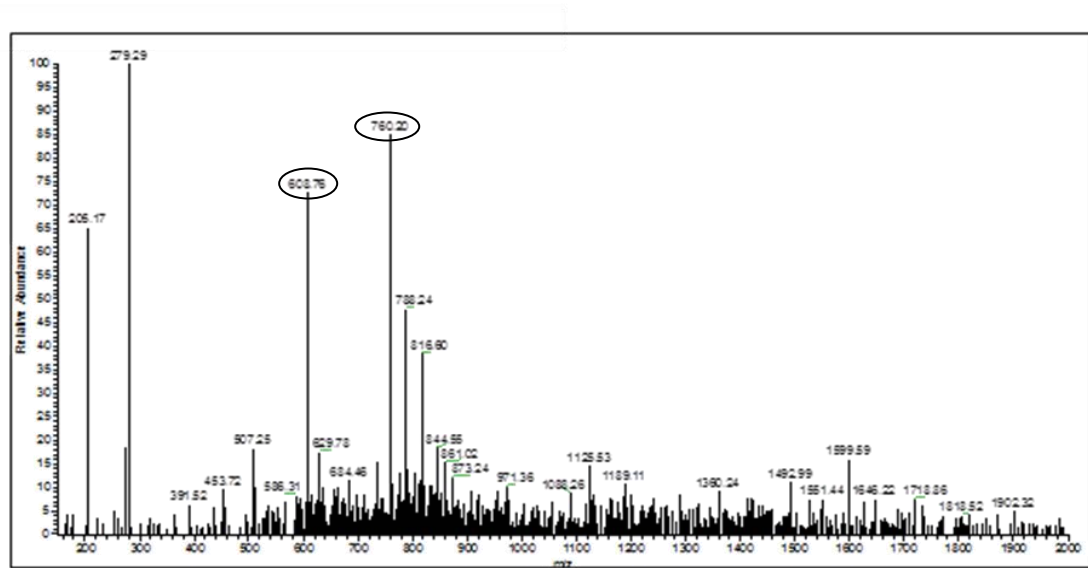
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 8. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo Histatina-5SC', bruto (acima) e após purificação (abaixo).

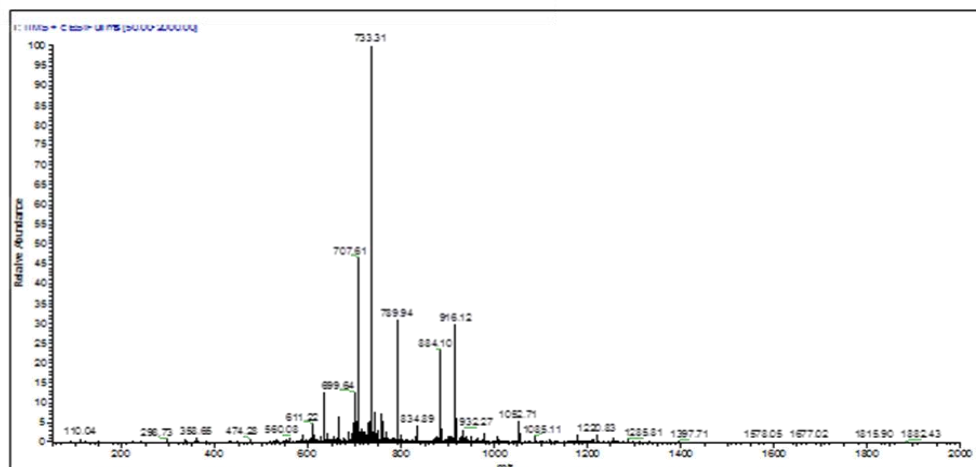


Fonte: Elaborado pela autora.

A Histatina-5 e seus análogos peptídicos foram caracterizados, após purificação, por determinação da massa molecular dos mesmos, empregando-se espectrometria de massas (ES-MS positivo) por injeção direta da amostra. O objetivo dessa etapa consiste em verificar se cada fração isolada no processo de purificação corresponde de fato ao peptídeo de interesse. Os espectros de massas para cada um dos peptídeos caracterizados são apresentados nos Quadros 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

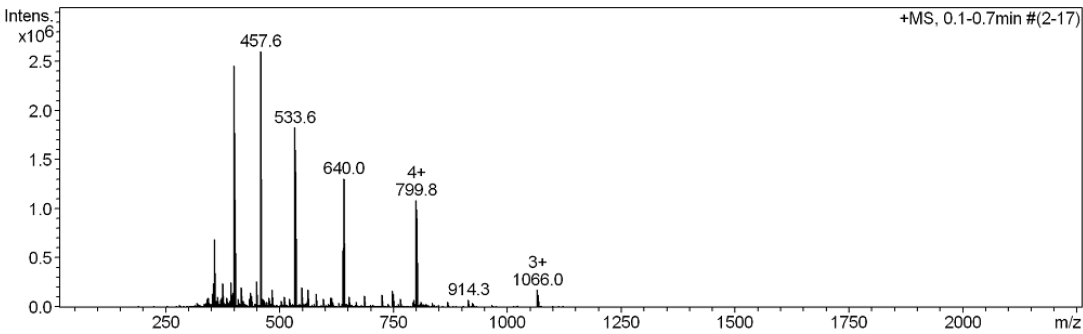
Quadro 9. Espectro de massas da Histatina-5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 10. Espectro de massas da Histatina-5'.

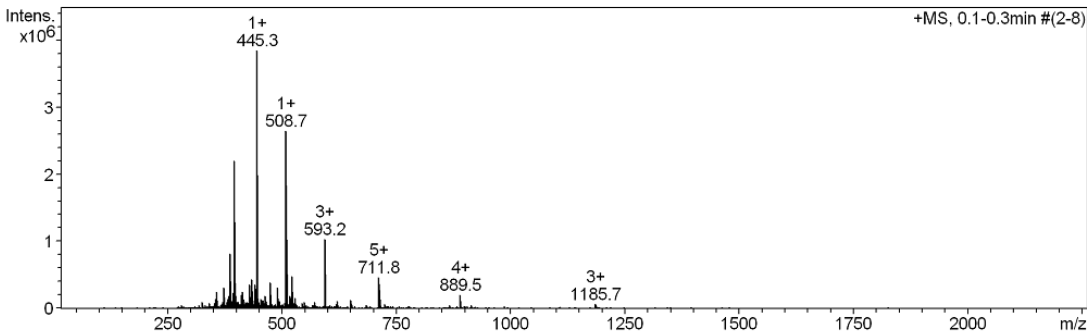
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 11. Espectro de massas da Histatina-5GH.



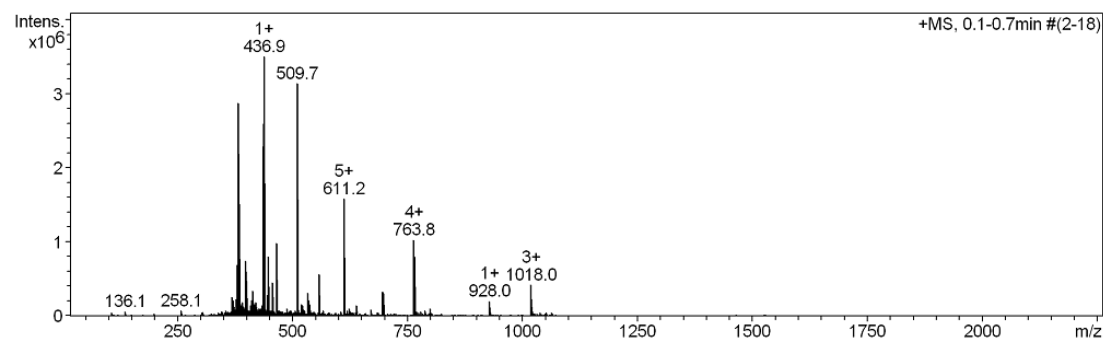
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 12. Espectro de massas da Histatina-5GH'.



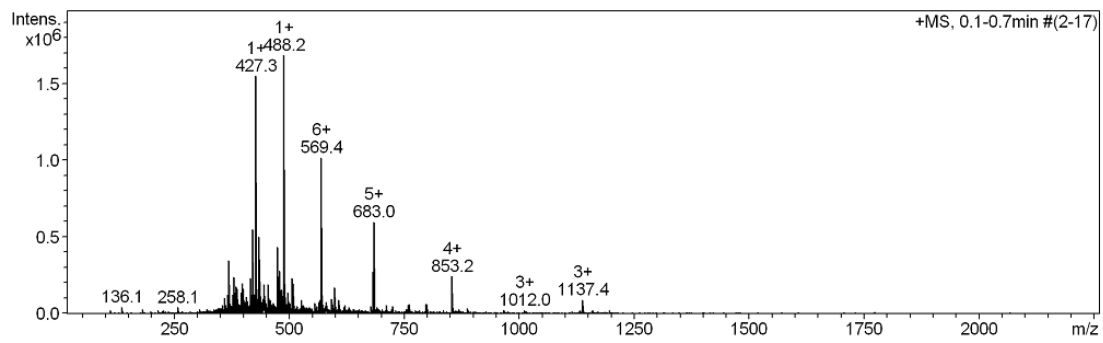
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 13. Espectro de massas da Histatina-5SC.



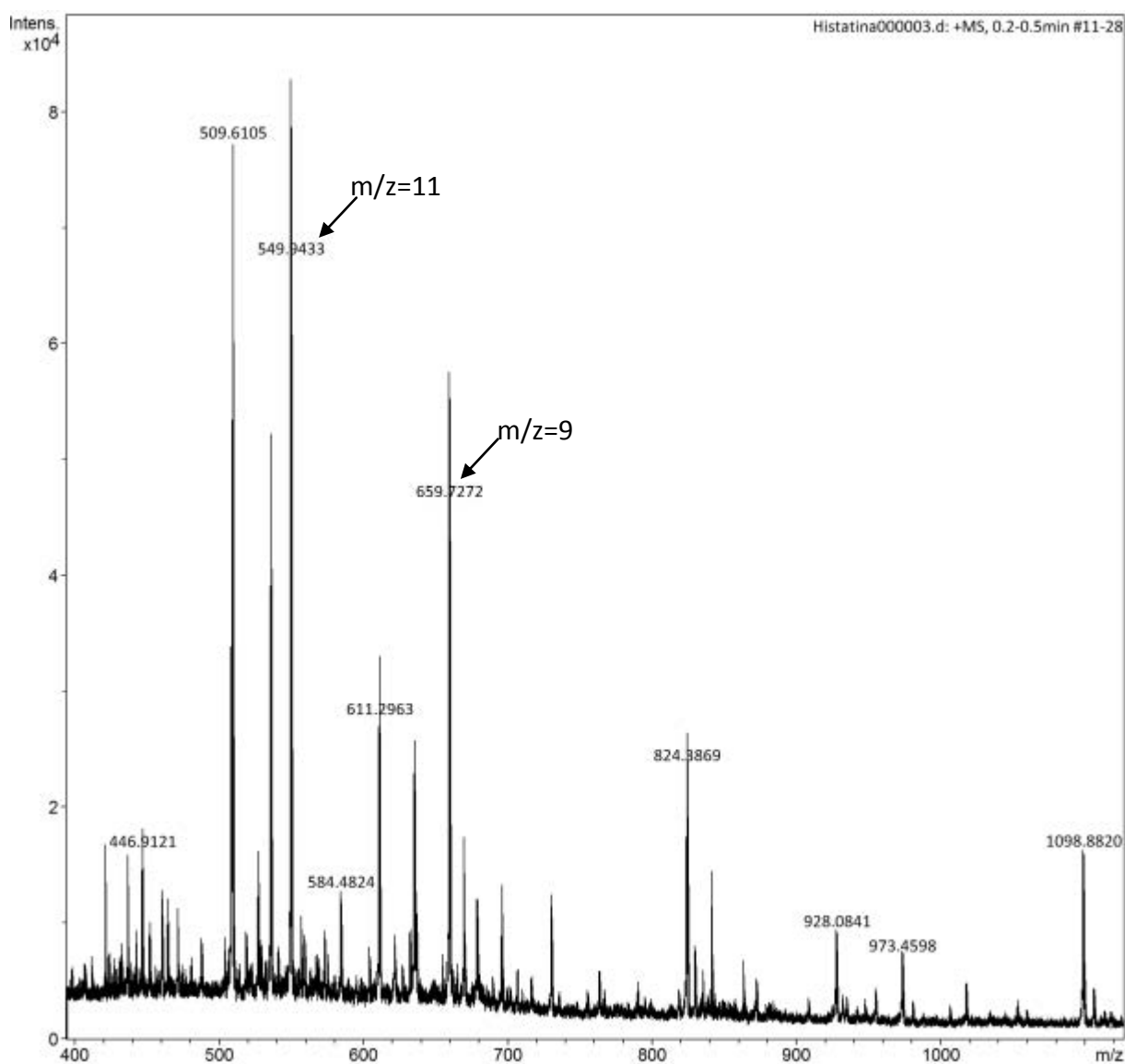
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 14. Espectro de massas da Histatina-5SC'.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 15. Perfil do espectro de massas do peptídeo Histatina-5SC dímero. Os picos em destaque são referentes a a $M/Z=11$ e $M/Z=9$ da massa do peptídeo ($6102,8 \text{ g.mol}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora.

Para exemplificar a aplicação desta técnica para caracterização dos peptídeos, utilizaremos o Quadro 9 que corresponde ao espectro de massas da Histatina-5. No quadro são destacados os picos correspondentes às frações de número de massa (relação massa/carga, ou m/z) da Histatina-5. O Peso Molecular (PM) da Histatina-5 corresponde a 3036,29, portanto os picos em destaque correspondem, respectivamente, a $m/z=5$ e $m/z=4$. Dessa forma, se dividirmos o PM

pelas frações de massa, obteremos os valores correspondentes aos indicados nos picos.

Sendo assim, podemos observar na Tabela 1 os valores correspondentes aos pesos moleculares teóricos de cada um dos análogos peptídicos e os obtidos por espectrometria de massas.

Tabela 1. Pesos moleculares teóricos e obtidos por espectrometria de massas dos análogos peptídicos sintetizados. Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, UNESP-Araraquara. Realizada em 26 de Novembro de 2013.

Análogo peptídico	Massa molecular teórica (g/mol)	ES m/z (MW)
Histatina-5	3036,33	3040,8
Histatina-5'	3665,65	3666,5
Histatina-5GH	3196,51	3199,2
Histatina-5GH'	3554,83	3559,0
Histatina-5SC	3058,47	3058,2
Histatina-5SC'	3416,79	3417,4

Fonte: Elaborado pela autora.

Como pode ser observado, os valores obtidos por espectroscopia de massas muitas vezes podem variar com os valores teóricos. Este fato está associado à presença de prótons disparado pelo equipamento (modo eletrospray positivo) para a fragmentação da molécula e consequente análise do peso molecular deste fragmento. Nestes casos, as massas desses prótons, que corresponde a 1, são somadas ao peso molecular do fragmento analisado.

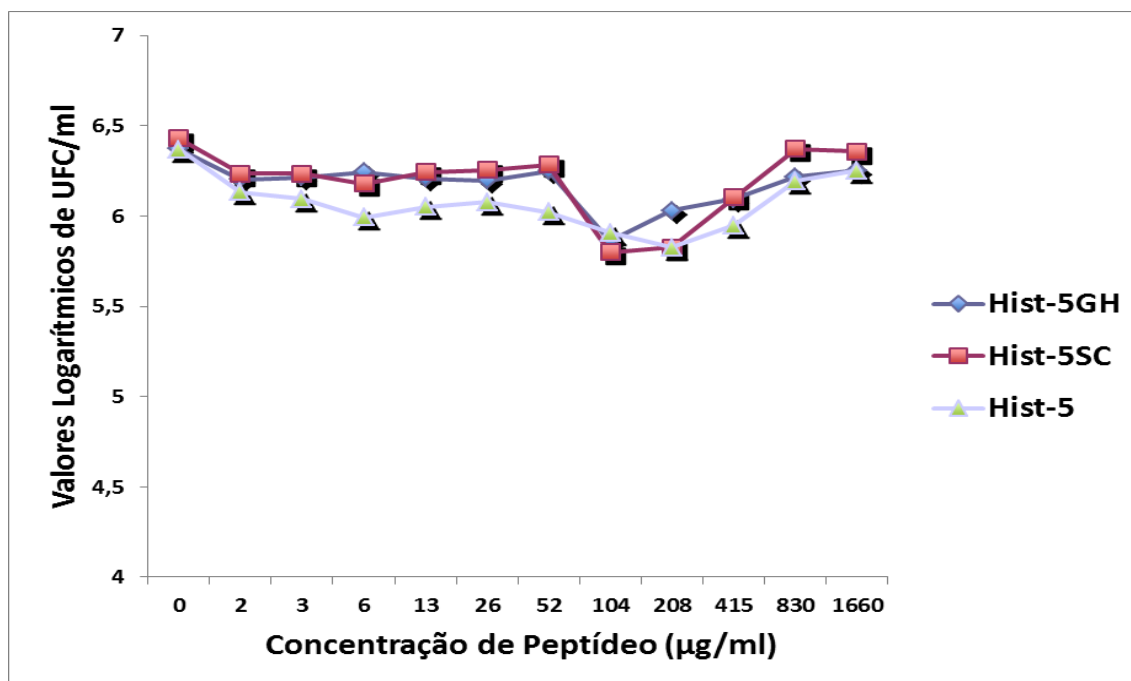
De acordo com os resultados obtidos no espectrômetro de massas, pode-se comprovar o sucesso da síntese e purificação da Histatina-5 e seus análogos peptídicos.

4.2. Avaliação da Atividade Antifúngica

É possível observar nos resultados apresentados no Quadro 16, que a atividade antifúngica que a Histatina-5 e os derivados estruturais Histatina-5GH e Histatina-5SC não apresentam considerável inibição de crescimento das células de *Candida albicans* até uma concentração de 52 µg/ml, uma vez que manteve-se relativamente constante com relação aos Valores Logarítmicos de UFC/mL. Por outro lado, no intervalo de concentração entre 52 - 208 µg/mL de cada um dos peptídeos estudados nota-se uma queda significativa na viabilidade das células de *Candida albicans*, que vai de $\log_{10}$ 6,25 UFC/mL a $\log_{10}$ 5,86 UFC/mL para Histatina-5; e de $\log_{10}$ 6,28 UFC/mL a $\log_{10}$ 5,79 UFC/mL para Histatina-5GH e Histatina-5SC.

Em concentrações maiores de cada peptídeo, observa-se novamente a ineficiência no controle de crescimento do micro-organismo. Este fato pode ser explicado pelo aumento da insolubilidade dos peptídeos, quando em concentrações elevadas, no meio de cultura complexo utilizado no ensaio.

Quadro 16. Ensaio de atividade de crescimento de *Candida albicans* na presença de diferentes concentrações dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC.



Fonte: Moffa (2013).

Mesmo com as modificações estruturais propostas neste estudo, não foi possível notar um aumento significativo de potencial antifúngico dos análogos estruturais da Histatina-5, comparado com a molécula nativa. Mesmo com o aumento da carga positiva efetiva do análogo Histatina-5GH, o mesmo demonstrou uma grande semelhança no controle de crescimento de *Candida albicans*.

No caso do análogo Histatina-5SC, mesmo a cisteína sendo um aminoácido mais polar que a serina original, esta diferença de polaridade não foi suficiente para um ganho de eficiência antifúngica. No entanto, esperamos que a forma dimérica deste peptídeo, apresente um potencial diferenciado em tal atividade.

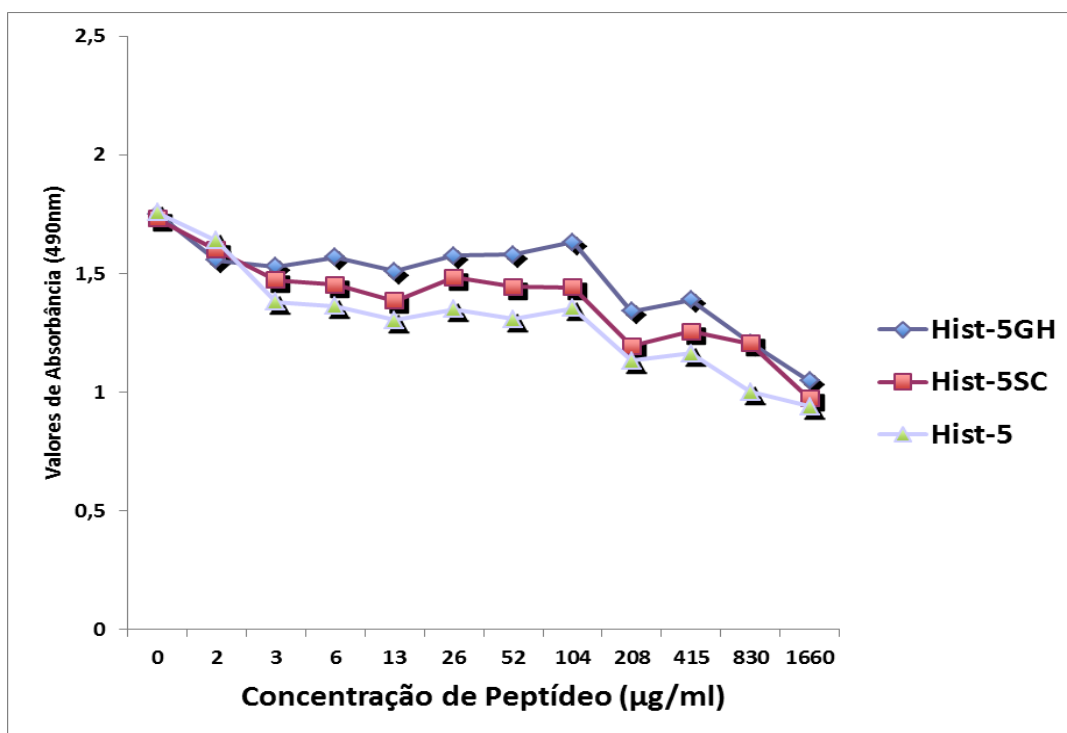
4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Células Planctônicas

Os resultados apresentados no Quadro 17 mostram que a concentração inibitória mínima para os três peptídeos em estudo foi de 104 µg/mL. A partir desta concentração, observa-se uma diminuição da absorbância do meio, indicando a diminuição de crescimento celular em função da presença dos inibidores.

É possível notar ainda que na faixa de concentração de peptídeo que vai de 104 – 208 µg/mL, todos os peptídeos testados conseguem reduzir o crescimento de mais 50% das células planctônicas, quando comparamos os valores de absorbância atingidos neste intervalo de concentração com a absorbância na ausência de inibidor. É exatamente nesta faixa de concentração que os peptídeos apresentaram máxima atividade antifúngica (Quadro 17).

No entanto, os resultados demonstram que as modificações estruturais propostas não apresentaram melhoras significativas comparadas ao peptídeo Histatina-5. Vale ressaltar que mesmo não apresentando melhores resultados em relação a CIM, o peptídeo Histatina-5GH apresentou uma melhor solubilidade nas concentrações testadas, o que é uma boa característica para aplicação como fármaco na cavidade oral.

Quadro 17. Gráfico dos resultados do ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC, no crescimento de células planctônicas.



Fonte: Moffa (2013).

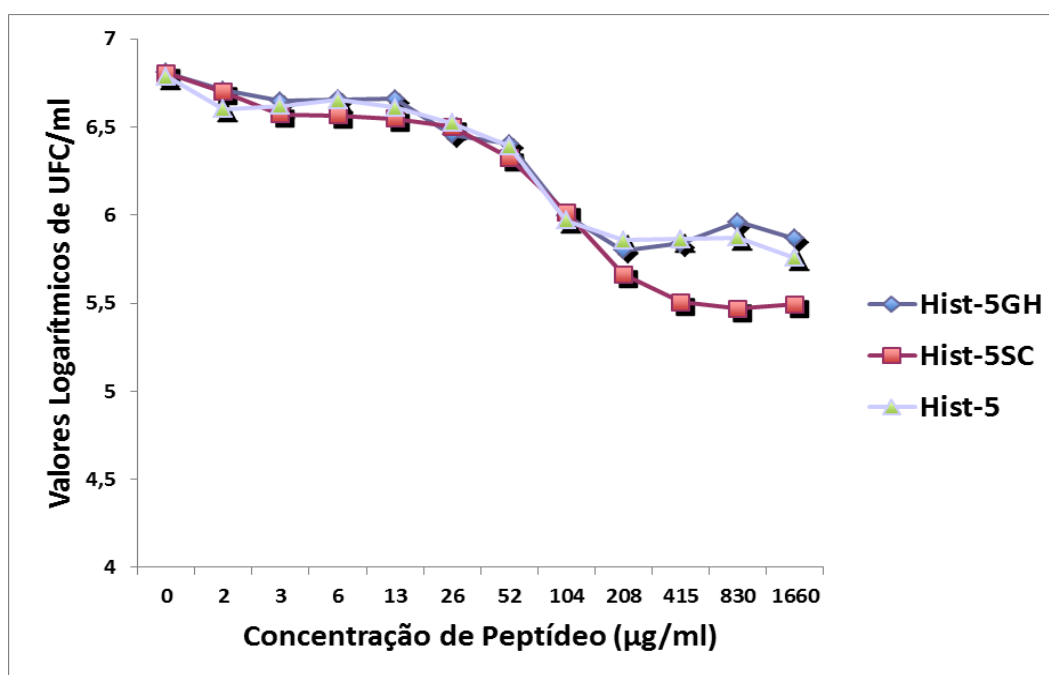
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_b) das Células em Biofilme

Este ensaio permite avaliar o real potencial de ação antifúngica dos peptídeos estudados, já que os mesmos são colocados em contato com biofilme de *Candida albicans*, assim como ocorreria em um possível tratamento de candidose bucal provocada por este micro-organismo. Foi possível observar (Quadro 18) que a partir da concentração de 52 µg/mL dos três peptídeos em estudo houve uma significativa inibição do crescimento das células constituintes do biofilme de *Candida albicans*.

O análogo Histatina-5SC mostrou um ligeiro acréscimo na eficiência de inibição de crescimento das células de biofilme, atingindo o valor de $\log_{10}$ 5,86 UFC/mL a partir de uma concentração de 415 µg/mL. Acredita-se que os resultados

para o dímero desse análogo peptídico possa atingir resultados ainda mais promissores, comparado ao peptídeo original Histatina 5.

Quadro 18. Gráfico dos resultados do ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_b) das células de biofilme de *Candida albicans* em contato com soluções dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC em diferentes concentrações.



Fonte: Moffa (2013).

4.5. Ensaios de XTT em Células de Biofilme

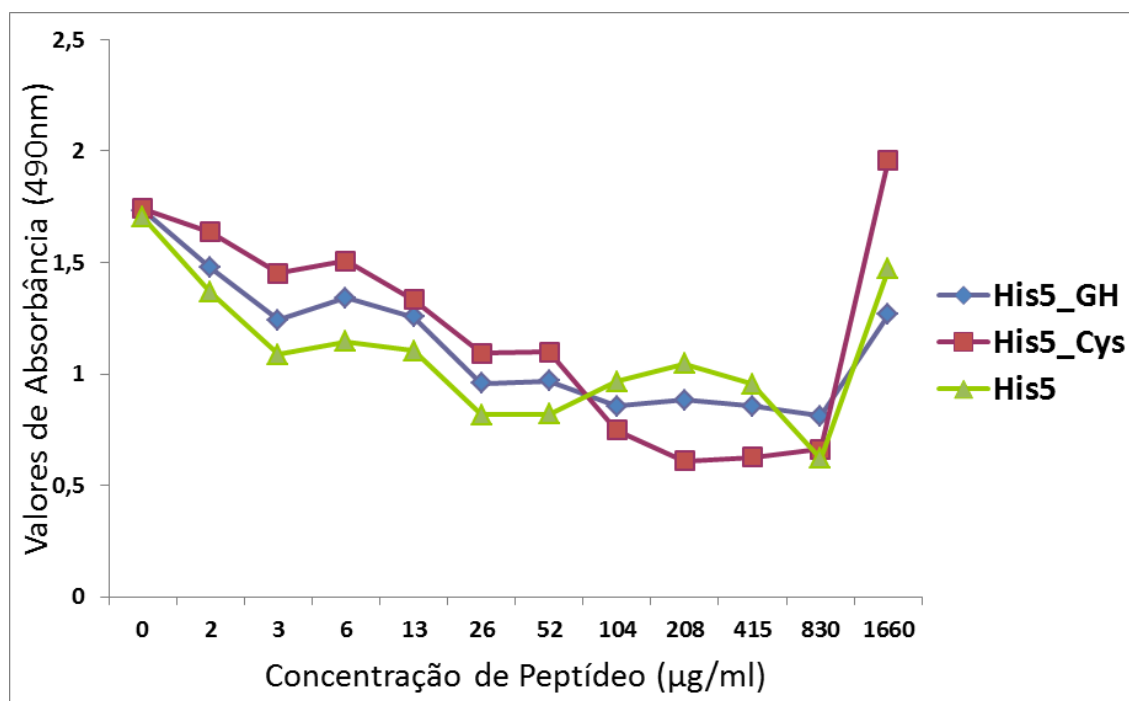
O ensaio de XTT foi realizado para uma segunda avaliação do crescimento dos micro-organismos presentes em biofilme de *Candida albicans* após contato com os peptídeos estudados em diferentes concentrações. O XTT (sal amarelo) é reduzido, por enzimas presentes nas células metabolicamente ativas, em um produto solúvel em água (formazano), o qual é medido espectrofotometricamente. Sendo assim, quanto maior o valor de absorbância relativo ao formazano, maior será o número de células viáveis. Dessa forma, se os peptídeos atuarem como agentes

antifúngicos, espera-se encontrar uma redução dos valores de absorbância, comparado aos controles de crescimento positivo (micro-organismo na ausência dos peptídeos).

Através da análise do Quadro 19, todos os peptídeos apresentaram significativa inibição do crescimento das células presentes no biofilme de *Candida albicans*, a partir de 26 µg/mL. Novamente, o análogo Histatina-5SC apresentou um resultado ligeiramente melhor em concentrações superiores a 104 µg/mL. Comparado com o controle positivo de crescimento, cuja absorbância relativa ao XTT foi de 1,7404 (valor médio da triplicata), o valor obtido para a concentração de 208 µg/mL para este análogo foi de 0,6103, representando uma inibição do crescimento do micro-organismo na ordem de 65%, valor este bastante interessante. Esta observação também reforça a hipótese do dímero deste análogo peptídico ser bastante promissor.

Em concentrações próximas a 1660 µg/mL, não houve inibição de crescimento das células do biofilme para nenhum peptídeo testado. Este fato é explicado devido aos peptídeos mostrarem-se insolúveis no meio em que o ensaio foi realizado, em elevadas concentrações.

Quadro 19. Gráfico dos resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com soluções dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC em diferentes concentrações.



Fonte: Moffa (2013).

4.6. Avaliação da Atividade Mitocondrial (Teste MTT)

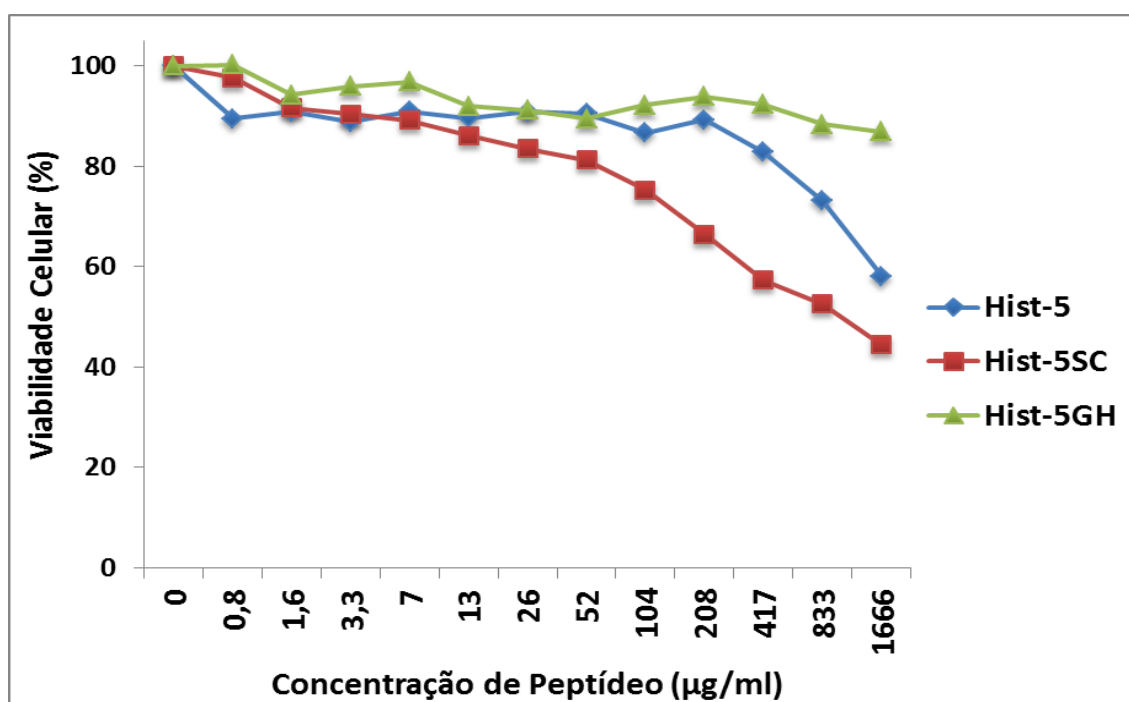
Este tipo de análise é realizado para testar a citotoxicidade de cada composto estudado frente a células eucarióticas. Para isso, o ensaio realizado utilizou fibroblastos de hamster, conforme protocolo descrito no item 3.9. Pela avaliação dos resultados apresentados no Quadro 20, de uma maneira geral, os três peptídeos não demonstraram efeito citotóxico acentuado, mantendo a viabilidade celular acima de 90% até uma concentração de 104 µg/mL.

O análogo Histatina-5GH manteve-se atóxico inclusive em altas concentrações, o que é uma característica relevante para um possível fármaco. Por outro lado, o análogo Histatina-5SC apresentou citotoxicidade acentuada em

concentrações superiores a 104 µg/mL, característica também observada para a Histatina-5.

De maneira geral, podemos concluir que na faixa de concentração entre 104 e 208µg/mL, todos os peptídeos não demonstraram citotoxicidade acentuada a células eucarióticas, o que é uma característica relevante para aplicação como fármaco. É importante ressaltar que nesta faixa de concentração, os peptídeos também apresentaram excelente atividade antifúngica em *Candida albicans*.

Quadro 20. Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC frente a fibroblastos de hamster (teste MTT).



Fonte: Moffa (2013).

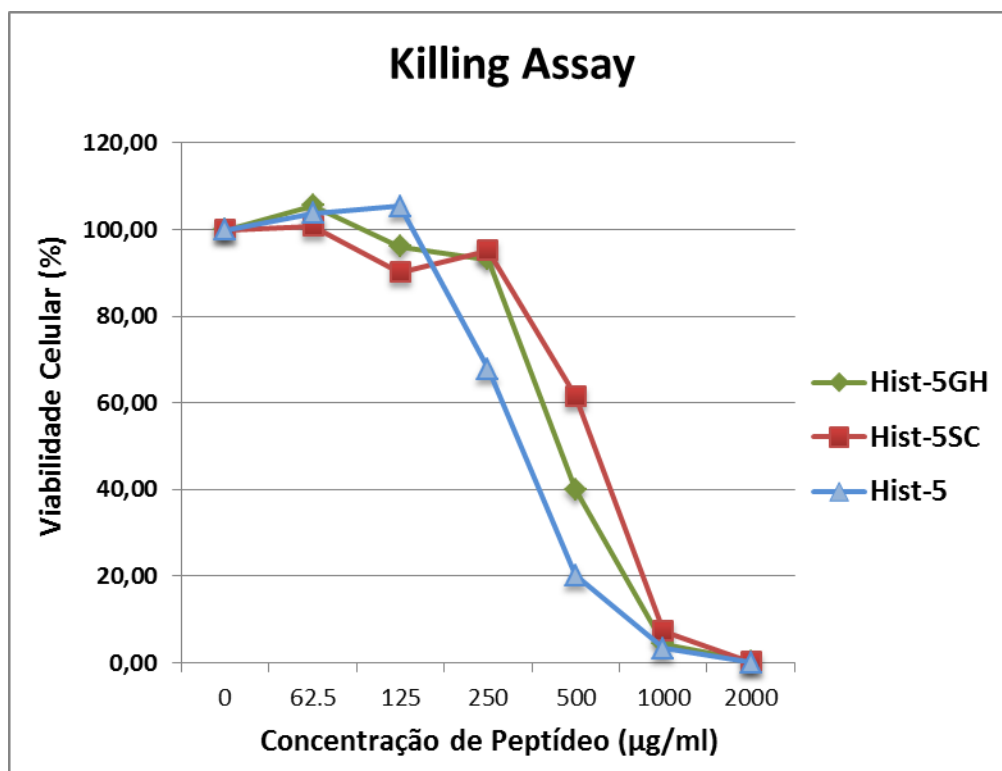
4.7. Killing Assay *Candida albicans*

O ensaio de potencial Killing visa analisar a viabilidade de crescimento celular de *Candida albicans* em condições desfavoráveis de crescimento, ou seja, na presença dos peptídeos estudados, conforme procedimento descrito no item 3.10.

No Quadro 21 foram plotados os resultados de viabilidade celular em função de diferentes concentrações de cada um dos peptídeos, sendo possível notar que a partir da concentração de 250 µg/mL todos possuem a capacidade real de diminuir significativamente a viabilidade celular.

Para Histatina-5 a 500 µg/mL, a viabilidade celular foi reduzida em cerca de 80%. Os análogos Histatina-5GH e Histatina-5SC apresentaram resultados ligeiramente inferiores, quando comparados com a Histatina-5 nativa, no que se refere à diminuição da viabilidade celular nesta faixa de concentração. No entanto, podemos notar que, em concentrações mais elevadas, todos os peptídeos puderam reduzir em quase 100% a viabilidade de *Candida albicans*.

Quadro 21. Gráfico do ensaio do potencial Killing dos peptídeos Histatina-5, Histatina-5GH e Histatina-5SC frente a culturas de *Candida albicans*.

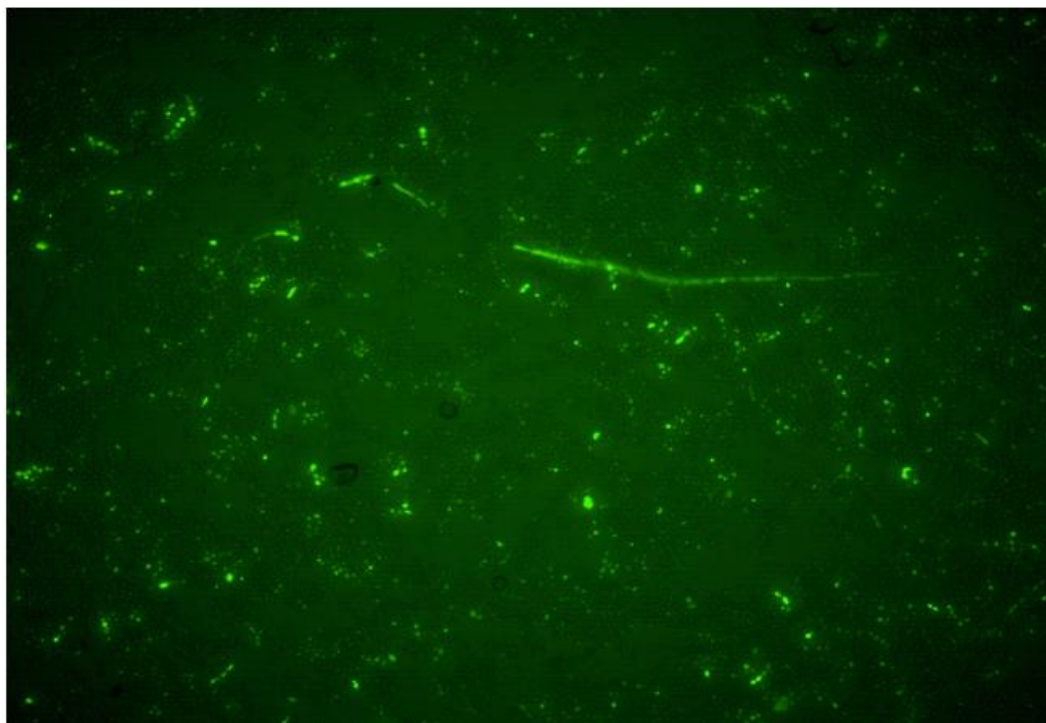


Fonte: Moffa (2013).

Um ensaio adicional foi realizado para verificar se os peptídeos estudados estavam exercendo sua função fisiológica de permear a parede celular da *Candida albicans*, chegando ao alvo de sua ação, a mitocôndria. Para isto, utilizamos o análogo peptídico Histatina-5' que possui em sua estrutura um marcador de fluorescência, a 6-carboxi-fluoresceína, que foi acoplado ao aminoácido N-terminal.

A Histatina-5 marcada com fluorescência, a 6-carboxi-fluoresceína, foi observada no interior de blastósporos e hifas do micro-organismo *Candida albicans* (Figura 6), através de microscópio de fluorescência (InCell Analyzer 2000 – GE Health Care Bio-Sciences), o que comprova a habilidade fisiológica desse peptídeo em permear a parede celular da *Candida albicans* e alcançar a mitocôndria, seu principal alvo de ação.

Figura 6. Imagem de Histatina-5 no interior de blastósporos e hifas de *Candida albicans*, obtida por microscópio de fluorescência (InCell Analyzer 2000 – GE Health Care Bio-Sciences).



Fonte: Moffa (2013).

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a Histatina-5 é capaz de inviabilizar as células de *Candida albicans*, comprovando o que a literatura afirma acerca desse peptídeo naturalmente presente na saliva humana.

Os resultados apresentados nesse projeto abrem perspectivas para o estudo de novos protótipos, Histatina-5GH e Histatina-5SC, uma vez que esses análogos demonstraram características relevantes no que diz respeito à solubilidade e ao potencial antifúngico, respectivamente.

Espera-se que a Histatina-5SC dímero apresente resultados ainda mais expressivos, apresentando maior potencial terapêutico, reduzida indução de resistência nos micro-organismos, menor toxicidade e consequentemente menos efeitos adversos, de forma a garantir maior adesão ao tratamento pelos indivíduos acometidos pela candidose bucal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods Mol. Biol**, v. 298, p. 3-24, 2005.

AMBROGGIO, E. E.; SEPAROVIC, F.; BOWIE, J. H.; FIDELIO, G. D.; BAGATOLLI L. A. Direct visualization of membrane leak age induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. **Biophys J**, v. 89, n. 3, p. 1874–188, 2005.

BAEV, D.; LI, X. S.; DONG, J.; KENG, P.; EDGERTON, M. Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*. **Infect. Immun**, n. 70, p. 4777-4784, 2002.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST Rev**, v. 22. n.1, p. 22-38, 2010.

BREWER, D.; LAJOIE, G. Evaluation of the metal binding properties of the histidine-rich antimicrobial peptides histatin 3 and 5 by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass. Sp.**, v. 14, p. 1736-1745, 2000.

CABRAS, T.; PATAMIA, M.; MELINO, S.; INZITARI, R.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; PETRUZZELI, R. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 358, p. 277-284, 2007.

CASTRO, M. S.; CILLI, E. M.; FONTES, W. Combinatorial synthesis and Directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. **CurrProteinPeptSci**, v. 7, n. 6, p. 473–478, 2006.

DEMPSEY, C. E.; UENO, S.; AVISON, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimer-ized magainin analogue. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 402-409, 2003.

DENNINSON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes. **Biophys Chem**, v. 127, n. 1–2, p. 78–83, 2007.

DEWAN, P. C.; Anantharaman, A.; CHAUHAN, V. S.; SAHAL, D. Antimicrobial action prototypic amphiphathic cationic decapeptides and their branched dimers. **Biochemistry**, v. 48, n. 24, p. 5642-5657, 2009.

EPAND, R. F.; MALOY, L.; RAMAMOORTHY, A.; EPAND, R. M. Amphipathic helical cationic antimicrobial peptides promote rapid formation of crystalline estates in the presence of phosphatidylglycerol: lipid clustering in anionic membranes. **Biophys J**, v. 98, n. 11, p. 2564–2573, 2010.

FERNANDEZ, D. I.; GEHMAN, J.D.; SEPAROVIC, F. Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 8. p. 1630–1638, 2009.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino acids. **Int. J. Pept. Prot. Res**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

GARHAMMER, P.; HILLER, K. A.; REITINGER, T.; SCHMALZ, G. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. **Clin. Oral Invest**, v. 8, p. 238-242, 2004.

HARA, T.; KODAMA, H.; KONDO, M.; WAKAMATSU, K.; TAKEDA, A.; TACHI, T.; MATSUZAKI, K. Effects of peptide dimerization on pore formation: antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. **Biopolymers**, v. 58, n. 4, p. 437-446, 2001.

HELMERHORST, E. J.; BREEUWER, P.; VAN'T HOF, W.; WALSGREEN-WETERINGST, E.; OOMEN, L.; VEERMAN, E.; AMERONGEN, A. V.; ABEE, T. The cellular target of Histatin 5 on *Candida albicans* is the energised mitochondrion. **J. Biol. Chem**, n. 56, p. 7286-7291, 1999.

HELMERHORST, E. J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through formation of reactive oxygen species. **Proc. Natl Acad.Sci**, n. 98, p. 14637-14642, 2001.

HOUGHTON, E. A.; NICHOLAS, K. M. In vitro reactive oxygen species production by histatins and copper(I, II). **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 14, p. 243-251, 2009.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Bioch**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KAMYSZ, W.; MICKIEWICZ, B.; RODZIEWICZ-MOTOWIDIO, S.; GREBER, K.; OKROJ, M. Temporin A and retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. **J. Pept. Sci.**, v. 12, n. 8, p. 533-537, 2006.

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

KENT, S. B. H. Chemical synthesis of peptides and proteins. **Ann. Rev. Biochem**, v. 5, p. 957-989, 1988.

KOSHLUKOVA, S.; LLOYD, T.; ARAUJO, M.; EDGERTON, M. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. **J. Biol. Chem**, n. 274, p. 18872-18879, 1999.

LI, L.; FINNEGAN, M. B.; ÖZKAZAN, S.; KIM, Y.; LILLEHOJ, P. B.; HO, C. M.; LUX, R.; MITO, R.; LOEWY, Z.; SHI, W. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 6, p. 384-90, 2010.

LIU, S.; ZHOU, L.; LAKSHMINARAYANAN, R.; BEUERMAN, R. Multivalent antimicrobial peptides as therapeutics: design principles and structural diversities. **Int. J. Pept. Res. Ther.**, v. 16, n. 3, p. 199-213, 2010.

LORENZÓN, E. N.; CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

SANCHES, P. R. S.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CHILLI, E. M. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Cândida albicans* cells. **Amino Acids**, v. 44, p. 1521-1528, 2013.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. Boca Raton: CRC, 1997.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. E. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, n.6, p.846-855, 2001.

MATOS DE SOUZA, R., MACEDO DE MENEZES, L. Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances. **Angle Orthod**, v. 78, p. 345-350, 2008.

McCUBBIN, G. A.; PRAPORSKY, S.; PIANTAVIGNA, S.; KNAPPE, D.; HOFFMANN, R.; BOWIE, J. H.; SEPAROVIC, F.; MARTIN, L. L. QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides. **Eur. Biophys. J.**, v. 40, n. 4, p. 437–446, 2011.

MELINO, S.; RUFINI, S.; SETTE, M.; MORERO, R.; GROTESSI, A.; PACI, M.; PETRUZZELI, R. Zn(+2) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. **Biochemistry**, v. 38, p. 9626-9633.

MIKULEWICZ, M.; CHOJNACKA, K.; WOZNIAK, B.; DOWNAROWICZ, P. Release of metal ions from orthodontic appliances: an in vitro study. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 146, p. 272-280, 2012.

LOUDHOFF, M. J.; KROEZE, K. L.; NAZMI, K.; KEIJBUS, P. A. M.; HOF, W. V.; BORJA, M. F.; HORDIJK, P. L.; GIBBS, S.; BOLSCHER, J. G. M.; VEERMAN, E. C. I. Structure activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold. **The FASEB journal**, v. 23, p. 3928-3935, 2009.

PINI, A.; GIULIANI, A.; FALCIANI, A.; RUNCI, Y.; RICCI, C.; LELLI, B.; MALOSSI, M.; NERI, P.; ROSSOLINI, G. M.; BRACCI, L. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2665-2672, 2005.

PINI, A.; LOZZI, L.; BERNINI, A.; BRUNETTI, J.; FALCIANI, C.; SCALI, S.; BINDI, S.; DIMAGGIO, T.; ROSSOLINI, G. M.; NICOLAI, N.; BRACCI, L. Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 467–473, 2012.

POLLOCK, J. J.; DENEPIYIA, L.; MacKAY, B. J.; IACONO, V. J. Fungistatic and Fungicidal Activity of Human Parotid Salivary Histidine-Rich Polypeptides on *Candida Albicans*. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 3, p. 702-707, 1984.

PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill- Understanding the candidacidal mechanism of salivary Histatin 5. **Eukaryotic Cell**, p. 1-31, Jun. 2014.

RYDENGARD, V.; ANDERSSON, N. E.; SCHMIDTCHEN, A. Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*. **FEBS J.**, v. 273, p. 2399-2406, 2006.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. In: MERRIFIELD, R. B. (Ed.) **Solid phase peptide synthesis**. 2^a Ed., New York: Pierce Chemical Company, 1984.

TAY, W. M.; HANAFY, A. I.; ANGERHOFER, A.; MING, L. J. A plausible role of salivary copper in antimicrobial activity of histatin-5—metal binding and oxidative activity of its copper complex. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 6709-6712, 2009.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog. Lipid Res.**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 2012.

THEIN, Z. M; SAMARANAYAKE, Y. H; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Arch Oral Biol.**, v. 52, n. 8, p. 761-767, 2007.

VICENT, M. B.; ZHONG, W.; SADIEL, M.; GHIA, M. E.; JEFFREY, M.; GAVIN, S.; SNYDER, M. Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. **Genome Research**, p. 1451, 2010.

WELLING, M. M.; BROUWER, C. P. J. M.; HOF, W. V.; VEERMAN, E. C. I.; AMERONGEN, A. V. N. Histatin-Derived Monomeric and Dimeric Synthetic Peptides Show Strong Bactericidal Activity towards Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3416-3419, 2010.

YANG, S. T.; KIM, J. I.; SHIN, S. Y. Effect of dimerization of a beta-turn antimicrobial peptide, PST13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. **Biotechnol. Lett.**, v. 31, n. 2, p. 233-237, 2009.

ZANIN, I. C.; GONÇALVES, R. B.; JUNIOR, A. B.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 324-30, 2005.

ZHU, W. L.; SHIN, S. Y. Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal action. **J. Pept. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 345-352, 2009.

7. DADOS FINAIS

Araraquara, 11 de Janeiro de 2016.

Aluna: Priscila Marangoni Porto Ricciardelli

De acordo,

Orientador: Profº. Drº. Saulo Santesso Garrido