

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DE ARARAQUARA
UNESP**

**APLICAÇÃO DE METALOPEPTÍDEOS DERIVADOS DE HISTATINA-5 PARA O
COMBATE DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Candida albicans*.**

Nathalia Naliatto

Araraquara

2021

NATHALIA NALIATTO

“Aplicação de metalopeptídeos derivados de histatina-5 para o combate de infecções causadas por *Candida albicans*.”

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

Orientador: Saulo Santesso Garrido
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica
Instituto de Química – UNESP/Araraquara

Araraquara
2021

N169a Naliatto, Nathalia.
Aplicação de metalopeptídeos derivados de Histatina-5 para o combate de infecções causadas por *Candida albicans* / Nathalia Naliatto. – Araraquara: [S.n.], 2021.
40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Saulo Santesso Garrido.

1. Peptídeos antifúngicos. 2. Histatina-5. 3. *Candida albicans*. 4. Íons metálicos. I. Garrido, Saulo Santesso, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família que sempre me incentivou e me amou incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sua infinita misericórdia, pelas santas inspirações e por capacitar-me e ajudar-me a superar os obstáculos que a vida nos coloca. Por aumentar minha fé e por todas as oportunidades que colocou em meu caminho. Graças e louvores sejam dadas à Ele.

À minha família, Ademilson, Marta e Lívia, por sempre acreditarem no meu potencial, por todo esforço, apoio, paciência, pelo cuidado e principalmente pelo amor que nunca me faltou. Vocês foram essenciais para eu chegar até aqui.

Às minhas amigas e amigos, Zaida, Regina, Ana Julia, Fauller, Leonardo e Gabriela, que mesmo a quilômetros de distância, sempre se fizeram presentes em minha vida, me ajudaram em todos os momentos, foram suporte nos momentos difíceis e mais ainda nesses seis anos de graduação. Obrigada pela verdadeira amizade.

Aos meus colegas de laboratório, Naiara, Jonatas e Beatriz, obrigada por toda ajuda e descontração nas pausas para o café.

À minha querida doutoranda suprema Carolina, que além de ter se tornado minha melhor amiga e uma pessoa importante na minha vida, sempre esteve pronta para me ajudar, me fazer companhia e tirar todas as minhas dúvidas, e o melhor de tudo, descontrair o meu dia. Obrigada pela amizade.

Ao meu orientador, Saulo Santesso Garrido, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Bioquímica, pela paciência e disponibilidade e por toda ajuda sempre com um sorriso no rosto. Obrigada pela orientação.

Agradeço à bolsa concedida através do Edital 1/2020 – Pibic, projeto 260 (bolsa Pibic Reitoria).

"À Vossa Proteção recorreremos, Santa Mãe de Deus.
Não desprezeis as nossas súplicas em nossas necessidades,
Mas livrai-nos sempre de todos os perigos,
Ó Virgem gloriosa e bendita."

RESUMO

As infecções fúngicas acabam se enquadrando frequentemente em doenças negligenciadas, justamente por não serem reportadas oficialmente. Estas infecções invasivas, segundo estudos, vêm se tornando uma das causas mais importantes de mortalidade e morbidade humana. Apresentam alta prevalência, principalmente no Brasil e particularmente para populações imunocomprometidas, como pacientes que fazem quimioterapia para tratamento de câncer, imunossupressão para realização de transplantes e os que apresentam infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que são mais vulneráveis a essas infecções. Dentre os microrganismos que causam as infecções destacamos a *Cândida albicans* que é um dos principais patógenos relacionados a infecções fúngicas prevalentes, juntamente a *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Alguns estudos indicam também que a incidência destas infecções varia de acordo com as condições socioeconômicas, com as regiões geográficas, alguns hábitos culturais e com as condições individuais de risco para a sua aquisição. Portanto, faz-se cada vez mais necessário, a busca por desenvolvimento de medicamentos e moléculas eficazes nos tratamentos destes pacientes. Neste cenário temos os peptídeos biologicamente ativos encontrados naturalmente em organismos vivos, que tem sido uma alternativa para esta finalidade, destacando as Histatinas, que são peptídeos comumente presentes na saliva humana, ricos no aminoácido histidina e que exibem uma grande atividade antifúngica contra *C. albicans*, principalmente em se tratando da Histatina-5. Em busca de melhorias na atividade antifúngica do peptídeo OW-Histatina-5, um derivado da Histatina-5, e sabendo da sua capacidade de ligação com metais em sítios específicos, propôs-se o estudo da influência da ligação aos metais cobre (II) e zinco (II) no potencial antifúngico desse peptídeo. Para isso, o peptídeo OW-Histatina-5 foi sintetizado por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo protocolo Fmoc/tBu. Verificou-se a formação de um complexo entre o peptídeo e os íons metálicos Cu^{2+} e Zn^{2+} através de medidas de espectroscopia de fluorescência molecular e avaliou-se o potencial antifúngico dos complexos na inibição de cepas de *C. albicans* por meio de testes de concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados indicam que os complexos peptídeo:metal se formam a uma proporção de 1:2 equivalentes molares. Os resultados mostraram que concentrações abaixo de $80 \mu\text{M}$ da combinação do peptídeo com o íon Zn^{2+} foram suficientes para inibir mais de 95% do crescimento de *C. albicans*. Somente com $10 \mu\text{M}$ o complexo OWHistatina-5: Zn^{2+} foi capaz de inibir mais de 90% do crescimento da cepa de ATCC 10231, resistente ao fluconazol. Desse modo, a complexação de Zn com o peptídeo OWHistatina-5 foi capaz de aumentar significativamente o potencial antifúngico do peptídeo na inibição de *C. albicans*, sendo uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por este micro-organismo.

Palavras-chave: Peptídeos antifúngicos; Histatina-5; *Candida albicans*; íons metálicos.

ABSTRACT

Fungal infections are often neglected diseases because they are not officially reported. These infections are becoming one of the most important causes of human mortality and morbidity. They have a high prevalence in Brazil and are more deadly for immunocompromised patients. These patients go through chemotherapy for cancer treatment and immunosuppression for transplants, that making them more vulnerable to these infections. *Candida albicans* is one of the main pathogens related to prevalent fungal infections, along with *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Some studies also indicate that the incidence of these infections varies according to socioeconomic conditions, geographic regions, some cultural habits and individual risk conditions. Therefore, is necessary the development of effective drugs and molecules for the treatment of these patients. In this scenario we have the biologically active peptides found naturally in living organisms, which has been an alternative for this purpose. One of these peptides are the Histatins, which are peptides commonly present in human saliva, rich in the amino acid histidine and which exhibit a great antifungal activity against *C. albicans*, specially the peptide Histatin-5. In order to improve the antifungal activity of the peptide Histatin-5, it was proposed to study the influence of copper(II) and zinc(II) in binding with this peptide. For this, the 0WHistatin-5 peptide was synthesized using the solid phase peptide synthesis (SPPS) by the Fmoc/tBu protocol. The formation of a complex between the peptide and the metallic ions Cu^{2+} and Zn^{2+} was verified through measurements of molecular fluorescence spectroscopy and the antifungal potential of the complexes in the inhibition of *C. albicans* strains was evaluated by minimum inhibitory concentration tests (MIC). The results indicate that the peptide:metal complexes was formed at a ratio of 1:2 molar equivalents. The results showed that concentrations below 80 μM of the for the complex 0WHistatin-5: Zn^{2+} were able to inhibit more than 95% of the growth of *C. albicans*. Only with 10 μM the WHistatin-5: Zn^{2+} complex was able to inhibit more than 90% of the growth of the ATCC 10231 strain, that is resistant to fluconazole. Thus, the complexation of Zn with the 0WHistatin-5 peptide was able to increase the antifungal potential of this peptide, being an alternative in the treatment of fungal infections caused by *C. albicans*

Keywords: Antifungal peptides; Histatin-5; *Candida albicans*; metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das cepas de <i>Cândida</i>	16
Figura 2. Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5.....	17
Figura 3. Mecanismo de ação da Histatina-5 em <i>C. albicans</i> . 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). Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (G), e detém a fase G1 do ciclo celular no núcleo (F).	18
Figura 4. Motivos de ligação dos metais cobre e zinco no peptídeo histatina-5.....	20
Figura 5. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 bruto.....	27
Figura 6. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 puro.....	28
Figura 7. Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 após purificação.	28
Figura 8. Espectroscopia de fluorescência molecular para identificação da proporção peptídeo:metal para cobre (II) e 0WHistatina-5.	30
Figura 9. Espectroscopia de fluorescência molecular para identificação da proporção peptídeo:metal para zinco (II) e 0WHistatina-5.	30
Figura 10. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.	33
Figura 11. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 18804 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.	34
Figura 12. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de aminoácidos do peptídeo Histatina-5 e do análogo estrutural a ser sintetizado.....	22
Tabela 2. Razões massa/carga esperadas para o peptídeo 0WHistatina-5 para cargas entre +3 e +7.....	29
Tabela 3. Porcentagem de inibição das cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.....	32
Tabela 4. Porcentagem de inibição das cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 18804 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.....	32
Tabela 5. Porcentagem de inibição das cepas de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.....	32

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE SIMBOLOS

°C.....	Graus Celsius
Célula.mL ⁻¹	Número de células por mililitro
λ.....	Comprimento de onda
α.....	Alfa
β.....	Beta
μM.....	Micromolar
μm.....	Micrômetro
%.....	Porcentagem

LISTA DE SIGLAS

Anvisa.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCUN.....	Amino-terminal copper and nickel binding unit
ATP.....	Adenosina trifosfato
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cu.....	Cobre
DCM.....	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA.....	N-Diisopropiletilamina
DMF.....	Dimetilformamida
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
EROs.....	Espécies Oxigênio Reativas
HOBt.....	N-Hidroxibenzotriazol
Hst-5.....	5-Histatina-5
Sod5.....	Superóxido dismutase
SPFS.....	Síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	Ácido Trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
UV-vis.....	Espectroscopia na região do Ultravioleta- visível
Zn.....	Zinco

LISTA DE ELEMENTOS

Cu^{2+} Cobre (II)

Zn^{2+} Zinco (II)

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E AS HISTATINAS	16
1.2 HISTATINA-5 E ÍONS METÁLICOS	18
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA-5	22
3.2 SÍNTESE E CLIVAGEM DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA-5	22
3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA-5 ...	24
3.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS METALPEPTÍDEOS CU(II)/0WHISTATINA-5 E ZN(II)/0WHISTATINA-5	25
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA5.....	27
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS METALPEPTÍDEOS ZN:0WHISTATINA-5 E CU:0WHISTATINA-5.....	29
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METALPEPTÍDEOS...31	
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Os fungos, juntamente com as bactérias, são microrganismos que normalmente compõem a microbiota normal dos seres humanos, sendo frequentemente encontrados na pele, trato gastrointestinal, trato respiratório, geniturinário, assim como em outros locais do corpo, e que se modifica conforme a idade, os hábitos alimentares e a localização geográfica, conferindo variedade a essa espécie (VARANO, *et al.*, 2019). Contudo, quando há um desequilíbrio nessa relação, esses organismos podem se tornar patogênicos e causar doenças, que é o caso das infecções.

As infecções fúngicas resistentes vem se tornando uma grande problemática, já que o número de indivíduos vulneráveis a estas doenças vem crescendo, apesar dos avanços na medicina e nas terapias que melhoram e prolongaram as vidas dos pacientes. O uso de antifúngicos e antibacterianos na agricultura durante décadas e seu uso indiscriminado sem orientação médica, geraram como consequência o surgimento de espécies resistentes, as quais são as responsáveis por estas infecções (FISHER, *et al.*, 2018).

Alguns fatores podem agravar o surgimento destas infecções, como o estado imunodeprimido de pacientes transplantados, pacientes que fazem quimioterapia para tratamento de câncer, imunossupressão para realização de transplantes e os que apresentam infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, sigla do inglês). Ou seja, pacientes imunodeprimidos tendem a ser mais suscetíveis às infecções em geral, especialmente, as fúngicas. (BERKOW; LOCKHART, 2017)

Neste cenário, podemos ter infecções causadas por fungos da espécie *Candida albicans*, que normalmente existe como um microrganismo comensal presente naturalmente na pele, boca e trato gastrointestinal humano. Uma característica importante da *C. albicans* é que ela pode existir em três fases, levedura, pseudo-hifas e hifas, sendo a fase de hifa um fator determinante da resistência aos medicamentos e também uma forma importante durante a fase de infecção. (MOFFA *et al.*, 2015; CHEN, H. *et al* 2020).

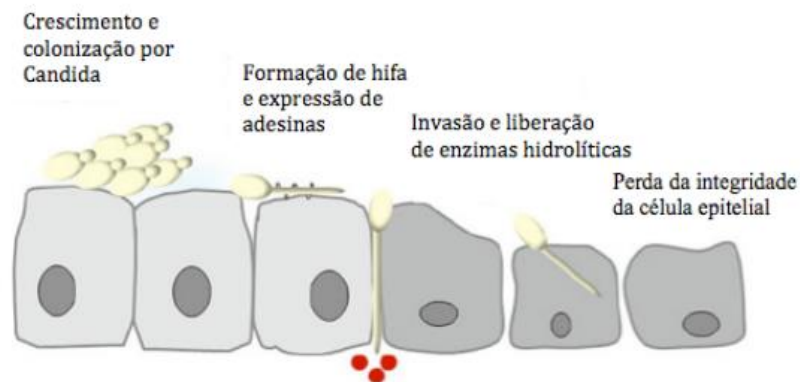
As células de levedura, a morfologia celular padrão na maioria das condições *in vitro*, são redondas ou ovais, têm uma morfologia unicelular, podem estar envolvidas na formação de biofilme, podem ser tóxicas ou permanecer simbióticas no organismo e manter a simbiose na cavidade oral, pele e vagina, já as pseudo-hifas têm formas elípticas e multicelulares longas, que podem ser induzidas em pH 6,0 e 35 °C, em meio de nitrogênio sólido limitado e tem envolvimento na formação de biofilme. As pseudo-hifas podem variar amplamente em largura

e comprimento, de modo que em um extremo se parecem com hifas e, no outro, se assemelham a botões alongados de células de levedura. Uma das características das pseudo-hifas é que a largura de cada segmento que forma o micélio não é constante, sendo mais larga no centro do que nas duas extremidades. Nas pseudo-hifas, a conexão entre uma célula-mãe e uma célula-filha é facilmente interrompida por agitação mecânica. (CHEN, H. *et al* 2020)

As hifas têm formas tubulares multicelulares, que podem ser induzidas por uma temperatura de 37 ° C, N-acetilglucosamina, matriz de incorporação e pH alcalino *in vitro* e tem a capacidade de formar de biofilmes que atuam como um revestimento impermeável e protetor, fazendo com que este microrganismo seja resistente também a ações de fagocitose do sistema imunológico do hospedeiro, aumentando o tempo de tratamento e muitas vezes inviabilizando a total eliminação dos microrganismos. As hifas se desenvolvem a partir de uma célula de levedura não germinada, sem constrição no colo da célula-mãe e tendo lados paralelos em todo o seu comprimento. Durante o ciclo celular de hifas, um anel de septina aparece na célula filha. Uma maneira simples de distinguir entre hifas e pseudo-hifas é medir a largura do micélio, a largura das células das pseudo-hifas é sempre maior do que as células das hifas. A largura das hifas é de cerca de 2,0 μm em sua maioria enquanto as pseudo-hifas têm uma largura mínima de 2,8 μm . (CHEN, H. *et al* 2020)

A forma de infecção, portanto se dá através da adesão à superfície de células epiteliais mediada pela expressão de adesinas, em seguida existe uma transição entre as formas morfológicas de célula de levedura para célula de hifa como citado acima, denominado dimorfismo, sendo que a formação de biofilmes e as adaptações do metabolismo deste microrganismo está diretamente relacionada à capacidade deste causar infecções. O crescimento direcional das hifas é denominado tigmotropismo. A expressão de invasinas permite a entrada do fungo na célula hospedeira através de mecanismos de invasão e em seguida, a formação de biofilmes, com células de levedura na parte inferior, e células hifais na parte superior, formado em superfícies abióticas e bióticas (Figura 1). (MAYER; WILSON; HUBE, 2013)

Figura 1. Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das cepas de *Cândida*.



Fonte: HOFS, S. (2016)

Uma das principais organelas do metabolismo celular são as mitocôndrias, as quais auxiliam em diversas funções anabólicas e catabólicas envolvidas principalmente na produção de energia, biossíntese de aminoácidos e ácidos nucleicos além de outros constituintes celulares. Portanto, a integridade e a função das mitocôndrias são essenciais para a virulência da *C. albicans* (SUN, *et al.*, 2019). Qualquer mutação ou molécula que afetem o funcionamento de qualquer uma das várias mitocôndrias, resultam em uma diminuição da virulência ou até a total perda da virulência. As interferências nas mitocôndrias da *C. albicans* podem afetar as taxas de crescimento, a estrutura da parede, composição da membrana, morfogênese e a formação de biofilme (SUN, *et al.*, 2019).

Estas mutações envolvem principalmente o efluxo de ATP para o meio extracelular e geração de espécies reativas de oxigênio.

Essas observações e estudos enfatizam a importância das mitocôndrias na patologia da *C. albicans* e, a partir disso, alternativas vêm sendo estudadas e exploradas para o tratamento das infecções fúngicas humanas causadas por *C. albicans*, como os peptídeos biologicamente ativos, encontrados naturalmente em organismos vivos como plantas, animais e microrganismos.

1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E AS HISTATINAS

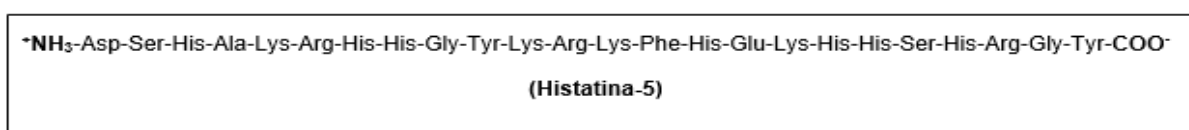
Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, da sigla em inglês) são pequenas moléculas pertencentes a um mecanismo de defesa biologicamente eficaz contra infecções bacterianas,

virais e fúngicas. Através de pesquisas e manipulações dessa classe de peptídeos, evoluiu-se para um melhor desempenho e eficácia dessas substâncias contra diversos microrganismos.

Habitualmente, na saliva humana encontra-se um grande número destes AMPs, que protegem o organismo contra estas infecções e dentre estes, encontram-se os peptídeos da família das Histatinas. As Histatinas são peptídeos fracamente anfipáticos, secretados pelas glândulas parótidas e submandibulares, exibindo atividades contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e *Porfiromonas gengivalis*, além da *Candida albicans* (ROBBINS, *et al.*, 2016). Um desses AMPs, é o conhecido como Histatina-5, um peptídeo catiônico, que possui de 3 a 4 KDa, rico no aminoácido histidina e apresentam carga positiva em pH fisiológico sendo, em especial, o mais eficaz contra a *C. albicans*, causadora de diversas doenças fúngicas (HAN *et al.*, 2016).

Sua sequência de aminoácidos está representada na figura 2 abaixo.

Figura 2. Sequência primária de aminoácidos da Histatina-5



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

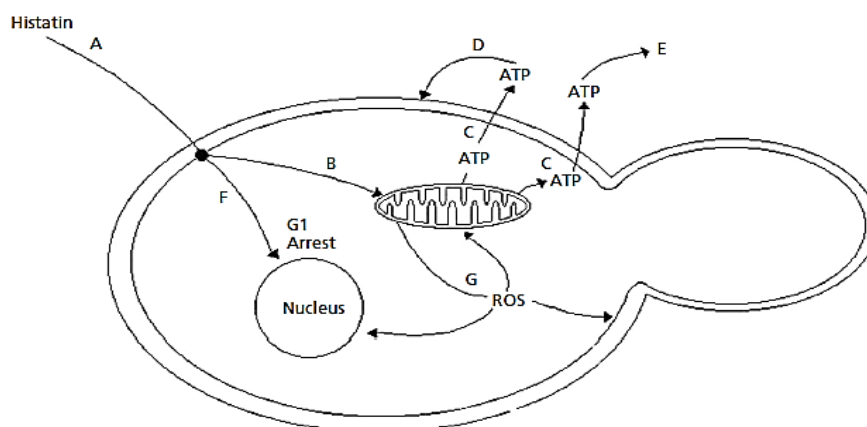
A atividade antifúngica deste peptídeo é atribuída a sua grande quantidade de aminoácidos como histidina, um aminoácido básico e tirosina. Os aminoácidos ácidos, presente em sua sequência, são conhecidos por participar da coordenação com íons metálicos (CONKLIN, *et al.*, 2017).

Estudos mostram que a Histatina-5 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).

Assim como a maioria dos peptídeos antimicrobianos que possuem estrutura randômica em solventes aquosos, e formam hélices anfipáticas em ambientes similares às membranas, a Histatina-5 é um peptídeo que possui conformação randômica quando em meio extracelular, se transformando em hélice para poder penetrar na célula e voltando a ser randômica no meio intracelular. (SEO *et al.*, 2012)

O mecanismo de ação da Histatina-5 envolve o lançamento de ATP para o meio extracelular, por meio de sua interação com as mitocôndrias presentes na célula do microrganismo (BAEV et al., 2002; HELMERHORST et al., 1999). A falta de energia para a respiração celular por si só já causa a morte celular, mas alguns estudos mostraram que além de causar o efluxo de ATP a Histatina-5 também gera espécies reativas de oxigênio (ERO's) no interior da célula e interfere na fase G1 do ciclo celular, como representado na figura 3.

Figura 3. Mecanismo de ação da Histatina-5 em *C. 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). Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (G), e detém a fase G1 do ciclo celular no núcleo (F).



Fonte: Kavanagh & Dowd (2004).

1.2 HISTATINA-5 E ÍONS METÁLICOS

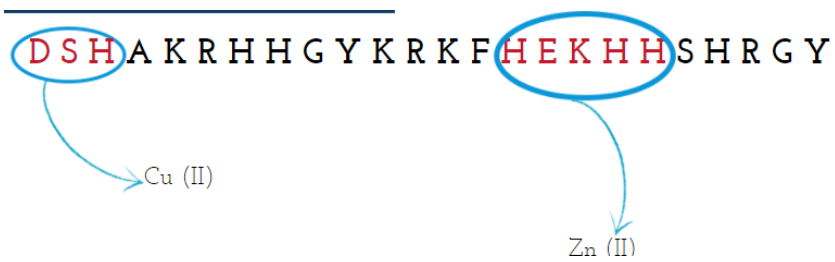
Estudos também demonstram que cerca de 13 dos 24 aminoácidos da sequência da Histatina-5 podem participar de ligações com íons metálicos, especialmente cobre (II) (GUSMAN, H., et al., 2001). Esse mecanismo de ligação desestabiliza a alfa hélice da Histatina-5 (BREWER et al. 2000). Sendo assim a ligação com o Zn (II), por exemplo, catalisa a fusão de lipídeos de vesículas e aumenta a atividade fungicida do peptídeo (MELINO et al. 1999; RYDENGARD et al. 2006). Enquanto a ligação com o Cu (II) aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (CABRAS et al. 2007; HOUGHTON et al. 2009; TAY et al. 2009) e, conseqüentemente, a produção de EROs.

O Zn e o Cu são metais naturalmente constituintes da superóxido dismutase (Sod5), uma enzima presente na mitocôndria da *Candida albicans*, e que podem ser quelados pela Histatina-5, alterando a função da Sod5. Ao formar complexo com este metal, o peptídeo passa a gerar maior quantidade de espécies reativas de oxigênio que, conforme descrito em seu mecanismo de ação, leva a morte da célula de levedura. Desse modo, a formação de complexos metálicos do peptídeo Histatina-5 com os íons metálicos cobre (II) e zinco (II) pode levar a um aumento do potencial antifúngico do peptídeo, por potencializar um de seus mecanismos de ação.

Alguns motivos muito importantes de ligação (Figura 4) se revelaram pela caracterização funcional e estrutural do domínio N-terminal da Histatina-5. Um desses motivos é o conhecido como ATCUN ou amino-terminal copper and nickel binding unit, uma característica estrutural que está presente na Histatina-5 e também em algumas diferentes proteínas e peptídeos. Esse motivo permite a ligação dos íons Cu^{2+} e Ni^{2+} especificamente, mas pode liberar os metais facilmente caso haja ligantes mais apropriados, tendo um papel como local de transporte em albuminas (HARDFORD; SARKAR., 1997). O motivo de ligação HEXXH é outro que aparece uma vez na Histatina-5 e é comum de várias metaloproteinases, apresentando capacidade de ligação ao íon metálico Zn^{2+} . A constante de dissociação de Histatina-5 ligando-se a Cu^{2+} e Zn^{2+} é muito baixa, atingindo valores nanomolares, o que indica que esses metais podem se ligar aos respectivos motivos da Histatina-5 na saliva em condições fisiológicas. (MELINO et al., 2014; GUSMAN et al., 2001).

Desta forma, é muito provável que a associação de íons metálicos ao peptídeo Histatina-5, possa gerar um metalopeptídeo com potencial atividade inibitória frente a *C. albicans*. Pretendemos, portanto, neste trabalho, realizar a associação dos íons metálicos cobre (II) e zinco (II) no peptídeo 0WHistatina-5, um peptídeo derivado da Histatina-5 que possui ação comprovada contra *C. albicans*. Esperamos com esta estratégia, obter metalopeptídeos com maior potencial antifúngico que possam apresentar possíveis aplicações na área de saúde humana e animal.

Figura 4. Motivos de ligação dos metais cobre e zinco no peptídeo Histatina-5.



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

2 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver um complexo metálico do peptídeo antifúngico 0WHistatina-5 com íons cobre (II) e zinco (II) visando o aumento de seu potencial antifúngico, podendo ser utilizado como um tratamento mais eficaz para candidíase bucal.

Para alcançar este objetivo, este projeto teve como objetivos específicos:

- Sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo 0WHistatina-5;
- Estudar e caracterizar a complexação do peptídeo 0WHistatina-5 com os íons metálicos cobre (II) e zinco (II);
- Realizar testes antifúngicos para avaliação do potencial de ação dos metalopeptídeos produzidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA-5

Partindo dos estudos que demonstraram que o peptídeo Histatina-5 é o mais potente antifúngico da família das Histatinas contra *Candida albicans*, foi utilizada a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) para sintetizar o análogo denominado 0WHistatina-5, o qual possui o aminoácido triptofano (W) na extremidade amino-terminal, conforme tabela 1.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos do peptídeo Histatina-5 e do análogo estrutural a ser sintetizado.

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
0WHistatina-5	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

Fonte: Acervo pessoal

A finalidade da adição do triptofano foi para permitir a realização de ensaios de espectroscopia de fluorescência para monitoramento da formação do complexo com os íons metálicos, já que o aminoácido triptofano possui uma cadeia lateral aromática que emite fluorescência quando excitado em λ de 290 nm.

3.2 SÍNTESE E CLIVAGEM DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA-5

A principal ferramenta utilizada hoje para obtenção de peptídeos de até 60 resíduos de aminoácidos, é a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS). Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um L- α -aminoácido por vez, a partir do grupo carboxílico C-terminal que se encontra ligado covalentemente a uma resina, suporte polimérico insolúvel e inerte nas condições usadas. (MERRIFIELD, 1963).

Estes polímeros possuem alto grau de solvatação em solvente apolar dando acessibilidade dos sítios reativos aos reagentes que passam pelas partículas. Para que ocorra reação de condensação, como a ligação peptídica ou ligação amida de maneira orientada, é necessária uma proteção adequada dos outros grupos funcionais que não estão relacionadas com a ligação peptídica. Portanto são utilizados protetores permanentes nestes grupos, pois devem permanecer até o final da síntese.

Já os grupamentos α -amínicos são protegidos temporariamente, removidos a cada passo de acoplamento. Para a síntese do peptídeo proposto neste projeto, OWHistatina-5, cuja sequência de aminoácidos se encontra na Tabela 1, foi utilizado grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupo α -amino. Para proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais, são utilizados grupos protetores permanentes como terc-butil (tBu), tritil e terc-butiloxicarbonil, entre outros. O Fmoc é base-lábil, ou seja, a sua remoção do grupo α -amino, processo denominado desproteção, é realizada em um meio básico com solução de 20% piperidina em N, N – Dimetilformamida (DMF).

A etapa de acoplamento na síntese em fase sólida, é a base da formação da ligação peptídica sendo necessário a ativação do grupo α -carboxílico do aminoácido a ser inserido para que ele possa ser atacado pelo grupo α -amino do aminoácido ligado à resina. Para isso, foram utilizados agentes de acoplamento como o N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/NHidroxibenzotriazol (HOBt), ou o O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU)/N-Etildiisopropilamina (DIEA), juntamente com o Fmoc-aminoácido a ser adicionado. Nesta reação foram utilizadas três vezes de excesso molar em relação ao grau de substituição da resina. O processo de acoplamento de cada aminoácido ocorre durante duas horas sob agitação branda.

Entre cada passo de acoplamento e desproteção, foram realizadas lavagens com DMF e diclorometano (DCM) para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada passo do processo de síntese - acoplamento e desproteção - a resina foi submetida ao teste de ninidrina. A ninidrina, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, por sua vez, indica a eficácia dos passos de desproteção e acoplamento.

Ao final dos acoplamentos de todos os resíduos de aminoácidos, foi realizada a clivagem do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores permanentes das cadeias laterais, os quais são ácido-lábeis. Para isso foi utilizada uma solução de clivagem composta por ácido trifluoracético (TFA) (94%), água deionizada (2,5%), 1,2-etanoditiol (EDT) (2,5%) e triisopropilsilano (TIS) (1%), por 3 horas em agitação branda a 25°C. Após esse período, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado. A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos de centrífuga tipo "falcon" de 15 mL, e foram submetidos a centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Esse procedimento de lavagem com éter etílico gelado e centrifugação, foi repetido por mais duas vezes.

Após as lavagens, o precipitado foi seco em sistema a vácuo por cerca de 4-6 horas. Em seguida o peptídeo foi extraído utilizando solução aquosa contendo 10% de ácido acético (v:v). A mistura foi então filtrada para separação da resina e a solução ácida obtida na filtração foi concentrada em rotaevaporador e, em seguida, liofilizada obtendo-se um pó branco, denominada peptídeo bruto.

3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO OWHISTATINA-5

Após o processo de síntese, o peptídeo bruto foi submetido a processo de purificação. Dentre as técnicas utilizadas para purificação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi a utilizada neste trabalho, aplicando-se as seguintes condições cromatográficas:

Modo Semi-preparativo (sistema Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu LC-10A/C-47A):

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
 B: 0,036% TFA . ACN
- Coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 µm).
- Gradiente: 0,33% de solvente B por minuto em 90 minutos.
- Fluxo: 5 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Modo Analítico (sistema Shimadzu UFLC-SPD20A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu SPD-20A):

- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
 B: 0,036% TFA . ACN
- Coluna Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm e 5µm).
- Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos.
- Fluxo: 0,6 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Após o procedimento de purificação do peptídeo, a caracterização foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo de “eletrospray” positivo por

injeção direta da amostra do peptídeo puro em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, Bruker®, e por HPLC acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS), permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente. Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para o peptídeo de acordo com seus resíduos de aminoácidos.

3.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS METALPEPTÍDEOS CU(II)/OWHISTATINA-5 E ZN(II)/OWHISTATINA-5

Após obtenção do peptídeo puro, a complexação foi realizada com soluções de cloreto dos metais cobre e zinco (CuCl_2 e ZnCl_2). Para associar o metal ao peptídeo, alíquotas crescentes de cada solução de metal foram adicionadas a uma solução contendo o peptídeo a uma concentração fixa e caso necessário, o pH da solução foi ajustado para um valor próximo a 7,0 utilizando HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ou NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$.

Em seguida, um acompanhamento nos espectros de emissão de fluorescência e absorção na região do UV-Vis do peptídeo para cada uma das adições da solução dos metais foi realizado a fim de se estabelecer a proporção molar que os metais Cu(II) e Zn(II) se complexaram com o peptídeo, sendo necessário aguardar pelo menos 30 minutos para garantir a complexação, com base em estudos já realizados.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos sintetizados foram utilizadas as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. albicans* (ATCC 90028), obtidas por meio de doação da Fiocruz. A primeira delas é uma cepa resistente ao antifúngico fluconazol, fármaco de tratamento convencional para infecções de *C. albicans*. As outras duas cepas são sensíveis a este fármaco, sendo que a cepa de ATCC 90028 é considerada padrão para a realização de testes de triagem para novos antifúngicos.

As suspensões de *C. albicans* foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação na faixa de 0,1 a 0,15 em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm, o que representa aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada para que a solução final fosse de 1×10^3 células. (DOS SANTOS RAMOS et al., 2016).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M27-A3 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 μ L de Caldo Sabouraud dextrose. Em seguida foram acrescentados 100 μ L dos peptídeos solubilizado em solução tampão Tris HCl pH 7,2, 10 mM estéril, e realizada a diluição seriada de 80 μ M/mL até 0,31 μ M/mL. Adicionalmente foram distribuídos 100 μ L das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas.

Os testes também foram realizados com os peptídeos complexados com os metais em uma concentração inicial de 80 μ M/mL e com os metais na mesma concentração inicial seguindo a mesma diluição e distribuição. Como controle positivo foi utilizado fluconazol, este foi usado em concentração adequada para cada micro-organismo, visando alcançar a CIM, sendo considerada como a menor concentração do peptídeo capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento microbiano e o controle negativo (solução tampão). As microplacas foram encubadas em estufa microbiológica à temperatura de 37° C durante 48 horas.

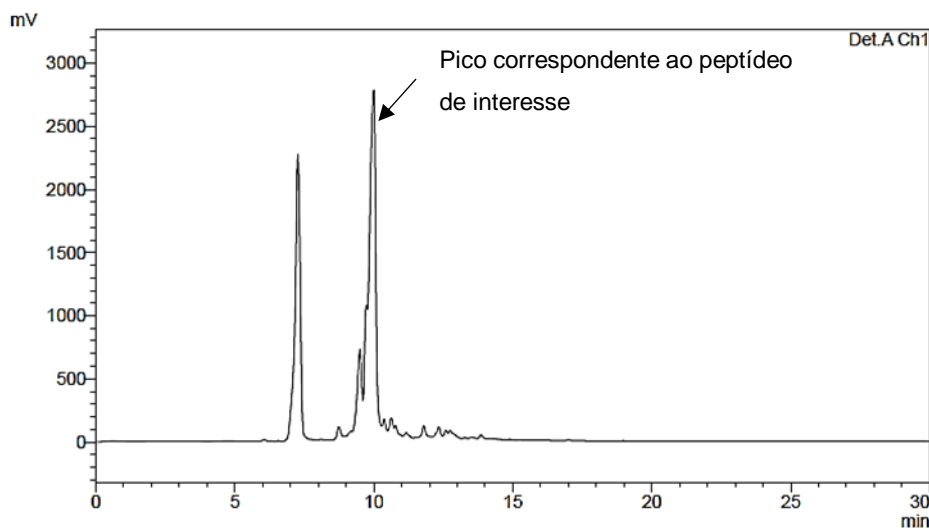
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO 0WHISTATINA5

Para a síntese do peptídeo 0WHistatina-5 foi utilizada a resina Fmoc-Tyr(tBu)-Wang, a qual já possui o primeiro aminoácido (tirosina) acoplado. Partindo de uma massa inicial de 250 mg de resina, foi obtido no final da síntese do peptídeo uma massa de peptidil-resina de 1250 mg. Após o processo de clivagem conforme descrito no item 3.2, foi analisado o perfil por CLAE em escala analítica, nas condições descritas no item 3.2, a fim de se obter o perfil do peptídeo no estado bruto.

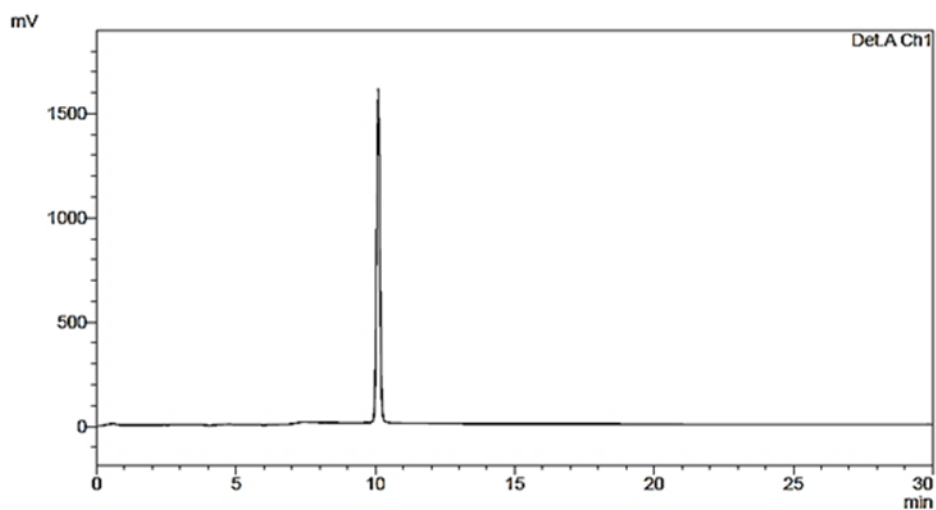
Com base no tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise por CLAE foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa, coletando-se as frações correspondentes ao peptídeo de interesse. Tais frações foram analisadas novamente em escala analítica, nas mesmas condições, a fim de se juntar aquelas frações que representavam o peptídeo puro. Os perfis cromatográficos de purificação estão representados nas figuras 5 e 6.

Figura 5. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 bruto



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

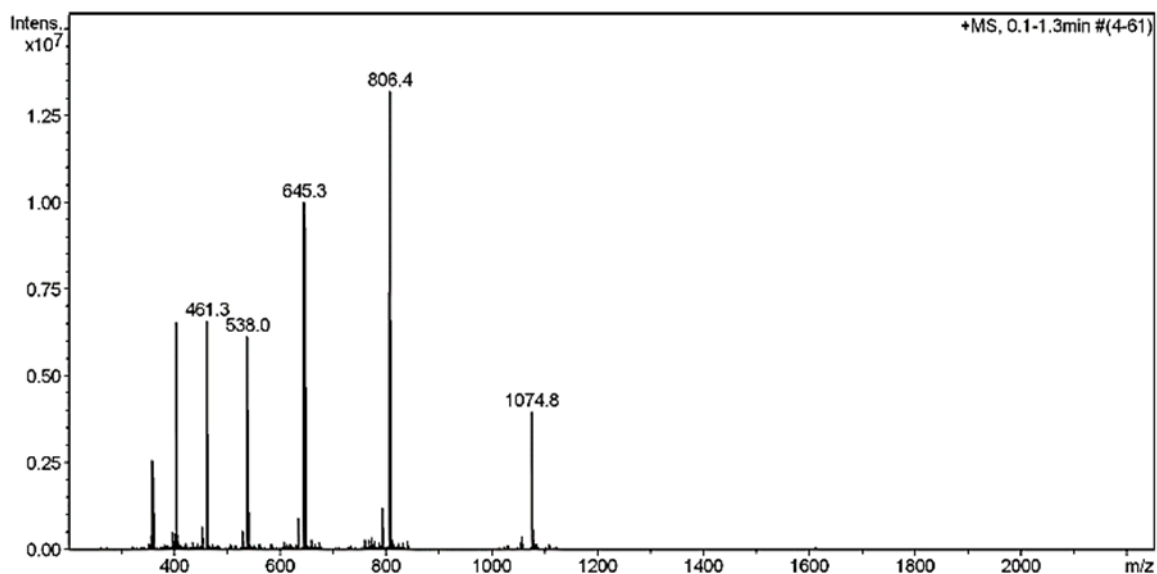
Figura 6. Perfil cromatográfico do peptídeo 0WHistatina-5 puro.



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

A 0WHistatina-5 foi caracterizada, após purificação, por determinação da massa molecular, 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. O espectro de massas para a 0WHistatina-5 está representado na figura 7.

Figura 7. Espectro de massas obtido para o peptídeo 0WHistatina-5 após purificação.



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

A 0WHistatina-5 possui massa molecular igual a 3222,5 g.mol⁻¹. Sendo assim é possível calcular os sinais referentes às razões massa/carga que se espera observar no espectro de massas do peptídeo. Uma comparação entre as razões m/Z teóricas e os sinais confirma que o peptídeo obtido através da síntese química foi de fato 0WHistatina-5. Os sinais observados no espectro de massas são referentes aos níveis de ionização entre +3 (m/Z=1074,8; [0WHst5+3H⁺]³⁺) e +7 (m/Z=461,3; [0WHst5+7H⁺]⁷⁺). A tabela 2 abaixo vem demonstrar as razões massa/carga esperadas para o peptídeo 0WHistatina-5 para cargas entre +3 e +7.

Tabela 2. Razões massa/carga esperadas para o peptídeo 0WHistatina-5 para cargas entre +3 e +7.

Carga (z)	Razão massa/carga teórica (λ)m/Z)	Razão massa/carga observada (λ)m/Z)
+3	1075,2	1074,8
+4	806,6	806,4
+5	645,5	645,3
+6	538,1	538,0
+7	461,4	461,3

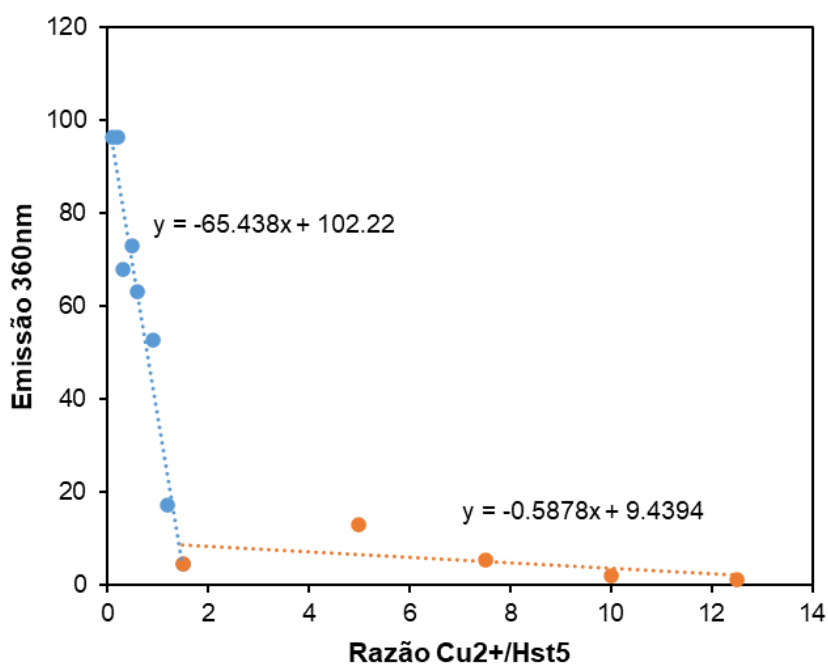
Fonte: Acervo pessoal, (2021)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS METALOPEPTIDEOS Zn:0WHISTATINA-5 E Cu:0WHISTATINA-5

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência molecular tinham como objetivo possibilitar a identificação da proporção peptídeo:metal que possibilitasse a complexação. Para a associação com o íon Cu²⁺, foi observada uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência do peptídeo com o aumento da concentração do íon metálico. Considerou-se que a formação do complexo ocorria a uma proporção de 2 equivalentes molares de Cu²⁺, ponto em que a intensidade de fluorescência passou a se manter constante. Para a associação com o íon Zn²⁺, a intensidade de fluorescência do peptídeo aumentou e atingiu um valor constante também com o incremento de 2 equivalentes molares de Zn²⁺.

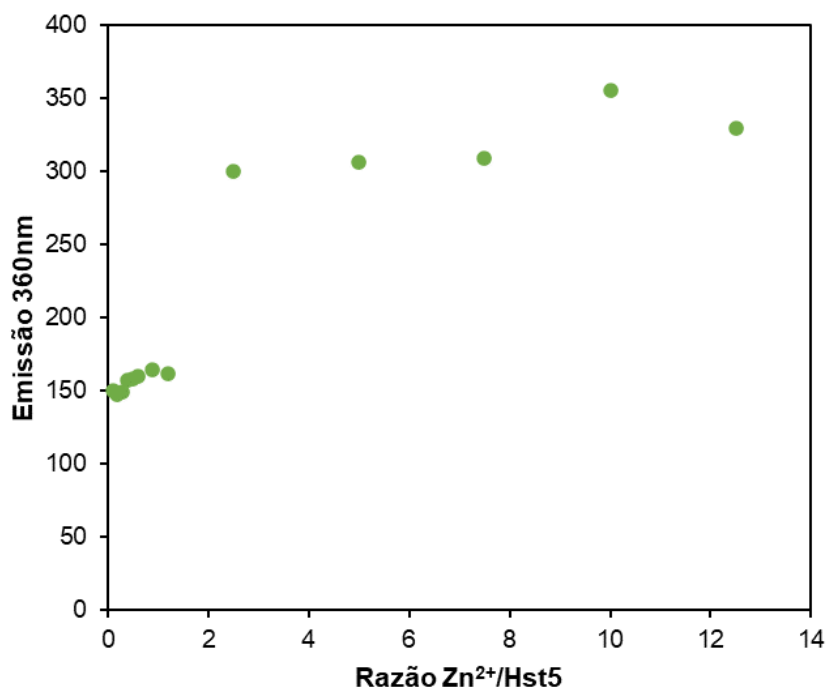
Pode-se analisar estas informações nas figuras 8 e 9.

Figura 8. Espectroscopia de fluorescência molecular para identificação da proporção peptídeo:metal para cobre (II) e 0WHistatina-5.



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

Figura 9. Espectroscopia de fluorescência molecular para identificação da proporção peptídeo:metal para zinco (II) e 0WHistatina-5.



Fonte: Acervo pessoal, (2021)

Dados sugerem que OWHistatina-5 tem três sítios de ligação com íons zinco, dois deles de maior afinidade e um de menor afinidade. Sendo assim, este comportamento pode estar associado à formação de um complexo dimérico entre o peptídeo e Zn^{2+} e até mesmo a formação de tetrâmeros. Essa possibilidade existe devido a exposição dos outros sítios que possuem afinidade com o Zn^{2+} , como sugerem os resultados observados na figura 9, o qual mostrou um aumento na emissão de fluorescência, que pode estar associada a aglomeração de mais moléculas do peptídeo que emitirão maior sinal de fluorescência devido a maior quantidade de aminoácidos triptofanos presentes. Por outro lado, apesar de ter sido observado a existência de apenas um local de ligação de alta afinidade para o Cu (II) no peptídeo OWHistatina-5, os resultados observados na figura 8 sugerem que a complexação com o metal ocorre na proporção 1:2, que demonstra alta especificidade que o peptídeo possui pelo metal (GUSMAN et al., 2001).

A figura 8 também pode demonstrar que devido ao sítio de ligação com o Cu^{2+} ser próximo ao triptofano inserido no peptídeo, este metal pode impedir ou reduzir o sinal de fluorescência emitido pelo aminoácido triptofano, o que resultaria em um menor sinal de fluorescência, se comparado ao íon Zn^{2+} como visto no gráfico apresentado na figura 8.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METALOPEPTÍDEOS

Os resultados dos testes microbiológicos de CIM demonstrados nas tabelas 3, 4 e 5 mostraram que o peptídeo foi capaz de inibir o crescimento das três cepas a uma concentração de 20 μM em associação com o íon Zn^{2+} . Já em associação com o Cu^{2+} , a inibição ocorreu à concentração de 80 μM , mesmo valor de CIM do peptídeo agindo individualmente.

Os resultados parciais indicam que os complexos peptídeo:metal se formam a uma proporção de 1:2 equivalentes molares. Também há evidências de que a combinação do peptídeo com o íon Zn^{2+} aumentou significativamente o potencial antifúngico do peptídeo na inibição de *C. albicans* e as porcentagens de inibição existentes nas tabelas 3, 4 e 5 demonstram esses possíveis complexos.

As tabelas 3, 4 e 5 demonstram as porcentagens de inibição das cepas frente aos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} sendo que é possível observar nestas figuras que o íon Zn^{2+} inibe de 90% a 95% as cepas estudadas em concentrações a partir de 10 μM , sendo uma porcentagem excelente frente as cepas mais frequentes de *C. albicans*, enquanto o íon Cu^{2+} gerou uma inibição satisfatória

somente frente a cepa ATCC 18804 em concentração de 80 μM como é possível observar na tabela 4.

Tabela 3. Porcentagem de inibição das cepas de *C. albicans* ATCC 10231 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.

Concentração (μM)	Cu ²⁺	Cu ²⁺ :0WHst5	Zn ²⁺	Zn ²⁺ :0WHst5	0WHst5
80	4,05 \pm 3,85	66,49 \pm 34,97	0,00	95,58 \pm 0,37	91,79 \pm 2,29
40	13,18 \pm 10,02	37,87 \pm 20,61	0,00	95,21 \pm 0,85	0,00
20	0,00	0,00	0,00	95,36 \pm 0,42	0,00
10	0,00	35,54 \pm 29,91	0,00	91,87 \pm 6,79	0,00

Tabela 4. Porcentagem de inibição das cepas de *C. albicans* ATCC 18804 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.

Concentração (μM)	Cu ²⁺	Cu ²⁺ :0WHst5	Zn ²⁺	Zn ²⁺ :0WHst5	0WHst5
80	0,00	92,23 \pm 3,14	0,00	92,09 \pm 3,36	95,16 \pm 0,66
40	0,00	0,00	0,00	92,07 \pm 3,71	93,28 \pm 3,17
20	0,00	0,00	0,00	92,95 \pm 3,54	84,53 \pm 7,78
10	0,00	0,00	0,00	90,89 \pm 3,51	0,00

Tabela 5. Porcentagem de inibição das cepas de *C. albicans* ATCC 90028 dos complexos peptídeo:metal, somente metal e peptídeo 0WHistatina-5.

Concentração (μM)	Cu ²⁺	Cu ²⁺ :0WHst5	Zn ²⁺	Zn ²⁺ :0WHst5	0WHst5
80	0,00	88,63 \pm 5,03	0,00	90,72 \pm 4,47	80,93 \pm 9,75
40	0,00	64,70 \pm 24,68	0,00	91,08 \pm 3,62	78,72 \pm 11,70
20	0,00	54,55 \pm 34,34	0,00	90,99 \pm 3,40	80,07 \pm 0,31
10	0,00	0,00	0,00	84,60 \pm 13,45	0,00

As comparações entre as porcentagens de inibição também podem ser vistas nas figuras 10,11 e 12 onde observamos que o complexo Zn:0Whistatina-5 gera uma inibição superior em concentrações de 10 μM quando comparado ao peptídeo 0Whistatina-5 sozinho que possui uma inibição de 80% a 90% em concentrações de 80 μM e também com o complexo Cu:0Whistatina-5 que possui uma porcentagem de inibição próxima ao peptídeo 0Whistatina-5 sozinho. Portanto, o complexo Zn:0Whistatina-5 gera uma inibição que quase alcança 100%, tornando-a uma alternativa satisfatória para o tratamento de infecções causadas por diferentes cepas desta espécie de fungo.

Figura 10. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de *C. albicans* ATCC 10231 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.

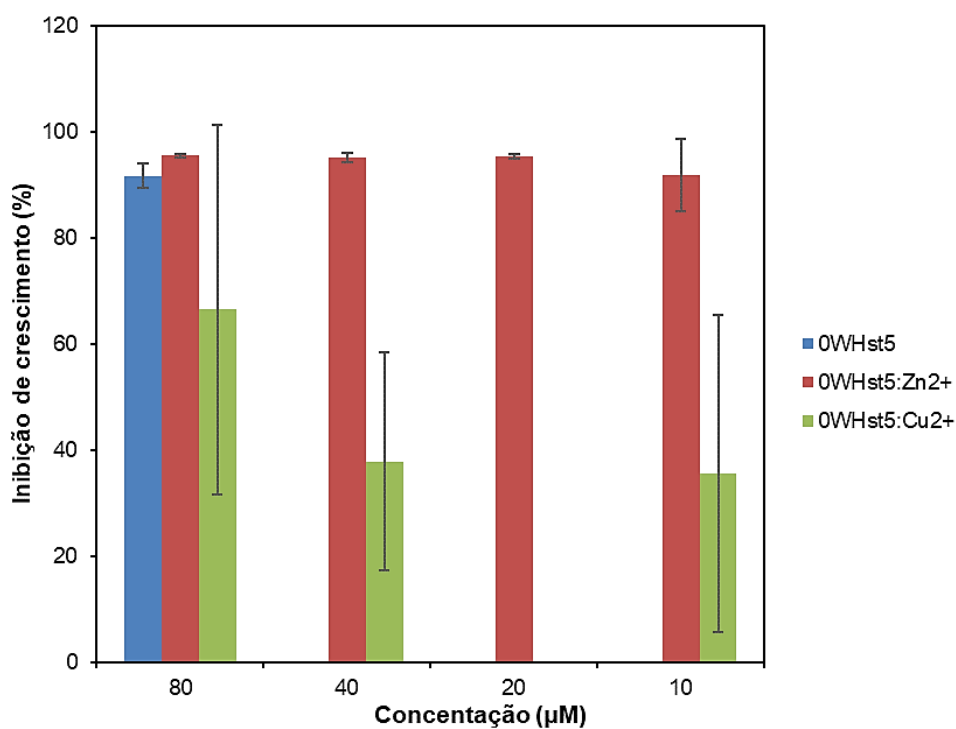


Figura 11. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de *C. albicans* ATCC 18804 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.

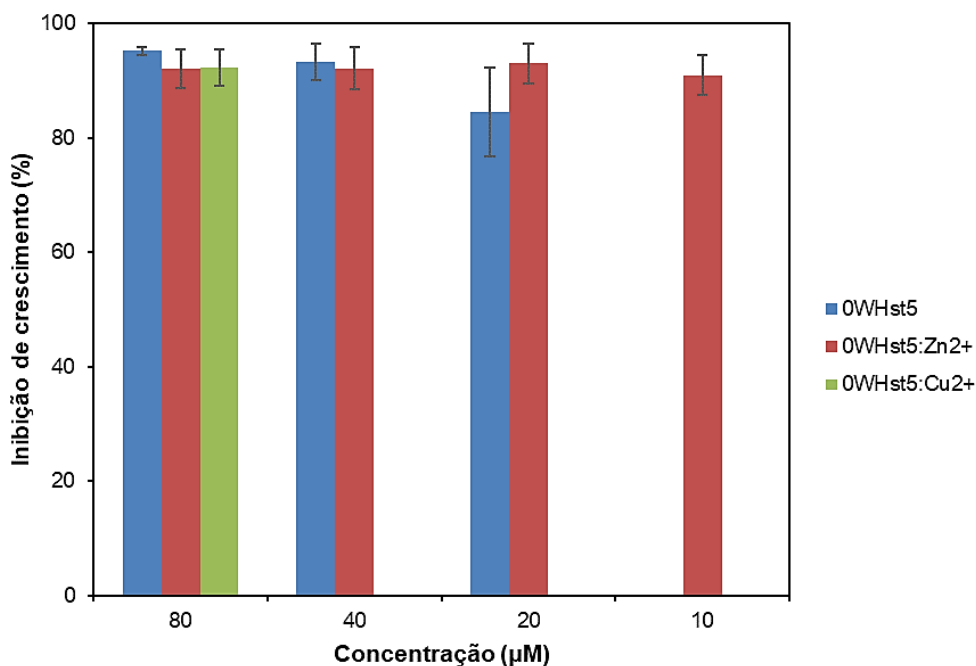
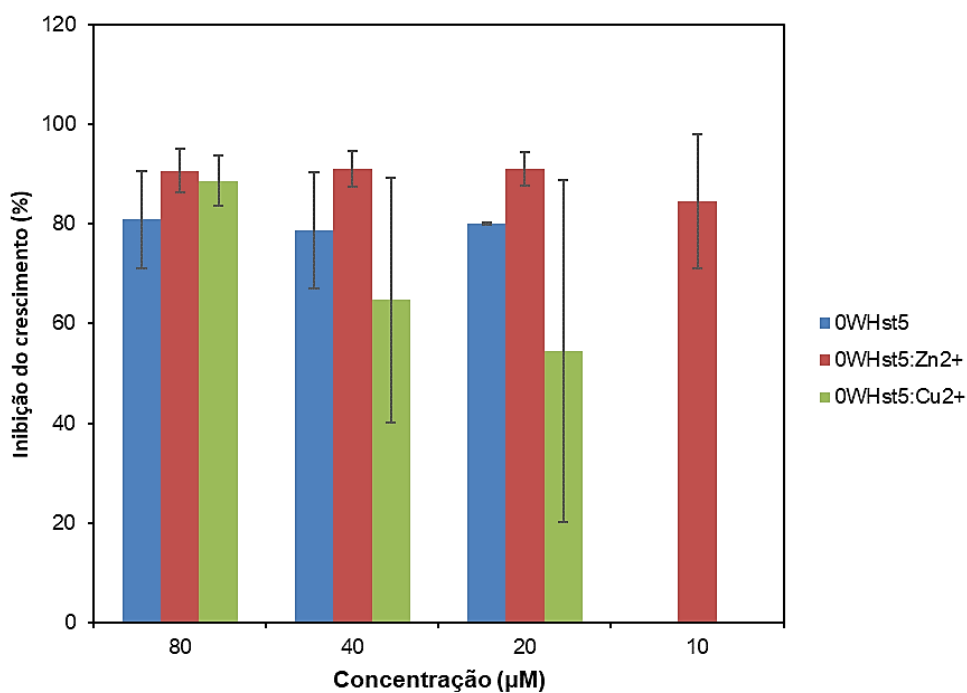


Figura 12. Comparação entre as porcentagens de inibição para a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 por concentração para o peptídeo 0WHistatina-5 e os metalopeptídeos formados.



5. CONCLUSÕES

Levando em consideração os resultados satisfatórios alcançados utilizando o complexo Zn:0WHistatina-5, podemos afirmar que ele possui um ótimo efeito antifúngico frente as três cepas utilizadas nos testes e que são frequentemente encontradas nas infecções causadas por *C. albicans*.

Ainda são necessários mais estudos e testes mais aprofundados como de citotoxicidade, constante de dissociação, análises para determinar a estrutura e conformação dos complexos. Tais testes são necessários para entender o comportamento desses metalopeptídeos e os mecanismos de ação promovidos pelos mesmos, o que pode representar uma alternativa viável para o tratamento de transtornos na saúde bucal causadas por fungos do gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

- 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*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4777–4784, Set., 2002.
- BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237–245, Jul., 2017.
- 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
- CHEN, H.; ZHOU, X.; REN, B; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*, **Virulence**, , v. 11, n.1, p. 337-348, DOI: 10.1080/21505594.2020.1748930
- CONKLIN, S. E.; BRIDGMAN, E. C.; SU Q.; RIGGS-GELASCO, P.; HAAS K.; FRANZ K. J. Specific Histidine Residues Confer Histatin Peptides with Copper-Dependent Activity against *Candida albicans*. **Physiology & Behavior**, V. 176, n. 3, p. 139-148, 2017.
- FISHER M.C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 742, n. May, p. 739–742, May., 2018.
- 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
- GUSMAN, H.; LENDENMANN U.; GROGAN J.; TROXLER R. F.; OPPENHEIM F. G. Is salivary histatin 5 a metalloprotein? **Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology**. v. 1545, n. 1-2, p. 86-95, 2001. 2001.
- HAN, J.; JYOTI, M. A.; SONG, H.-Y.; JANG, W. S. 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.

HARFORD, C.; SARKAR, B. Amino terminal Cu (II)-and Ni (II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. **Accounts of chemical research**, v. 30, n. 3, p. 123-130, 1997.

HELMERHORST, E. J.; BREEUWER, P.; VAN 'T HOF, W.; WALGREEN-WETERINGS, E.; OOMEN, L. C. J. M.; VEERMAN, E. C. I.; AMERONGEN, A. V. N.; ABEE, T. The cellular target of Histatin 5 on *Candida albicans* Is the energized mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 7286–7291, Mar., 1999.

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

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.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

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.

MELINO, S.; SANTONE, C.; DI NARDO P.; SARKAR, B. Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs Perspectives for biomedical applications. **The FEBS Journal**, 2013. Sep., 2013.

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.

MOFFA, E. B.; MUSSI, M. C. M.; XIAO, Y.; GARRIDO, S. S.; MACHADO, M. A. A. M.; GIAMPAOLO, E. T.; SIQUEIRA, W. L. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–7, Aug., 2015.

ROBBINS, N., WRIGHT, G. D., AND COWEN, L. E. “Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents” in **Microbiology Spectrum** **4** (American Society of Microbiology), 903–922. doi: 10.1128/microbiolspec.Funk-0002-2016

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

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

SUN, N.; PARRISH, R. S.; CALDERONE, R. A.; FRONZI, W. A.; Unique, Diverged, and Conserved Mitochondrial Functions Influencing *Candida albicans* Respiration. **Molecular Biology and Physiology**, Vol. 10, Issue 3, e00300-19, 2019.

VARANO, N.; DE LIMA, M. F. M.; CARDOSO, I. R.; BARBOSA, G. G.; DE JESUS, L. L.; PRADO, C. R.; MARQUES, L. A.; SILVA, N. B. S.; RÖDER, D. D. B. Infecções por *Candida* spp em Pacientes Imunodeprimidos. **Journal of Infection Control**, Ano VII, Vol. 8, No. 1, Mai., 2019.