

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**THAÍS REICHERT**

**Análogos sintéticos da Cheferina I: interação com íons metálicos divalentes e o seu efeito na internalização celular e nas atividades anticandida e candidacida**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**15/10/2018**

THAÍS REICHERT

**Análogos sintéticos da Cheferina I: interação com íons metálicos divalentes e o seu efeito na internalização celular e nas atividades anticandida e candidacida**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Profª Dra. Maria Teresa Machini*

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R349a Reichert, Thais  
Análogos sintéticos da Cheferina I: interação com íons metálicos divalentes e o seu efeito na internalização celular e nas atividades anticandida e candidacida / Thais Reichert. - São Paulo, 2018. 126 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Machini, Maria Teresa

1. Peptídeos Antimicrobianos. 2. Ação Fungicida. 3. Bioquelantes de Metal. 4. "Cell Penetrating Peptide". 5. Motivo GGH. I. T. II. Machini, Maria Teresa, orientador.



**Aos meus queridos e amados Magaly e Curt  
Reichert, sem os quais eu não seria nada.**

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo carinho e torcida, em especial à minha mãe Magaly, ao meu pai Curt e irmão Henrique Reichert pela tolerância, paciência e apoio que me possibilitaram chegar aqui.

Ao meu namorado Guilherme H. P. da Silva por seu amor e carinho e pela constante ajuda, incentivo e suporte.

À Profa. Dra. Maria Terêsa Machini pela oportunidade do Mestrado, pelos ensinamentos, desafios e principalmente pela amizade, paciência, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Breno P. Espósito pela oportunidade de aprendizado, paciência e auxílio.

A todos os colegas que tive contato no Laboratório de Química de Peptídeos (Cesar Remuzgo, Cleber W. Liria, Doris Araújo, Gabriel Saraiva, Gustavo Nunes, Luis R. Pizzolato, Marcos Sulca, Nancy O. Shinagawa, Thaina Lima e Vitor Ungaro) pela colaboração, cooperação e por me mostrarem a importância do trabalho em equipe, do bom convívio e de uma boa risada, que suavizam qualquer problema de bancada.

Ao Dr. César Remuzgo pela paciência, ensinamentos, auxílio e amizade.

Ao Dr. Cleber W. Liria por seus conhecimentos, paciência, auxílio, análises de última hora e principalmente pela amizade e intervalos de café (somente às 16h).

À Nancy O. Shinagawa pela paciência em me ensinar quando iniciei, mas em especial pela sua amizade, conversas, conselhos e risadas.

À Doris Araújo pela sua infinita generosidade, conselhos, paciência, carinho e amizade.

A todos meus queridos amigos (Caio Bezerra, Cheila Gomes, Douglas Moraes e Thays Oliveira) pelas conversas, especialmente no bandeco, e pela ajuda nesta jornada cheia de desafios e complicações, mas também de realizações, amadurecimento e diversão!

Ao Prof. Dr. Alessandro Rodrigues, professor na minha graduação na UNIFESP, minha gratidão pela ajuda e conselhos que me levaram até o Mestrado no IQ-USP.

À Marina Valente Navarro pela ajuda, amizade e paciência na parte microbiológica.

Aos Profs. do Depto. de Bioquímica do IQ-USP que contribuíram para a minha formação.

À Secretaria de Pós-Graduação e funcionários do IQ-USP, em especial à Ilda de Souza Costa pelas excelentes aulas de Yoga.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo financiamento.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As dificuldades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

**Chico Xavier**

## RESUMO

Reichert, T. **Análogos sintéticos da Cheferina I: interação com íons metálicos divalentes e o seu efeito na internalização celular e nas atividades anticandida e candidacida.** 2018. 126p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana e a consequente seleção de microrganismos multirresistentes consolidam-se como grandes ameaças à saúde global. Neste contexto, a busca por novas drogas antimicrobianas/microbicidas é fundamental e compostos como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) tornaram-se alvos atraentes. Os AMPs são compostos químicos de massa molar média e grande diversidade estrutural, produzidos por todos os seres vivos e com capacidade de inibir o crescimento de e/ou matar microrganismos. O AMP *Cheferina I* (*Chef I*) foi isolado das raízes de *Capsella bursa-pastoris* e é resultado da proteólise de uma proteína da família das proteínas ricas em glicina, que em plantas estão relacionadas às funções de defesa e cicatrização. O nosso grupo de pesquisa foi pioneiro no desenvolvimento e estudo de análogos truncados amidados deste AMP atípico rico em glicina (67,9%) e histidina (28,6%), que se mostraram ativos frente às diferentes cepas de *Candida* e a *S. cerevisiae* pela internalização/ação celular acompanhada de manutenção da integridade da membrana plasmática; o análogo amidado (*Chef Ia*) e o análogo marcado com 5(6)-carboxifluoresceína/FAM (*FAM-Chef Ia*) tiveram as suas atividades antifúngicas potencializadas por íons  $Zn^{2+}$ . Este trabalho deu continuidade ao estudo do efeito dos íons metálicos divalentes  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  nas atividades anticandida/fungistática e candidacida/fungicida a diferentes pHs e forças iônicas, estruturas e localizações intracelulares destes análogos. Os resultados na ausência de íons em pH 5,1 revelaram maior atividade do análogo fluorescente em relação à do não fluorescente. Neste mesmo pH, as atividades anticandida e candidacida de *Chef Ia* foram influenciadas negativamente pelos íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (2-4 vezes) enquanto que, na presença de íons  $Zn^{2+}$  as atividades anticandida de ambos os análogos foram aumentadas (*Chef Ia*: 8-64 vezes; *FAM-Chef Ia*: 4-32 vezes). Os íons  $Cu^{2+}$  aumentaram a atividade anticandida de *Chef Ia* (2-4 vezes), mas não a do análogo fluorescente, mas as atividades candidacidas de ambos foram melhoradas (*Chef Ia*: 2-8 vezes; *FAM-Chef Ia*: 2 vezes). Em pH 5,1, os íons  $Zn^{2+}$  mantiveram a atividade anticandida de *Chef Ia* em alta força iônica, mas só *FAM-Chef Ia* exibiu atividade candidacida. Em pH 7,4 ambos análogos foram inativos em baixa e alta forças iônicas na ausência e presença de  $Zn^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ . As maiores porcentagens de folhas- $\beta$ -antiparalelas e dobras foram observadas no espectro de DC de *Chef Ia* em pH 7,4, sendo que aqueles registrados em pH 5,1 e 7,4 em presença de íons  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  indicaram a formação de quelatos estruturalmente distintos. Ambos os peptídeos são bioquelantes em potencial, sendo as proporções peptídeo: íon obtidas as seguintes: *FAM-Chef Ia* = 1:2 para  $Cu^{2+}$ , 1:10 para  $Zn^{2+}$ ; *Chef Ia* = 1:1 para  $Cu^{2+}$ . A análise da internalização celular de *FAM-Chef Ia* permitiu a suposição de dois mecanismos de internalização (translocação direta e endocitose), sendo que nas células vivas a presença de  $Zn^{2+}$  afetou negativamente a translocação direta (p 0,0343) e potencializou a endocitose (p 0,0002).

**Palavras-chave:** peptídeos antimicrobianos, ação fungicida, bioquelantes de metal, "Cell Penetrating Peptide", motivo GGH.

## ABSTRACT

Reichert, T. **Synthetic analogues of Shepherin I: interaction with metal divalent ions and their effect on cellular internalization and on anticandidal/candidacidal activities.** 2018. 126p. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The development of antimicrobial resistance and the consequent selection of multiresistant microorganisms have become major threats to global health. In this context, the search for new antimicrobial/microbicidal drugs is crucial and the antimicrobial peptides (AMPs) have been seen as attractive targets. AMPs are chemical compounds of medium molecular mass and high structural diversity produced by all living beings, capable of inhibiting the growth of microorganisms and killing them. The AMP Shepherin I (*Shep I*) was isolated from the roots of *Capsella bursa-pastoris*, being a bioactive peptide encrypted in a glycine-rich protein from a family that in plants are strictly related to defense and healing functions. Our research group has pioneered the development and study of amidated truncated analogues of this atypical glycine- (67.9%) and histidine-rich (28.6%) AMP, which has shown activity against different strains of *Candida* and *S. cerevisiae* through cellular internalization with maintenance of the plasma membrane integrity. The amide analogue (*Chef Ia*) and its fluorescent analog labeled with 5 (6) - carboxyfluorescein / FAM (*FAM-Chef Ia*) had their antifungal activities potentiated by  $Zn^{2+}$  ions, so the present work continued examining the effect of the divalent metallic ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on the anticandidal/fungistatic and candidacidal/fungicide activities at different pHs and ionic forces, structures and intracellular locations of these analogues. The results in the absence of those ions at pH 5.1 revealed that the fluorescently labelled analog was more potent than the non-fluorescent. At the same pH, *Shep Ia* anticandidal and candidacidal activities were negatively influenced by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions (2-4 fold), whereas in the presence of  $Zn^{2+}$  ions the anticandidal activities of both analogues were increased (*Shep Ia*: 8-64 fold, *FAM-Shep Ia*: 4-32 fold).  $Cu^{2+}$  ions increased *Shep Ia* anticandidal activity (2-4 fold) but not that of *FAM-Shep Ia*, nevertheless, the candidacidal activities of both analogues were increased (*Shep Ia*: 2-8 fold, *FAM-Shep Ia*: 2 fold). Also at pH 5.1, the  $Zn^{2+}$  ions helped retaining the anticandidal activity of *Shep Ia* at high ionic strength, although only *FAM-Shep Ia* exhibited candidacidal activity. At pH 7.4 both analogues were inactive at low and high ionic strengths in the absence or presence of  $Zn^{2+}$  or  $Cu^{2+}$ . The highest percentages of antiparallel  $\beta$ -sheet and turns were observed in *Shep Ia* CD spectrum at pH 7.4, while those recorded at pH 5.1 and 7.4 in the presence of  $Zn^{2+}$  or  $Cu^{2+}$  ions indicated the formation of structurally different chelates. Both peptides are potential biochelators, with the following peptide:ion ratios: *FAM-Shep Ia* = 1: 2 for  $Cu^{2+}$ , 1:10 for  $Zn^{2+}$ ; *Shep Ia* = 1: 1 for  $Cu^{2+}$ . The analysis of the cellular internalization of *FAM-Chef Ia* allowed the assumption of two mechanisms of internalization (direct translocation and endocytosis) and in the living cells the presence of  $Zn^{2+}$  negatively affected the direct translocation (p 0.0343) and potentiated endocytosis (p 0.0002).

**Key words:** antimicrobial peptides, fungicidal action, metal biochelators, "Cell Penetrating Peptide", GGH motif.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Código de uma e três letras para os vinte aminoácidos usuais

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

<b>AMP</b>	peptídeo antimicrobiano
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>BOP</b>	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino) fosfônio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>Chef I</b>	cheferina I
<b>Chef Ia</b>	cheferina I amidada
<b>CLEAR</b>	resina com ligações cruzadas de etoxileno e acrilamida
<b>CMAC-Blue</b>	marcador de vacúolo intracelular
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cobre II
<b>DC</b>	dicroísmo circular
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DIC</b>	N,N'-diisopropilcarbodiimida
<b>DIPEA</b>	N,N'-diisopropiletilamina
<b>DMF</b>	N,N'-dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>FAM</b>	5-(6) carboxifluoresceína
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetiloxycarbonil
<b>GRP</b>	proteína rica em glicina
<b>HBS</b>	tampão HEPES com solução salina tratado com Chelex <sup>®</sup>
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HOBt</b>	N-hidroxibenzotriazol
<b>IFI</b>	infecção fúngica invasiva
<b>LC/ESI-MS</b>	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MFC</b>	concentração fungicida mínima
<b>MIC</b>	concentração mínima inibitória
<b>OBu<sup>t</sup></b>	éster t-butílico
<b>PBC</b>	tampão fosfato-borato-citrato
<b>PBS</b>	tampão fosfato de sódio
<b>PDB</b>	meio de cultura <i>potato dextrose broth</i> (caldo de dextrose de batata)
<b>PS</b>	poliestireno
<b>Rink amida</b>	resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoximetil
<b>RP-HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
<b>SPFS</b>	síntese de peptídeos em fase sólida
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>TFE</b>	trifluoretanol
<b>TIS</b>	triisopropilsilano
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	cloreto de zinco

# ÍNDICE

1. Introdução.....	13
1.1. Infecções fúngicas .....	13
1.1.1. A problemática do gênero <i>Candida</i> .....	17
1.2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) .....	19
1.2.1. AMPs ricos em glicina e histidina .....	24
1.2.2. Cheferina I .....	26
1.2.3. Determinação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos modos de ação de AMPs e/ou CPPs .....	30
1.3. Potencial terapêutico dos peptídeos.....	33
1.4. A importância da síntese de peptídeos para AMPs/CPPs.....	36
2. Objetivos .....	38
3. Materiais e Métodos Gerais .....	39
3.1. Materiais.....	39
3.2. Métodos Preparativos .....	40
3.2.1. Síntese de Peptidil-Resinas e FAM-Peptidil-resina.....	40
3.2.2. Clivagem dos peptídeos das Resinas e Desproteção Total.....	42
3.3. Métodos analíticos .....	43
3.3.1. Caracterização dos peptídeos brutos e purificados .....	43
a) Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC).....	43
b) Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/ESI-MS).....	44
c) Hidrólise total e análise de aminoácidos dos hidrolisados .....	44
3.4. Purificação dos Peptídeos Brutos.....	45
3.5. Ensaio Biológicos.....	46
3.5.1. Atividade Antifúngica .....	46
3.5.2. Atividade Antifúngica em meio tamponado.....	47
3.5.3. Atividade Antifúngica em alta força iônica com meio tamponado e não tamponado .....	47
3.5.4. Atividade Fungicida .....	48
3.6. Análise do efeito de <i>FAM-Chef Ia</i> em células de <i>Candida parapsilosis</i> .....	48
3.7. Análises por espectroscopia de dicroísmo circular .....	51
3.8. Modelo espacial teórico do peptídeo <i>Chef I</i> .....	51
3.9. Interação dos peptídeos <i>FAM-Chef Ia</i> e <i>Chef Ia</i> com íons $\text{Cu}^{2+}$ por espectroscopia eletrônica no ultravioleta/visível e fluorimetria.....	52
4. Resultados e Discussão.....	53

4.1.	Purificação e caracterização química dos peptídeos .....	53
a)	Cheferina I e Cheferina I a .....	54
a)	FAM-Chef Ia, FAM-Chef I(3-28)a e FAM-Chef I(6-28)a.....	54
4.2.	Bioensaios .....	54
4.2.1.	Considerações gerais .....	54
a)	Cepa de <i>Candida</i> utilizada .....	54
b)	Meios de cultura usados.....	56
c)	Íons $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ usados.....	60
d)	Bioensaios em meio não tamponado ou tamponado .....	63
e)	Agentes antimicrobianos-controle .....	63
4.2.2.	Bioensaios com <i>Chef Ia</i> ou <i>FAM-Chef Ia</i> em meio não tamponado.....	65
a)	Na ausência de íons divalentes metálicos .....	65
b)	Na presença de íons metálicos divalentes $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ .....	67
4.2.3.	Bioensaios com <i>Chef Ia</i> ou <i>FAM-Chef Ia</i> em meio tamponado .....	75
4.2.4.	Bioensaios com <i>Chef Ia</i> ou <i>FAM-Chef Ia</i> em meios não tamponado ou tamponados de alta força iônica.....	78
4.3.	Análise do efeito de <i>FAM-Chef Ia</i> em células vivas ou fixadas de <i>C. parapsilosis</i> .....	81
4.4.	Análises por espectroscopia de dicroísmo circular .....	91
4.5.	Modelo espacial teórico do peptídeo <i>Chef I</i> e a interação com $\text{Zn}^{+2}$ e $\text{Cu}^{2+}$ .....	98
4.6.	Estudo da interação dos peptídeos <i>FAM-Chef Ia</i> e <i>Chef Ia</i> com íons $\text{Cu}^{2+}$ por espectroscopia eletrônica no ultravioleta/visível e por fluorimetria.....	101
5.	Conclusões .....	107
6.	Referências Bibliográficas.....	112
7.	Apêndices .....	127
	SÚMULA CURRICULAR .....	141

## 1. Introdução

### 1.1. Infecções fúngicas

A descoberta de drogas antibióticas possibilitou o combate às epidemias bacterianas, levando a uma redução significativa das taxas de mortalidade (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Entretanto, infecções causadas por fungos patogênicos não diminuíram e se tornaram cada vez mais frequentes, sendo *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* seus principais gêneros causadores (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

De uma maneira geral, os agentes infecciosos podem ser “primários” ou “oportunistas”, sendo que no primeiro caso os microrganismos são capazes de infectar pessoas saudáveis e no segundo, eles rompem a relação de comensalismo com o hospedeiro para infectar indivíduos, que majoritariamente possuem imunodeficiência (p.ex. câncer, diabetes, AIDS, transplante de órgãos e outros procedimentos cirúrgicos invasivos) (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; KABIR; AHMAD, 2013). A **Tabela 1** relaciona algumas infecções fúngicas, sua localização, tipos de patógenos, gêneros mais frequentes e taxas de incidência.

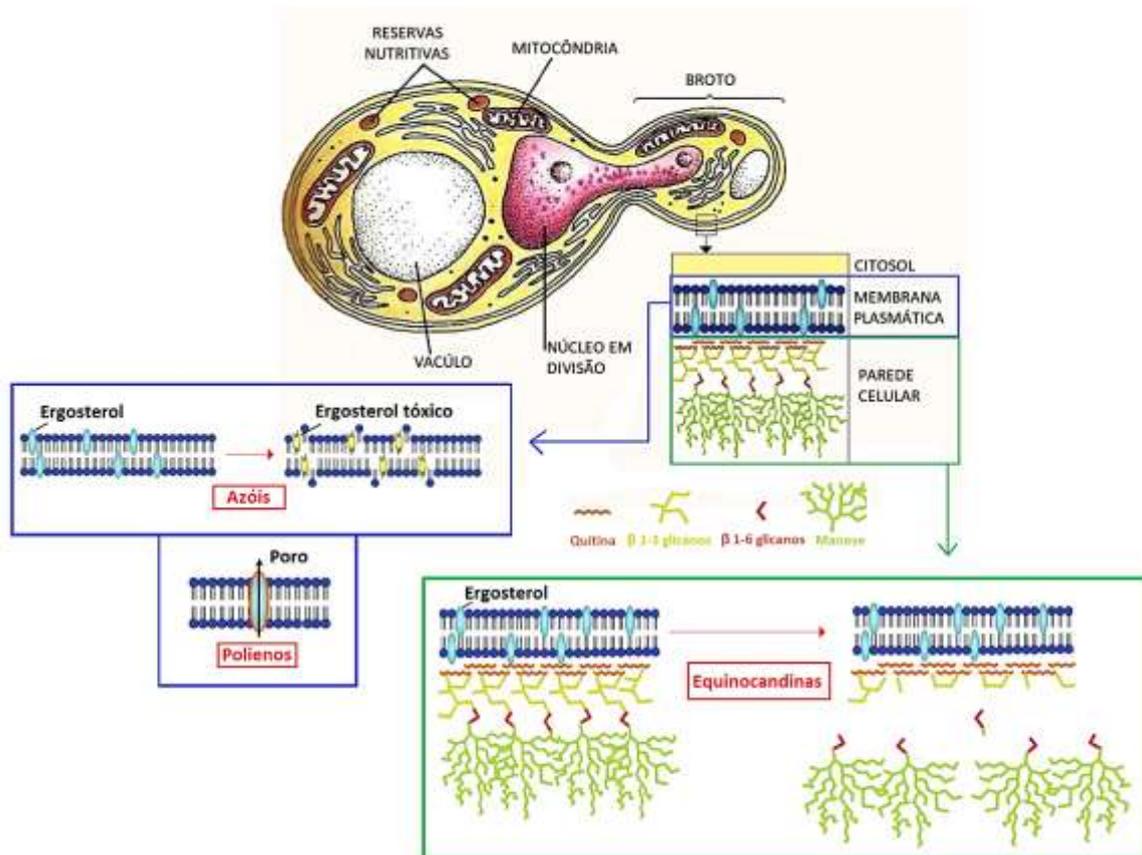
**Tabela 1.** Características gerais das principais infecções fúngicas. Adaptado de VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012.

Localização	Tipo patógeno	Órgão	Gêneros mais frequentes	Taxa estimada de incidência (casos/ano)
Superficial	Primário	Pele e cabelo	<i>Malessezia</i> <i>Trichophyton</i>	140.000.000
Cutânea	Primário	Pele e unhas	<i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>	1.500.000.000
Mucosa	Oportunista	Vagina	<i>Candida</i>	75.000.000
		Trato digestivo	<i>Aspergillus</i>	9.500.000
Sistêmica	Oportunista	Trato urinário e olhos	<i>Fusarium</i>	1.000.000
		Qualquer órgão	<i>Candida</i>	300.000
		(pulmão, cérebro, corrente sanguínea, etc.)	<i>Aspergillus</i> <i>Cryptococcus</i>	350.000 1.000.000

O combate aos fungos patogênicos é limitado às três classes principais de antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos; **Tabela 2**), que apresentam alvos/ações específicas (**Figura 1**) envolvendo a estabilidade ou síntese da parede celular ou membrana plasmática (PERLIN, 2007).

**Tabela 2.** Tipos de agentes antifúngicos seus modos de ação/alvos intracelulares e nome dos compostos (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Agente antifúngico	Modo de ação e alvo celular	Compostos
Azóis	Inibição da síntese de ergosterol, ligação à enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase	Cetoconazol Fluconazol Miconazol
Equinocandinas	Inibição da síntese da parede celular, ligação à enzima $\beta$ (1-3) glicano-sintase	Anidulafungina Caspofungina Micafungina
Polienos	Formação de poros na membrana plasmática, ligação a ergosterol	Anfotericina B Natamicina Nistatina



**Figura 1.** Célula fúngica e suas organelas indicando os alvos dos antifúngicos. *Adaptado de COWEN; STEINBACH, 2008.*

Além de estas infecções apresentarem profundo impacto à saúde humana global, elas também afetam a segurança alimentar e biodiversidade, levando a perda anual de aproximadamente 125 milhões de toneladas de arroz, trigo, milho, batata ou soja (FISHER et al., 2013). Neste contexto, também podemos incluir as infecções fúngicas invasivas (IFI-infecções disseminadas na corrente sanguínea), que além de apresentarem difícil diagnóstico, são caracterizadas por elevadas taxas de mortalidade (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Algumas IFIs, gêneros mais frequentes e taxas de mortalidade. *Adaptado de BROWN et al., 2012; ANTINORI; CORBELLINO; PARRAVICINI, 2018.*

	Gênero mais frequente	Taxa de mortalidade (%)
<b>Aspergilose</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	46 - 97
<b>Candidemia</b>	<i>Candida albicans</i>	40 - 65
<b>Criptococose</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	20 - 70
<b>Pneumocistose</b>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	20 - 80
<b>Mucormicose</b>	<i>Rhizopus oryzae</i>	30 - 90

As IFIs apresentaram custo anual estimado em mais de 46 mil dólares nos EUA em 2016 (STROLLO et al., 2016) e de 51 mil euros na Europa (DRGONA et al., 2014). Já o gasto anual com agentes antifúngicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil totalizou mais de 56 mil reais segundo estudo realizado em um hospital universitário nos primeiros trimestres dos anos de 2014 a 2016 (SILVA et al., 2018).

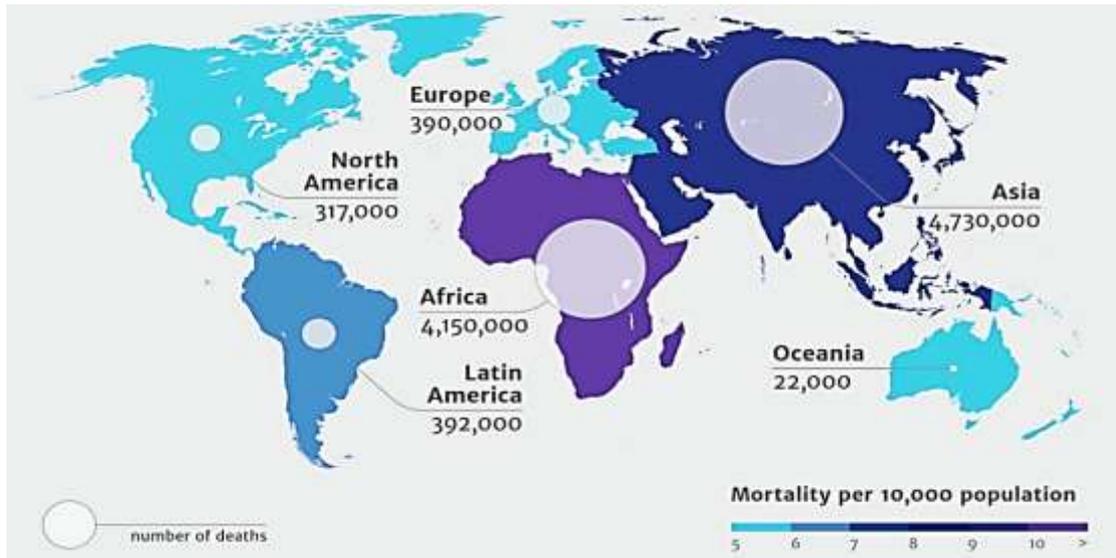
Entretanto, diversos fungos patogênicos apresentam resistência aos antifúngicos comerciais através de mecanismos específicos de resistência, que podem envolver uma resistência primária ou adquirida (ODDS, 1993; SANGULARD, 2002; PATEL; ZARO; SHEN, 2007; PERLIN, 2007; WHO, 2014; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; REVIE et al., 2018). Na resistência adquirida há a expressão de genótipos selecionados, isto é os genes responsáveis pela resistência

são selecionados ao longo do tempo, através da seleção natural, e passam a ser expressos em todas as gerações seguintes deste patógeno, que além de resistente representa uma preocupação à saúde global (SANGLARD, 2002; SOBEL; AKINS, 2017).

De uma forma geral, alguns mecanismos de resistência envolvem a anulação dos efeitos da droga antimicrobiana na célula, tais como alterações estruturais/químicas no alvo ou metabólicas, através da diminuição da toxicidade do fármaco. Outras estratégias podem envolver uma maior expressão de transportadores membranares, a fim de ejetar o fármaco para fora da célula e/ou ativação de cascatas de transdução de sinal, que aumentam/melhoram a resposta do patógeno frente à droga antimicrobiana (PERLIN, 2007; COWEN; STEINBACH, 2008; REVIE et al., 2018).

Neste contexto, o aparecimento de espécies com alto grau de resistência, como os microrganismos “*multidrug resistant*”, representam uma grande ameaça à saúde global e a prevalência destes patógenos ocasionará 10 milhões de mortes/ano até o ano de 2050, sendo 4,73 milhões destes provenientes da Ásia e 4,15 milhões da África (**Figura 2**) (O’NEILL, 2014, 2016; DA CUNHA et al., 2017).

Um exemplo recente é o surgimento da *Candida auris*, uma levedura multirresistente ligada às IFIs, que além de elevadas taxas de mortalidade, apresenta cepas com resistência a todas as classes de antifúngicos comerciais (LOCKHART et al., 2017; UPPULURI; KHAN; EDWARDS, 2017; KORDALEWSKA et al., 2018; REVIE et al., 2018). Em março de 2017, através de um comunicado de risco, a ANVISA informou os surtos e enfatizou o perigo e a importância na identificação e combate deste patógeno (BRASIL. ANVISA., 2017).



**Figura 2.** Escala global de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana (AMR) em 2050. Retirado de: O'NEILL, 2014.

### 1.1.1. A problemática do gênero *Candida*

O gênero *Candida* se apresenta predominantemente sob a forma leveduriforme (leveduras unicelulares de 4 a 6  $\mu\text{m}$ ; **Figura 1**), se reproduz por brotamento de forma assexuada, sendo, atualmente, conhecidas 150 espécies deste gênero (CHAFFIN et al., 1998; PINHATI, 2015). Estes microrganismos são comuns na microbiota humana, sendo encontrados no tubo gastrointestinal em 20% a 80% da população adulta saudável e sobrevivem através de uma relação de comensalismo, onde um dos envolvidos, comensal ou hospedeiro, se beneficia sem afetar positiva ou negativamente o outro (PAPPAS, 2006).

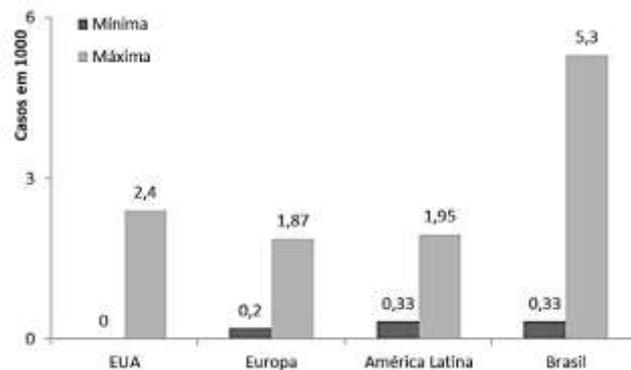
Desta forma, as leveduras do gênero *Candida* são predominantemente comensais e se tornam patogênicas oportunistas através de alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou comprometimento de barreiras anatômicas e/ou procedimentos cirúrgicos invasivos, originando uma infecção por *Candida* ou candidíase (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007). Os três tipos mais frequentes de candidíase incluem a esofagiana, vulvovaginal e invasiva/candidemia (IFIs). Elas acometem diferentes tipos de pacientes e, na sua maioria, envolvem

predominantemente a *C. albicans* (SOBEL; AKINS, 2017). Entretanto, nos últimos anos, esta última vem sendo ocasionada por espécies não-*albicans* (**Tabela 4**) (UPPULURI; KHAN; EDWARDS, 2017).

**Tabela 4.** Tipos de candidíase seus grupos alvos e os patógenos relacionados. (SOBEL; AKINS, 2017)

Candidíase	Grupo alvo	Agente
Esofagiana	Imunodeficientes	<i>Candida albicans</i>
Vulvovaginal	Imunocompetentes	<i>C. albicans</i>
Invasiva/candidemia	Ambos	<i>C. albicans</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. parapsilosis</i> ; <i>C. tropicalis</i>

As taxas de incidência de candidemia variam conforme a região geográfica, clima e centro médico avaliado. O Brasil se destaca pela elevada taxa de incidência desta infecção (0,33-5,3 casos em 1.000) (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008) em relação às demais áreas geográficas, sendo que dentre as regiões apresentadas a Europa apresenta uma menor taxa de incidência, de 0,22-1,87 casos em 1000 (**Figura 3**) (HEIMANN et al., 2014; YAPAR, 2014).



**Figura 3.** Taxas de incidência (casos em 1.000) de candidemia na América latina (COLOMBO et al., 2006), Europa (YAPAR, 2014), Estados Unidos da América (EUA) (PFALLER; DIEKEMA, 2007) e Brasil (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008) com seus valores mínimos e máximos.

É importante ressaltar, que os dados nacionais e populacionais são baseados em hospitais isolados e as discrepâncias entre incidência e epidemiologia ressaltam a necessidade de uma vigilância contínua a fim de monitorar as tendências de

incidência, distribuição de espécies e perfil de suscetibilidade às drogas antifúngicas (COLOMBO et al., 2006; YAPAR, 2014).

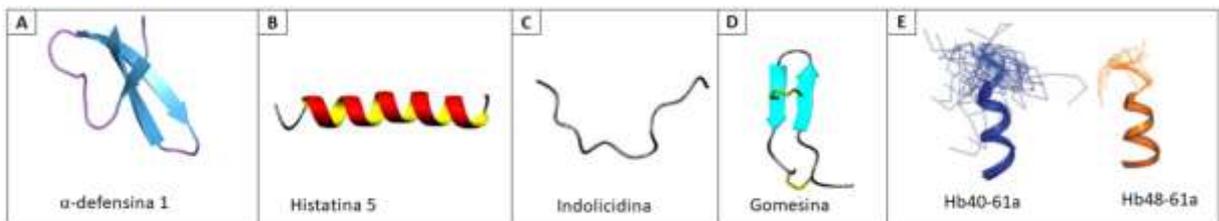
Globalmente os casos de candidemia acarretam no aumento do período de internação hospitalar do paciente e resultam em maiores gastos para os cofres públicos. Em nosso país, a candidemia apresenta taxas de mortalidade próximas de 50%, sendo que a grande maioria envolve *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (WHITEWAY; BACHEWICH, 2007; PINHATI, 2015). Desta forma, a importância médica/social e o estudo para o combate destes patógenos é fundamental e deve ser estimulada. Mais ainda, diversos estudos evidenciam a predominância de *C. parapsilosis* em seus isolados (COLOMBO et al., 2006; DA MATTA et al., 2007; WILLE et al., 2013; PINHATI et al., 2016; CANELA et al., 2018), sendo identificada como a segunda espécie mais comum de isolados da Ásia e América do Sul (COLOMBO et al., 2006; MEDRANO et al., 2006; DA MATTA et al., 2007; HINRICHSEN et al., 2008; PFALLER et al., 2010; MORII et al., 2014).

## **1.2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)**

Neste cenário, o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas vem sendo encorajado e os peptídeos antimicrobianos (AMPs) emergem como uma alternativa interessante (LI et al., 2012; DUTTA; DAS, 2016). Os AMPs são compostos químicos produzidos por todos os seres vivos que contém de 2 a 50 resíduos de aminoácidos e tem a capacidade de inibir o crescimento e/ou matar diversos microrganismos (bactérias, leveduras, vírus e parasitas) (NAKATSUJI; GALLO, 2012). Segundo o *Antimicrobial Peptide Database* <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>> existem 2.927 AMPs catalogados até o dia 23 de setembro de 2018, sendo 336 produzidos por

bactérias, 4 por arqueas, 8 por protistas, 16 por fungos, 343 por plantas e 2.220 por animais.

Os AMPs apresentam grande diversidade estrutural (**Figura 4**) e podem ser classificados em diversas categorias, como por exemplo, com base em suas estruturas secundárias (folha  $\beta$ ,  $\alpha$ -hélice, estendida/ randômica ou loop), com base em seus alvos biológicos (antiviral, antibacteriano, antifúngico ou antiparasitário), com base em seus mecanismos de ação (AMPs ativos em membrana ou com alvos intracelulares) e, por fim, com base na presença de certos resíduos de aminoácidos (ricos em prolina, histidina, glicina, etc.) ou em suas cargas líquidas (AMPs neutros, aniônicos ou catiônicos) (BROGDEN, 2005; BAHAR; REN, 2013; BECHINGER; GORR, 2017; SUN et al., 2017).

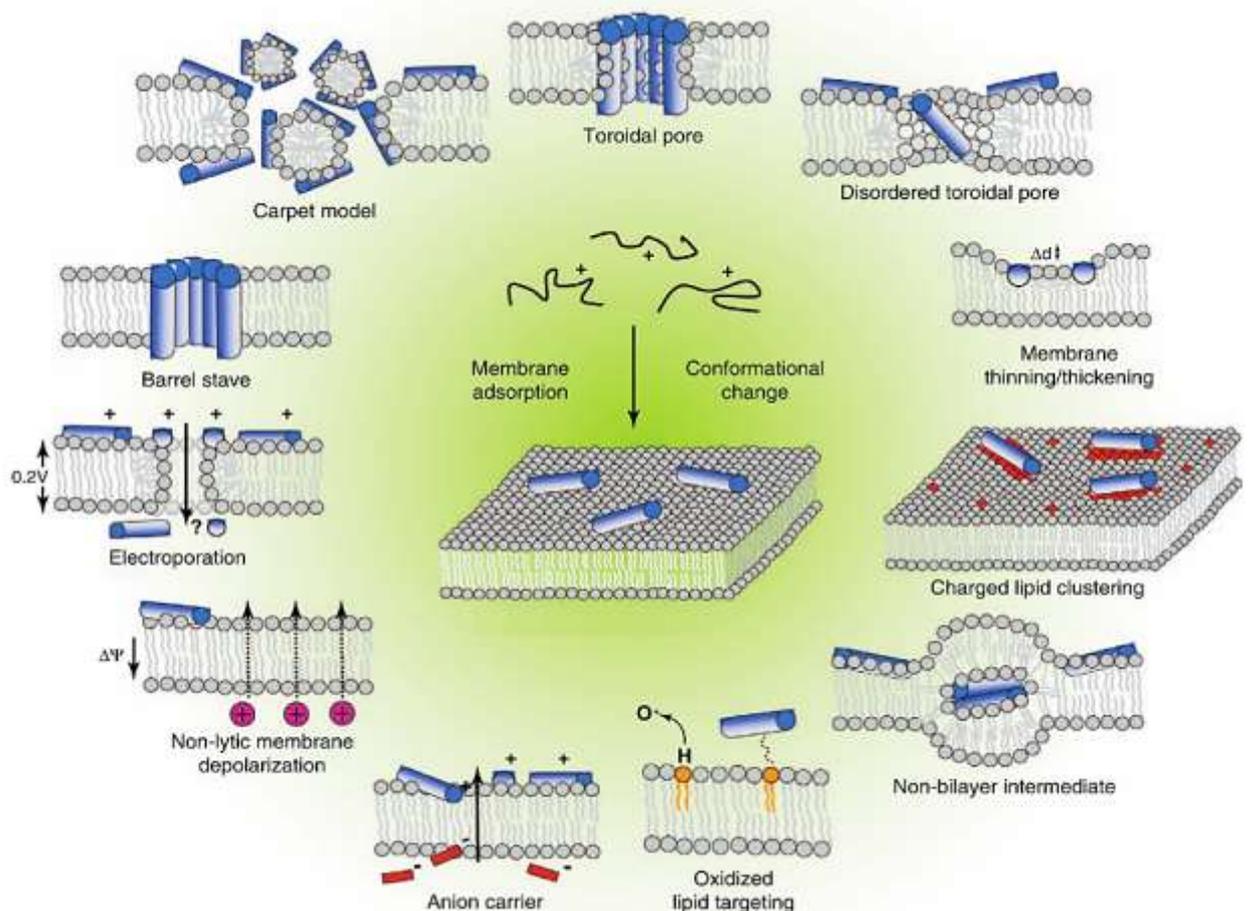


**Figura 4.** Estruturas secundárias dos AMPs e exemplos. (A) folha- $\beta$  pregueada (GANZ, 2003); (B)  $\alpha$ -hélice (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006); (C) estendida (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006); (D)  $\beta$ -hairpin (MANDARD et al., 2002); (E) composta ( $\beta$ -hairpin e  $\alpha$ -hélice)(MACHADO et al., 2007).

A ação antimicrobiana destes compostos é resultado da atividade direta na parede celular/membrana plasmática e/ou em alvos intracelulares (p.ex. síntese de biopolímeros envolvidos em funções intracelulares vitais). São descritos diversos mecanismos de ações para os AMPs (**Figura 5**), sendo que para aqueles com ação direta em parede celular/membrana plasmática, são aceitos três principais modelos de ação: poro toroidal, ripas de barril e carpete, sendo que nos dois primeiros modelos há a necessidade de formação de poros (HANCOCK; DIAMOND, 2000; BECHINGER; GORR, 2017).

A maioria dos AMPs catiônicos exibe um equilíbrio entre os resíduos de aminoácidos básicos (polares) e os hidrofóbicos (apolares), que possibilitam a formação de uma estrutura anfipática (**Figura 5**), sendo que o ponto crucial para estes AMPs é a interação eletrostática entre o peptídeo e os constituintes da membrana plasmática carregados negativamente (fosfolípidios) (PÄRN; ERISTE; LANGEL, 2015). No modelo poro toroidal os peptídeos se inserem verticalmente à membrana causando a desorganização lipídica (**Figura 5**).

No modelo “ripas de barril” o peptídeo forma um poro transmembranar tipo barril através da disposição de suas regiões hidrofóbicas orientadas para o núcleo lipídico da bicamada, isto é, o peptídeo se insere na membrana de forma a não

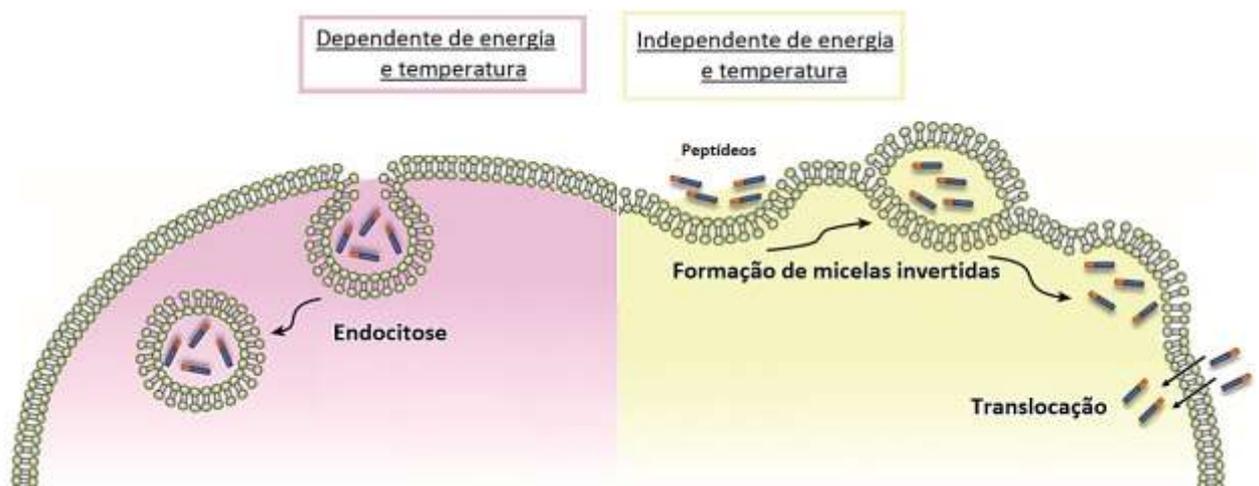


**Figura 5.** Representação esquemática de alguns dos modelos de ação aceitos para os AMPs. *Retirado de: NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011.*

promover a desorganização lipídica, como é o caso do modelo poro toroidal (**Figura 5**). O AMP alameticina é o único peptídeo descrito com tal modelo de ação (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017).

Já no modelo tapete os AMPs se dispõem paralelamente a membrana plasmática até formarem um agregado com alta densidade (tapete) (**Figura 5**). Em uma concentração criticamente alta de AMP, a estrutura da bicamada é perdida (por efeitos eletrostáticos ou detergentes/ *detergent-like*), levando à formação de fragmentos da membrana ou micelas.

Nos três modelos aceitos o AMP leva à morte por extravasamento do conteúdo citoplasmático e/ou de íons como cloro, potássio e sódio e/ou ocasionando desequilíbrio osmótico celular (LI et al., 2017). Entretanto, alguns AMPs são capazes de penetrar a célula sem causar danos à membrana plasmática (*Cell-Penetrating Peptides* – CPPs). Para eles são aceitos dois mecanismos de ação celular (**Figura 6**): modo independente de energia (formação de poros transitentes/temporários, micelas invertidas e translocação) e modo dependente de energia (macropinocitose e endocitose) (GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2017).



**Figura 6.** Representação esquemática de dos modos de ação dependente (esq.) ou independente (dir.) de energia e temperatura descritos para os CPPs. *Adaptado de: GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2017.*

Os CPPs apresentam grande interesse terapêutico devido à sua capacidade de carregar diversos *cargos*. A diversidade de *cargos* vai desde proteínas (WHEELER; DUNSMORE; WONG, 2003; GROS et al., 2006; DESHAYES et al., 2008; LEHTO et al., 2017), peptídeos (SIMÕES et al., 1998; GUPTA; LEVCHENKO; TORCHILIN, 2005; TURNER et al., 2005; SHIRAIISHI; BENDIFALLAH; NIELSEN, 2006), oligonucleotídeos *antisense* (JÄRVER; MÄGER; LANGEL, 2010; TRABULO et al., 2010; KANG et al., 2017), lipossomos (TSENG; LIU; HONG, 2002; HYNDMAN et al., 2004; ZHANG et al., 2006), nanopartículas (GUPTA; LEVCHENKO; TORCHILIN, 2005; EL-SAYED et al., 2008; TORCHILIN, 2008), siRNAs (MURATOVSKA; ECCLES, 2004; TURNER et al., 2007; MEADE; DOWDY, 2008; EGUCHI; DOWDY, 2009; ENDOH; OHTSUKI, 2009) à plasmídeos (MORRIS et al., 1999; MARTIN; RICE, 2007; VELDHOEN; LAUFER; RESTLE, 2008).

Diversos CPPs possuem alvos intracelulares, podemos citar, dentre eles, a  $\alpha$ -defensina 1 humana (HNP-1), histatinas e indolicidina (**Figura 4**). Estes três CPPs são parte do sistema imune inato, sendo isolados de neutrófilos humanos (HNP-1) ou bovinos (indolicidina) ou saliva humana (histatinas) (GERA; LICHTENSTEIN, 1991). A HNP-1 induz a quebra da fita dupla de DNA, bloqueando a síntese de macromoléculas e induzindo a apoptose celular (ZHANG; WANG; XU, 2016). Dentre as histatinas, a histatina 5 (Hst 5) é o peptídeo com maior atividade frente à *C. albicans* (MELINO et al., 1999). Este AMP atua na mitocôndria e induz a morte por estresse oxidativo (JANG et al., 2010; HAN et al., 2016), sendo que também inibe a atividade da protease da bactéria *Clostridium histolyticum*, responsável pela periodontite (NISHIKATA et al., 1991). Já a indolicidina, além de interagir com o complexo  $Ca^{2+}$ -Calmodulina, também inibe a síntese de proteínas em células de *E. Coli*

através do bloqueio da síntese de mRNA, levando à morte celular (SUBBALAKSHMI; SITARAN, 1998; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Estes exemplos de ações intracelulares podem ser interessantes para a construção de conjugados com ações e alvos específicos (OKUDA-SHINAGAWA et al., 2017). A **Tabela 5** traz uma relação de alguns AMPs e CPPs mais estudados, bem como suas propriedades e modelos de ação.

### 1.2.1. AMPs ricos em glicina e histidina

Os AMPs ricos em glicina são abundantes na natureza e produzidos por vegetais e animais (SACHETTO-MARTINS; FRANCO; DE OLIVEIRA, 2000; VERDON et al., 2016), mas muito pouco estudados. Suas sequências de aminoácidos são frequentemente encontradas no interior das proteínas ricas em glicina (GRP) em domínios com repetições específicas de glicina (MANGEON; JUNQUEIRA; SACHETTO-MARTINS, 2010). Em plantas a expressão de GRPs está associada a mecanismos de defesa (NAWROT et al., 2014) e a fatores abióticos e bióticos, tais como: luz, frio, excesso de sais, água e infecções (KELLER; SAUER; LAMB, 1988; PARK et al., 2000; RINGLI; KELLER; RYSER, 2001; MOUSAVI; HOTTA, 2005).

Já os AMPs ricos em histidina são de grande interesse científico devido à sua ação antimicrobiana dependente de pH e capacidade de transportar ácidos nucléicos, plasmídeos e siRNA para dentro de células (XU et al., 2016; MOULAY et al., 2017). O conhecimento da influência dos íons metálicos divalentes na atividade destes AMPs (MELINO et al., 1999) tem aumentado o interesse por compreender e aprimorar de forma positiva as influências causadas por íons como:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,

**Tabela 5.** Relação de alguns AMPs e CPPs com suas sequências primárias, números de resíduos, modelo de ação aceito e fonte isolada.

Peptídeos	Sequência primária	Nº de resíduos	Estrutura secundária	Modelo de ação	Organismo/local de origem	Referências
<b>Perturbação de membrana plasmática (AMPs)</b>						
Alameticina	AcUPUAUAQUVUGLUPVUUEQX (U:ácido $\alpha$ -aminoisobutírico; X:L-fenilalaninol)	21	$\alpha$ -hélice	Ripas de barril Poro toroidal	<i>Trichoderma viride</i>	LAVER, 1994; ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014
$\alpha$ -defensina (HNP1)	AC <sub>1</sub> YC <sub>2</sub> RIPAC <sub>3</sub> IAGERRYGTC <sub>2</sub> IYQGRLLWAF <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	30	Folha- $\beta$ pregueada	Poro toroidal	Neutrófilos humanos	ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014
Gomesina	ZC <sub>1</sub> RRLC <sub>2</sub> YKQRC <sub>2</sub> VTYC <sub>1</sub> RGR (Z: ácido L-piroglutâmico)	18	$\beta$ -hairpin	Poro toroidal	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	SILVA; DAFFRE; BULET, 2000; MACHADO et al., 2012; ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014
Hb <sub>40-61a</sub> e 48-61a	KTYFPFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub> e LSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	22 e 14	Composta ( $\alpha$ -hélice e $\beta$ -hairpin)	Carpete/ação detergente	Fragmento de hemoglobina carrapato bovino ( <i>Boophilus microplus</i> )	MACHADO et al., 2007
Magainina-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	23	$\alpha$ -hélice	Poro toroidal	<i>Xenopus laevis</i>	ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014
Melitina	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-NH <sub>2</sub>	26	$\alpha$ -hélice	Poro toroidal	<i>Apis mellifera</i>	YANG et al., 2001
Protegrina-1	RGGRLC <sub>1</sub> YC <sub>2</sub> RRRFC <sub>2</sub> VC <sub>1</sub> VGR-NH <sub>2</sub>	18	$\beta$ -hairpin	Poro toroidal	Leucócitos suínos	QU; HARWIG; SHAFER, 1997 ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014
<b>Penetração celular (CPPs)</b>						
Histatina 5 (Hst5)	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	24	$\alpha$ -hélice	Endocitose Translocação	Saliva humana	MELINO et al., 1999; JANG et al., 2010
Indolicidina	ILPWKWPWWPWR-NH <sub>2</sub>	13	Estendida	Poro transiente Translocação	Neutrófilos bovinos	FALLA; KARUNARATNE; HANCOCK, 1996; ROKITSKAYA et al., 2011
Lactoferricina	KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDS	25	Composta ( $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ pregueada)	Poro transiente	Leite e secreções exócrinas	SINHA et al., 2013; MAHLAPUU et al., 2016
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFRIVQRIKDFLRNLVPRTES	37	$\alpha$ -hélice	Poro transiente	Neutrófilos humanos	WANG et al., 2015; SHAHMIRI et al., 2016
Penetratina	RQIKIWFQNRMRKWKKK	17	Folha- $\beta$ pregueada	Endocitose Translocação	Fragmento proteína <i>Drosophila</i>	EIRÍKSDÓTTIR et al., 2010
TAT <sub>48-57</sub> e 48-60	GRKKRRQRRR e GRKKRRQRRRPPQ	10 e 13	Estendida	Endocitose Translocação	Fragmento proteína vírus HIV	HENRIQUES; MELO; CASTANHO, 2006; TER-AVETISYAN et al., 2009; EIRÍKSDÓTTIR et al., 2010; MADANI et al., 2011

Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> (DESCHAMPS et al., 2005; KACPRZYK et al., 2007; PURI et al., 2015; PRIEBATSCH et al., 2017). Sugere-se que a ligação destes íons confira maior carga positiva aos AMPs, que passam a interagir mais eficientemente com as membranas carregadas negativamente dos microrganismos (dada presença dos fosfolipídios), potencializando suas ações, como é o caso do peptídeo catiônico Hst 5, que tem sua ação potencializada ao coordenar com íons Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e até Fe<sup>3+</sup> (MELINO et al., 1999; RYDENGÅRD; ANDERSSON NORDAHL; SCHMIDTCHEN, 2006; PURI; EDGERTON, 2014; WANG, 2014). Também é proposto que estes AMPs sejam regulados *in vivo* pela ligação aos íons e pH do meio. Outra possível explicação é a mudança conformacional gerada no AMP pela coordenação com o íon (BOBEK; SITU, 2003; WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2007; PURI et al., 2015).

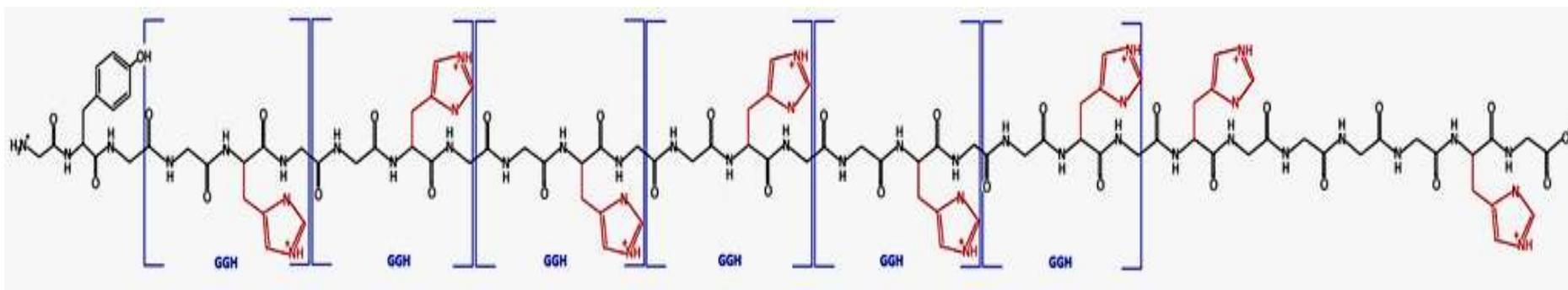
A **Tabela 6** mostra uma relação dos peptídeos ricos em glicina, histidina e aqueles ricos em ambos. As cheferinas I e II são os AMPs com maior porcentagem de Gly/His chegando a quase 68% e 29%, respectivamente.

### 1.2.2. Cheferina I

A Cheferina I (*Chef I*) contém 28 resíduos de aminoácidos (**Figura 7**), sendo eles 1 tirosina, 19 glicinas e 8 histidinas e parte deles organizada em 6 repetições da sequência Gly-Gly-His (GGH).

A *Chef I* foi isolada das raízes da planta *Capsella bursa-pastoris* da família Brassicaceae e é o resultado, assim como a Cheferina II, da proteólise do polipeptídeo *shep-GRP*. Park e colaboradores (2000) descreveram sua atividade frente às bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 27325 e *Pseudomonas putida* ATCC 17426), leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44774), bactérias gram-positivas e fungos miceliais (PARK et al., 2000). Espectros de dicroísmo circular (DC) das cheferinas I e II revelaram





**Figura 7.** Sequência de aminoácidos da Cheferina I, estando os resíduos de histidina em vermelho e as repetições do motivo GGH em azul.

estruturas em folhas  $\beta$  com 33% e 25%, respectivamente (PARK et al., 2000).

Neste cenário, interessados nesta classe singular de AMPs, nosso grupo de pesquisa realizou estudos direcionados ao conhecimento das propriedades e relação estrutura-atividade da *Chef I* (REMUZGO, 2008; REMUZGO et al., 2009; REMUZGO et al., 2014) desenvolvendo análogos sintéticos N- e C- truncados e/ou amidados. Os resultados encontrados corroboraram a atividade frente às bactérias gram-positivas e leveduras, mas não frente às bactérias gram-negativas, sendo que os espectros de DC demonstraram que na presença de 60% trifluoroetanol em fosfato-borato-citrato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , a *Chef I* amidada exhibe conformação em folha- $\beta$  pregueada e dobra- $\beta$  (REMUZGO et al., 2014).

No nosso laboratório, o análogo amidado da Cheferina I (*Chef Ia*) foi ativo contra *Candida albicans* MDM8, ATCC90028, e *C. albicans* HU168, resistente a fluconazol. Esse análogo também exibiu maior resistência às variações da força iônica do meio, baixa atividade hemolítica e maior (2 a 8 vezes) atividade anticandida na presença de  $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Os resultados obtidos em testes usando as sondas fluorescentes SYTO 9 e iodeto de propídeo e o análogo marcado com o fluorescente carboxifluoresceína (*FAM-Chef Ia*) sugeriram que o análogo *Chef Ia* não permeabilizava a membrana celular da levedura *Candida albicans* MDM8 e que seu mecanismo de ação mais provável seria a penetração celular dependente de temperatura/energia, como a endocitose (REMUZGO, 2008; REMUZGO et al., 2014).

Deste modo, levantamos a hipótese de que a *Chef I*, apresente suas atividades anticandida e candidacida aumentadas na presença de outros íons divalentes. Portanto, uma vez que a estrutura e demais propriedades da *Chef I* ainda

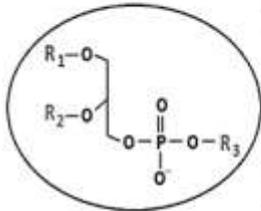
são pouco estudadas, o seu estudo é de grande interesse científico e vem sendo continuado.

### 1.2.3. Determinação *in vitro* e *in vivo* dos modos de ação de AMPs e/ou CPPs

A determinação experimental *in vitro* dos modos de ação de AMPs varia conforme o peptídeo, seu alvo (membrana e/ou alvo intracelular) e a célula estudada (procariótica ou eucariótica), uma vez que a composição dos constituintes de parede celular ou membranares de bactérias/procariotos difere fortemente da composição membranar observada em células eucarióticas (LE; FANG; SEKARANC, 2017).

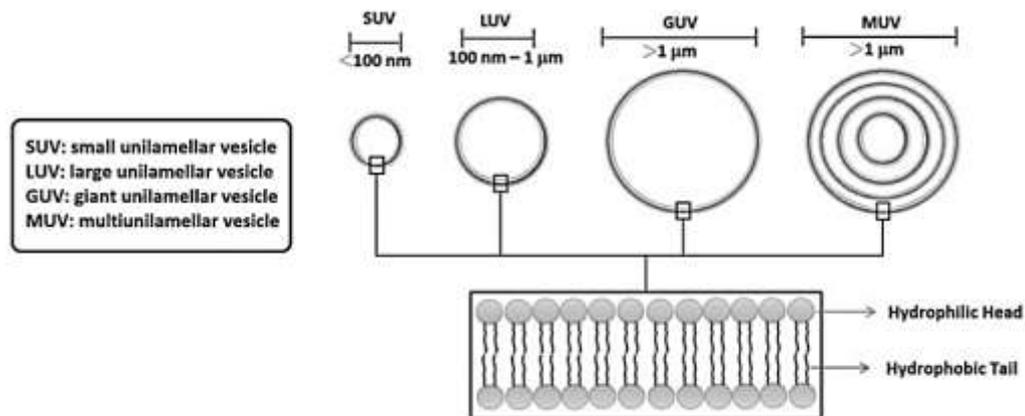
Assim, para a determinação do modo de ação de peptídeos, que possuem a membrana plasmática como alvo são utilizados, frequentemente, modelos membranares simplificados como, por exemplo, as vesículas microscópicas fosfolipídicas/lipossomas. Nestes modelos, propriedades como número de bicamadas (uni ou multilamelar), carga e composição lipídica, viscosidade membranar e presença ou não de esteróis, podem ser alteradas e modificadas conforme a necessidade do experimento, possibilitando uma melhor mimetização das membranas celulares de interesse. De maneira geral, as bicamadas lipídicas destas vesículas são produzidas através de uma mistura definida de lipídios de membrana (**Figura 8**), que são separadas por um meio aquoso (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; MARQUETTE; BECHINGER, 2018).

Dentre os principais tipos de lipossomas devemos citar as vesículas unilamelares grandes (LUVs – diâmetro maior ou superior a 100 nm), vesículas unilamelares pequenas (SUVs – diâmetro de 20-50 nm) e as vesículas unilamelares gigantes (GUVs – diâmetro maior que 1  $\mu\text{m}$ ) (**Figura 9**) (SAPALA; DHAWAN; HARIDAS, 2017).



Fosfolipídios (R <sub>3</sub> )	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> )	Nomenclatura e abreviatura	T <sub>c</sub> (°C)	Carga
Fosfatidilcolina (PC) CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)- CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)-	Dioléilfosfatidilcolina (DOPC) Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	<0 23	Anfótera Anfótera
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)- CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) Diestearoilfosfatidilcolina (DSPC)	42 55	Anfótera Anfótera
Fosfatidiletanolamina (PE) CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)- CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Dioléilfosfatidiletanolamina (DOPE) Diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)	<0 74	Anfótera Anfótera
Fosfatidilglicerol (PG) CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)- CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	13 35	Negativa Negativa
Fosfatidilserina (PS) CH <sub>2</sub> CHNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> COO <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)- CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) Diestearoilfosfatidilserina (DSPS)	79 79	Negativa Negativa

**Figura 8.** Relação de fosfolipídios de membrana utilizados na construção de vesículas lipossomais, suas temperaturas de transição de fase (T<sub>c</sub>) e suas cargas. *Extraído de BATISTA; CARVALHO, MAGALHÃES, 2007.*



**Figura 9.** Vesículas fosfolipídicas unilamelares, seus diâmetros, classificação e esquematização de suas bicamadas lipídicas. *Adaptado de: SAPALA; DHAWAN; HARIDAS, 2017.*

Diversas técnicas são utilizadas na detecção e determinação *in vitro* dos modos de ação de peptídeos, dentre elas podemos citar a espectroscopia de fluorescência, que permite inferir a localização do peptídeo (na membrana ou citoplasma) através de apagadores de fluorescência/*quencher*s ou vazamento de sonda fluorescente específica (p. ex. calceína ou carboxifluoresceína), sendo esta técnica também útil para a detecção de alvos intracelulares, normalmente aliados a ensaios de afinidade ou até imunoprecipitação. Da mesma forma, podemos citar a transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), microscopia confocal, ressonância magnética nuclear (RMN) e dicroísmo circular (LORIN et al., 2012; TORCATO; CASTANHO; HENRIQUES, 2012).

A determinação *in vivo* destes modos de ação pode envolver células humanas (p.ex. eritrócitos) ou bactérias/demais microrganismos, que variam conforme o interesse empírico. De uma maneira geral, para sua determinação *in vivo* são utilizados análogos derivatizados do peptídeo de interesse (p.ex. adição de fluoróforos à sequência peptídica) ou sondas fluorescentes dispersas no meio externo ou interno da célula de interesse (REMUZGO, 2009; TORCATO; CASTANHO; HENRIQUES, 2012).

Dentre as técnicas utilizadas nesta detecção podemos citar a espectroscopia de fluorescência, que envolve tanto a citometria de fluxo (*Fluorescence-Activated Cell Sorter/ FACS*) e a técnica de recuperação de fluorescência após *photobleaching* (*Fluorescence recovery after photobleaching/ FRAP*). Da mesma forma, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia de força atômica (*Atomic force microscopy/ AFM*) também são utilizadas na detecção *in vivo* e, normalmente, permitem a visualização da superfície celular (SPINDLER et al., 2011; SUN; SUN; HUANG, 2016; MARQUETTE; BECHINGER, 2018).

Contudo, algumas limitações são encontradas tanto nos experimentos *in vitro* quando *in vivo*, que envolvem o número de moléculas de peptídeo acessíveis, a curta escala de tempo para a observação do fenômeno e o reduzido tamanho dos fragmentos de membrana, para o primeiro caso, e a dificuldade em diferenciar a fluorescência intrínseca do peptídeo da fluorescência intrínseca da célula estudada, para o segundo caso (TORCATO; CASTANHO; HENRIQUES, 2012; MARQUETTE; BECHINGER, 2018).

Neste contexto, a extrapolação de dados *in vitro* para uso *in vivo* é restrita e deve ser cuidadosamente analisada.

### 1.3. Potencial terapêutico dos peptídeos

O real potencial terapêutico dos peptídeos ainda não é totalmente conhecido. Na década de 1920 através da obtenção de insulina por pâncreas suínos, este potencial começou a ser explorado e vem sendo, desde então, encorajado pela produção de peptídeos como o peptídeo adrenocorticotrófico (ACTH), a calcitonina, a ocitocina e a vasopressina sintéticas (LAU; DUNN, 2018).

O crescimento exponencial do número de casos de resistência antimicrobiana também impulsionou o estudo dos AMPs. Estima-se que mais de 70% das bactérias patogênicas conhecidas são resistentes a um tipo de antibiótico (WATKINS; BONOMO, 2016).

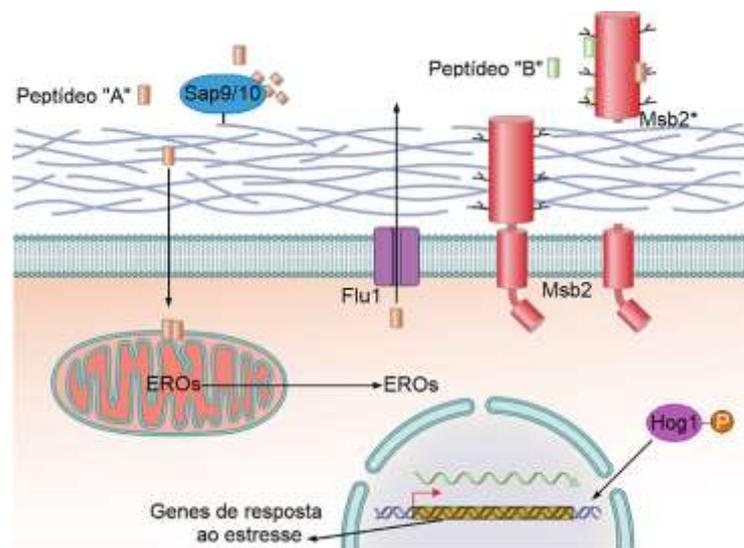
O passo inicial para o uso clínico de AMPs geralmente envolve uma triagem *in vitro* das propriedades antibacterianas e/ou antifúngicas usando concentrações inibitórias mínimas (MICs) ou concentrações mínimas microbicidas (MMCs). Entretanto, a predição exata destas propriedades *in vivo* se torna muito difícil, devido à alta sensibilidade destas propriedades às condições ambientais. Alguns AMPs apresentam estas propriedades diminuídas na presença de meios com alta força iônica *in vivo* (p. ex.: soluções salinas fisiológicas) e se tornam candidatos às drogas de uso tópico (MAHLAPUU et al., 2016).

A **Tabela 7** lista as vantagens, dificuldades e estratégias do uso terapêutico de AMPs, sendo importante ressaltar que, o presente trabalho propõe uma estratégia para contornar a diminuição de atividade em meios com alta força iônica/concentração de sais, através da coordenação de um AMP catiônico com íons metálicos divalentes ( $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ).

**Tabela 7.** Relação de vantagens, dificuldades e estratégias para o uso terapêutico de AMPs (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006; FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; MAHLAPUU et al., 2016).

Vantagens	Dificuldades	Estratégias
Ampla espectro de ação	Baixa disponibilidade metabólica (ação de proteases e carboxipeptidases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclização dos AMPs</li> <li>• Incorporação de D-aminoácidos e/ou análogos de aminoácidos não usuais</li> <li>• Bloqueio das extremidades C ou N-terminal por modificações como N-acetilação e C- amidação</li> </ul>
Menor resistência antimicrobiana	Menor atividade em meios de alta força iônica in vivo	
Atuação sinérgica com antibióticos	Custo elevado	
<i>Design</i> de novas drogas	Produção de um peptídeo com 5000 Da é 10 vezes mais caro que a produção de uma molécula de 500 Da	
<i>Drug-delivery</i> através de conjugados peptídicos multifuncionais		

Os casos de resistência antimicrobiana a AMPs são poucos se comparados aos de antibióticos convencionais. Ainda assim, os mecanismos dessa resistência vêm sendo elucidados, sendo que em fungos eles envolvem a expressão de proteínas efetoras que degradam ou se ligam ao AMP, bombas efluentes e regulação das vias de sinalização (**Figura 10**).



**Figura 10.** Célula de *C. albicans* e as estratégias de resistência a AMPs. Adaptado de SWIDERGALL; ERNST, 2014.

Dentre as proteínas efetoras podemos citar a expressão das proteases ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) Sap 9 e Sap 10 e a glicoproteína Msb2 e Msb2\* (domínio da Msb2 resultante da ação das proteases aspárticas secretadas/Sap). No primeiro caso, as proteases Sap 9 e Sap 10 degradam os

AMPs, já no segundo caso, as glicoproteínas inviabilizam os peptídeos através da ligação destes às suas superfícies (**Figura 10**). Outra estratégia envolve a expressão do transportador Flu1, presente nos microrganismos multirresistentes, que promove o efluxo celular do AMP e diminui sua toxicidade (SWIDERGALL; ERNST, 2014).

Algumas modificações na sinalização celular são responsáveis por esta resistência, como por exemplo, a expressão da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) Hog1, que tem sua expressão associada à resposta ao estresse, morfogênese e biossíntese da parede celular (MONGE, 2006; SWIDERGALL; ERNST, 2014). A expressão desta proteína e sua forma fosforilada (Hog1-P) esta relacionada à presença de certos AMPs que induzem o estresse oxidativo (p. ex. histatinas), sendo que a sua expressão ativa genes responsáveis pela resposta oxidativa e induz a produção de antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase e glutatona (CANNON et al., 2007; SWIDERGALL; ERNST, 2014).

Apesar disso, nesta última década, observamos uma notável expansão no estudo e desenvolvimento de drogas peptídicas (DA CUNHA et al., 2017), sendo que diversos destes compostos se encontram em testes clínicos (**Tabela 8**). Nos últimos oito anos foram criadas 26 patentes que envolvem o uso terapêutico de AMPs (KANG et al., 2017).

Um exemplo recente da pesquisa de peptídeos com fins terapêuticos é o grupo de análogos do "peptídeo-1 semelhante ao glucagon" (GLP-1) utilizados para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, que alcançou vendas globais superiores a 2,6 bilhões de dólares em 2013, com Victoza<sup>®</sup> (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Outro exemplo envolve o medicamento à base de peptídeos utilizado para o tratamento do câncer de próstata, Lupron<sup>®</sup>, que alcançou vendas globais de mais de

2,3 bilhões de dólares em 2011 (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Segundo os mesmos autores, o mercado global de medicamentos peptídicos aumentará de 14,1 bilhões de dólares em 2011 para 25,4 bilhões em 2018.

**Tabela 8.** Nome de medicamentos a base peptídeos, AMP de origem, fase em que se encontram os testes clínicos, via de administração da droga e indicação de tratamento (ANDERSSON; HUGHES, 2016; MAHLAPUU et al., 2016).

Medicamento	AMP de origem	Fase	Administração	Indicação
Novexatin (NP-213)	Defensinas humanas	II	Tópica	Infecção fúngica de unhas por <i>Onychomycosis</i>
Omiganan (MBI 226, CLS0001)	Indolicidina	II	Tópica	Tratamento de <i>Acne vulgaris</i>
		III		Assepsia tópica da pele; prevenção de infecções em cateteres; tratamento de rosácea
hLF1-11	Lactoferricina	I/II	Intravenosa	Assepsia em pacientes imunocomprometidos para receber transplantes de células hematopoiéticas
			Hidrogel ácido hialurônico	Prevenção da formação de aderências pós-cirúrgicas em cirurgias da mão
PXL01		II		
OP-145	LL-37	I/II	Gotas auriculares	Infecção de ouvido crônica
Pexiganan (MSI-78)	Magainina	III	Tópica	Ulcerações e infecções em pés de pacientes diabéticos
Iseganán (IB-367)	Protegrina-1	III	Bucal (bochechos)	Prevenção da mucosite induzida por quimioterapia

#### 1.4. A importância da síntese de peptídeos para AMPs/CPPs

Como descrito, desde 1920, os peptídeos se tornaram alvo de grande interesse científico, sendo necessário o estudo e desenvolvimento de novas metodologias que possibilitassem o isolamento, caracterização, purificação e identificação destes compostos *in vivo*. Da mesma forma, a necessidade do conhecimento de suas propriedades fisiológicas, físico-químicas e farmacológicas impulsionou o desenvolvimento da síntese de peptídeos *in vitro* (REMUZGO, 2009; HANEY; HANCOCK, 2014).

O advento da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) por Robert Bruce Merrifield, em 1963, possibilitou a obtenção de peptídeos em maiores quantidades que àquelas quando isolados de suas fontes naturais (p.ex., em 1986, para obter 1

mg de somatostatina natural eram necessários 100.000 cérebros de carneiro) (MACHADO et al., 2004). De fato, a síntese química de peptídeos se tornou o método mais utilizado para a obtenção de peptídeos bioativos, principalmente devido ao alto grau de rendimento e pureza do produto final (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). De uma maneira geral, a SPFS consiste no alongamento de uma cadeia peptídica ligada a uma matriz sólida insolúvel, que por subseqüentes adições de aminoácidos geram o peptídeo desejado (MERRIFIELD, 1963).

Uma vez que a atividade biológica dos AMPs/CPPs é estritamente relacionada à sua sequência de aminoácidos, tanto os peptídeos naturais (isolados *in vivo*) quanto os sintéticos (produzidos *in vitro*) apresentam a mesma atividade biológica. Neste contexto, destacam-se os peptídeos sintéticos, que graças à SPFS, podem ter a potência de suas atividades antimicrobianas moduladas (através da síntese de análogos truncados) e suas relações estrutura-atividade elucidadas (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017).

Além disso, a SPFS possibilita a inserção de aminoácidos não usuais à cadeia peptídica (p.ex. D-aminoácidos – vide **Tabela 7**) para desenvolver análogos que apresentem características “chaves” como: menor suscetibilidade às enzimas proteolíticas, baixa atividade hemolítica e estabilidade em meios de alta força iônica e condições fisiológicas (LI et al., 2017). Nas últimas décadas, os avanços na área de síntese orgânica e química estrutural possibilitaram à SPFS a inserção de modificações pós-traducionais ao peptídeo sintético, que antes não eram possíveis (**Tabela 9**) (BEHRENDT; OFFER, 2016).

Por fim, o conhecimento e aprimoramento das funções/alvos e propriedades como solubilidade e estabilidade fisiológica/proteolítica destes peptídeos bioativos

possibilitam o desenvolvimento de novas drogas farmacológicas (HANEY; HANCOCK, 2014; GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2017).

**Tabela 9.** Modificações pós-traducionais disponíveis na SPFS (BEHRENDT; OFFER, 2016).

Modificações pós-traducionais	
<b>Citrulinação</b>	Substituição da arginina por citrulina
<b>Farnesilação</b>	Adição de grupo isoprenilo a resíduos de cisteína
<b>Fosforilação</b>	Adição de grupo fosfato (PO <sub>4</sub> ) a aminoácido (eucariotos em serina, treonina ou tirosina)
<b>Glicosilação</b>	Adição de carboidratos
<b>Metilação</b>	Adição de grupo metil (CH <sub>3</sub> ) a resíduos de arginina ou lisina
<b>Ponte dissulfeto</b>	Ligações covalentes entre dois grupos sulfidril (-SH), normalmente pela cadeia lateral de cisteínas
<b>Sulfatação</b>	Adição de grupos sulfatos (SO <sub>4</sub> ) a resíduos de tirosina

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo aprofundar o entendimento (i) da ação antifúngica e fungicida do AMP atípico sintético *Chef Ia* e do seu análogo fluorescente e (ii) da interação de ambos com íons metálicos divalentes, o que está diretamente relacionado à potenciais aplicações farmacológicas. Para tanto:

- a. Purificamos e caracterizamos quimicamente análogos sintéticos da *Chef Ia* disponíveis em nosso laboratório.
- b. Determinamos as atividades anticandida e candidacida da *Chef Ia* e FAM-*Chef Ia* frente às células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 na ausência e presença dos cátions divalentes metálicos Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> em meios de baixa ou alta força iônica.
- c. Examinamos o efeito dos íons Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> na estrutura secundária da *Chef Ia*.
- d. Estudamos a interação do peptídeo *Chef Ia* com íons Cu<sup>2+</sup> e de seu análogo fluorescente FAM-*Chef Ia* com íons Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> na tentativa de verificar coordenação/quelação e a razão estequiométrica peptídeo: íon de cada um.
- e. Realizamos análises por DC em condições específicas e construímos um modelo espacial teórico do peptídeo *Chef I* que possibilitasse a visualização dos resultados obtidos.

- f. Realizamos ensaios preliminares na tentativa de determinar a localização intracelular do análogo fluorescente FAM-*Chef Ia* com o auxílio do marcador de vacúolo fluorescente (CMAC-*Blue*) em células de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

### 3. Materiais e Métodos Gerais

#### 3.1. Materiais

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6578 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos P. Taborda (ICB-USP).

Os reagentes utilizados nos ensaios biológicos foram: meios PDB (pH = 5,1±0,2), peptona, ágar e dextrose da Synth ou BD (EUA). Os sais carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de cobre (CuCl<sub>2</sub>), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) e os constituintes dos tampões fosfato-borato-citrato (PCB), acetato de sódio, Tris, HEPES e fosfato-salino (PBS) foram provenientes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou Synth (Brasil). O Kit *Yeast Vacuole Marker Sampler Y-7531*, que contém o marcador de vacúolo CMAC-*Blue* foi adquirido da Molecular Probes (EUA). O protetor de fluorescência *VectaShield* foi adquirido da Vector Laboratories (EUA). As lâminas e lamínulas utilizadas para os ensaios de fluorescência foram provenientes da ProLab (Brasil) e Synth (Brasil), respectivamente. Para os ensaios de atividade antifúngica foram utilizadas placas de Petri de vidro (diâmetro de 6 cm) provenientes da Synth (Brasil). Para os ensaios de localização intracelular foram utilizadas placas de Petri para aplicações microscópicas (diâmetro de 3,5 cm e fundo de vidro com espessura de 175 µm) provenientes da Cell View (Áustria).

Para as análises de dicroísmo circular (DC) foi utilizada uma cubeta de quartzo (volume máximo de 350 µL e caminho ótico de 1mm) da Hellma Analytics

(EUA). Para RP-HPLC foram utilizadas as colunas C<sub>18</sub> analítica (0,46 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å), preparativa (2,2 cm x 25 cm, 10 µm e 300Å) e semi-preparativa (1,0 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å) da Grace Vydac (EUA).

Os solventes e reagentes usados DCM (diclorometano), DMF (*N, N'*-dimetilformamida), MeOH, etanol 96% extra puro, formaldeído, éter diisopropílico, BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfônico, DMSO (dimetilsulfóxido), 4-metilpiperidina, triisopropilsilano (TIS), ninidrina, trifluoretanol (TFE), ACN (acetonitrila; grau cromatográfico) e TFA (ácido trifluoroacético; grau cromatográfico) eram provenientes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou Applied Biosystems.

### 3.2. Métodos Preparativos

#### 3.2.1. Síntese de Peptidil-Resinas e FAM-Peptidil-resina

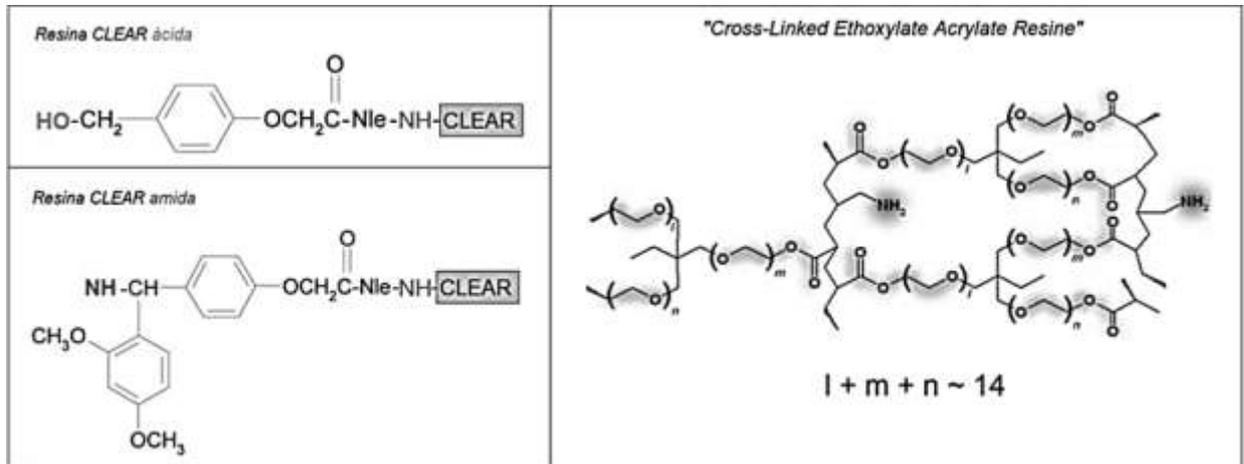
A síntese das peptidil-resinas dos análogos de *Chef I* foram realizadas anteriormente a este trabalho e estão listadas na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Peptidil-resinas estocadas a 4°C e disponíveis em nosso laboratório.

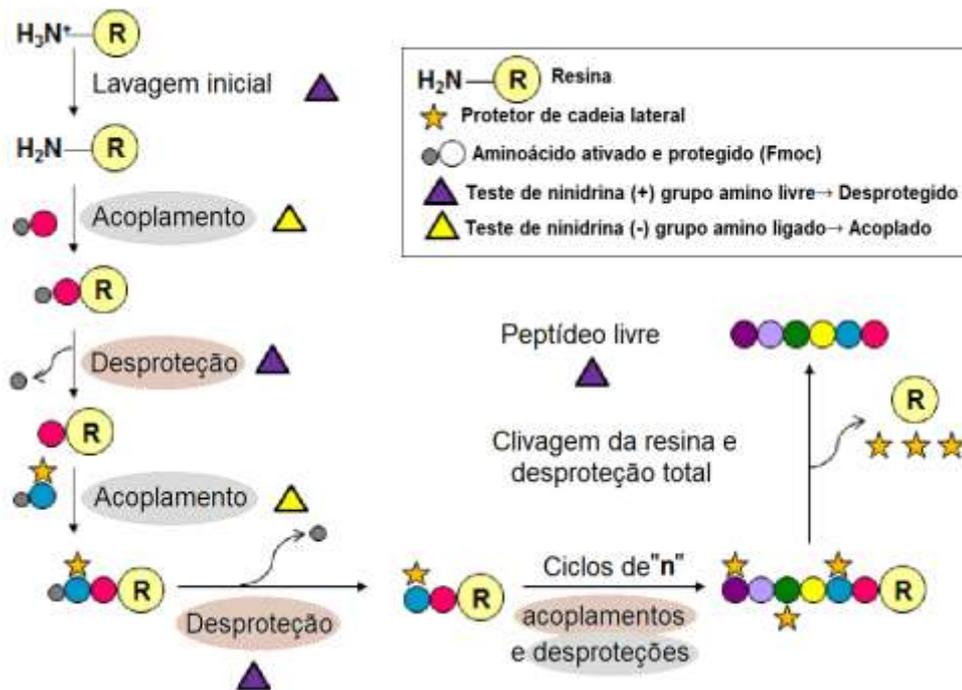
PEPTIDIL RESINAS			
Cheferina I			Síntese Manual
	Fmoc - Chef I CLEAR ácida	195,67mg	2006/11
Cheferina Ia			
	Fmoc - Chef I CLEAR amida	521,16 mg	2007/
FAM- Cheferina Ia			
	FAM - Chef Ia	977,46mg	
	FAM - Chef I (6-28)a	504,65mg	2009/9
	FAM - Chef I (3-28)a	663,87mg	2009/9.1

Estas sínteses foram realizada manualmente por SPFS passo a passo na resina CLEAR ácida (**Figura 11**) ou amida a 60 °C usando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) e os protocolos estabelecidos em nosso laboratório durante o desenvolvimento de projetos de pesquisa anteriores a este (VARANDA;

MIRANDA, 1997; SOUZA; TAVARES; MIRANDA, 2004; LOFFREDO et al., 2009; REMUZGO, 2009). Esta metodologia está sumarizada na **Figura 12**.



**Figura 11.** Estrutura reticulada da resina CLEAR® e seus grupos funcionais (à direita). Estrutura das resinas CLEAR® ácida e amida (à esquerda)(PEPTIDES INTERNATIONAL, 2017).



**Figura 12.** Representação esquemática da síntese de peptídeos em fase sólida. Adaptado de CARVALHO, 2012.

A resina usada é composta por uma unidade de reticulação de unidades de etilenoglicol ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}-$ ) e porção amida (PEPTIDES INTERNATIONAL, 2017), que serve como alça para funcionalização da resina (por exemplo: CLEAR® amida) e foi desenvolvida em 1996 por George Barany e Maria Kempe (KEMPE; BARANY; E,

1996). Reagentes ativadores são utilizados nas reações de acoplamento para que a  $\alpha$ -carboxila do aminoácido a ser acoplado esteja ativada, isto é, se torne mais reativa e capaz de realizar um ataque nucleofílico no grupo amino- $\alpha$  desprotegido do aminoácido ligado à resina. Após diversos ciclos de desproteção e acoplamento o produto final é uma peptidil-resina (peptídeo de interesse ligado à resina com seu grupo amino- $\alpha$  protegido, bem como suas cadeias laterais reativas) (AMBLARD et al., 2006; COIN; BEYERMANN; BIENERT, 2007).

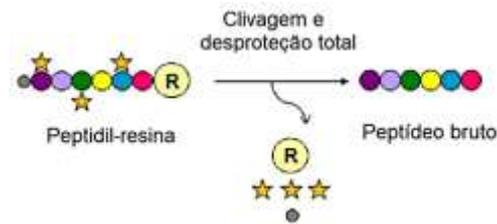
Para cada reação de desproteção ou acoplamento são realizados testes de ninidrina, que consiste na reação da ninidrina com aminas primárias, que quando presentes reagem produzindo uma coloração azulada (teste positivo, indicando uma desproteção) e quando ausentes, uma coloração amarelada (teste negativo, indicando um acoplamento) (KAISER et al., 1970). Após o acoplamento do último derivado de aminoácido (N-terminal da sequência), as resinas N $\alpha$ -Fmoc-peptidil-CLEAR amida ou ácida foram secas sob vácuo, caracterizadas e estocadas a 4 °C.

No caso de marcação com 5(6)-carboxifluoresceína (FAM), ela foi realizada durante o processo de síntese, após o acoplamento do último resíduo de aminoácido. O grupo protetor Fmoc foi removido e a peptidil-resina reagiu (por 2 horas a 60°C) com excesso molar de cinco vezes de FAM, BOP, HOBt e DIPEA. Em seguida, a peptidil-resina foi separada do meio reacional por filtração, lavagem com DMF, DCM e seca à vácuo para posterior estocagem. Da mesma forma, esse procedimento foi feito anteriormente a este trabalho.

### **3.2.2. Clivagem dos peptídeos das Resinas e Desproteção Total**

Uma vez finalizada a síntese é necessário desligar o peptídeo bruto da peptidil-resina, bem como remover os grupos protetores tanto das cadeias laterais quanto o

Fmoc do grupo amino- $\alpha$  do primeiro resíduo de aminoácido (**Figura 13**) (AMBLARD et al., 2006).



**Figura 13.** Representação esquemática da clivagem e desproteção total na SPFS. (R) resina; ★ protetores de cadeias laterais reativas; ● grupo Fmoc. *Adaptado de CARVALHO, 2012.*

Estas remoções ocorrem simultaneamente na presença de meio ácido (TFA) e na presença de *scavengers*, para impedir que os protetores das cadeias laterais reajam com os resíduos de aminoácidos (PEARSON, DANIEL et al., 1989). Nesta etapa, além da resina levou-se em conta principalmente a sequência peptídica para a escolha da solução (CHAN; WHITE, 2000). Todas as peptidil-resinas reagiram com 95% TFA, 2,5% água, 2,5% TIS (300 rpm, 37 °C por 2 h). Em seguida, para cada reação, o peptídeo foi precipitado por éter diisopropílico e extraído usando uma solução A (0,1% TFA em água) e uma solução B (60% ACN em água contendo 0,09% de TFA). O peptídeo bruto foi liofilizado e o material seco resultante foi pesado. Os valores iniciais e o rendimento destas reações estão descritos na **Tabela 11** no **item 4.1**.

### 3.3. Métodos analíticos

#### 3.3.1. Caracterização dos peptídeos brutos e purificados

Análises foram realizadas para confirmar a presença dos peptídeos desejados nos materiais brutos ou purificados e para determinar as condições de purificação para cada um (**Tabelas 11 e 12** no **item 4.1**).

##### a) Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)

(HODGES; BURKE, LORNE; MANT, 1988; MANT; HODGES, 1991)

Foi empregado um cromatógrafo LDC Analytical, composto por bombas ConstaMetric 3200 e 3500, injetor Rheodyne 7125, integrador DataJet, detector UV MILTON ROY –SpectroMonitor 3100, utilizando uma coluna Vydac C<sub>18</sub> analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å), fluxo de 1,0mL/min, comprimento de onda de detecção de 210 nm e o seguinte gradiente linear: 5 a 95% de B, em que o solvente A era 0,1% TFA/água e o solvente B, 30% ACN/0,09%TFA/água.

**b) Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/ESI-MS) (MACHADO et al., 2012)**

Foi empregado um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão, fluxo 0,2 mL/min) composto por um degaseificador modelo DGU-20A<sub>3</sub>, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C<sub>18</sub> (5,0 mm x 2,0 mm; 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 2 mm; diâmetro da partícula = 4,6 µm e diâmetro do poro 12 nm) Shim-pack VP-ODS acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Alemanha) com fonte de ionização de tipo “*electrospray*”, modo ESI positivo e com analisador do tipo *Ion-Trap*. Para análises de LC foram usadas as condições analíticas citadas acima e para a análise dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2.

**c) Hidrólise total e análise de aminoácidos dos hidrolisados (HEINRIKSON; MEREDITH, 1984; MARTENS; LOEFFELMANN, 2003; RIGOBELLO-MASINI et al., 2008)**

Os peptídeos foram condicionados à estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore) e expostos a vapor proveniente de ácido clorídrico a 110 °C por 24 h em atmosfera inerte. Posteriormente, as amostras foram secas em dessecador à vácuo. Os hidrolisados secos foram dissolvidos em água e analisados no analisador de

aminoácidos da *Dionex BioLC<sup>®</sup>Chromatography System* (Dionex, EUA). Neste aparelho os aminoácidos livres são separados por cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm) da Dionex e detectados por amperometria integrada com detector eletroquímico ED50. O programa Chromeleon foi utilizado para tratamento de dados.

### **3.4. Purificação dos Peptídeos Brutos**

De posse do peptídeo bruto é necessária sua purificação, isto é a remoção de compostos que não são o peptídeo de interesse. Um elevado grau de pureza (>95%) também é desejável, principalmente devido ao uso destinado deste peptídeo, como por exemplo, testes antimicrobianos. Para isso são utilizadas técnicas de cromatografia líquida, como a de fase reversa, troca iônica, exclusão e de afinidade (MACHADO et al., 2004; AMBLARD et al., 2006). Atualmente, a cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) é a técnica mais utilizada para a purificação de peptídeos, sendo que com o advento do espectrômetro de massas, a purificação de peptídeos pode ocorrer via RP-HPLC acoplada à espectrometria de massas (MACHADO et al., 2004).

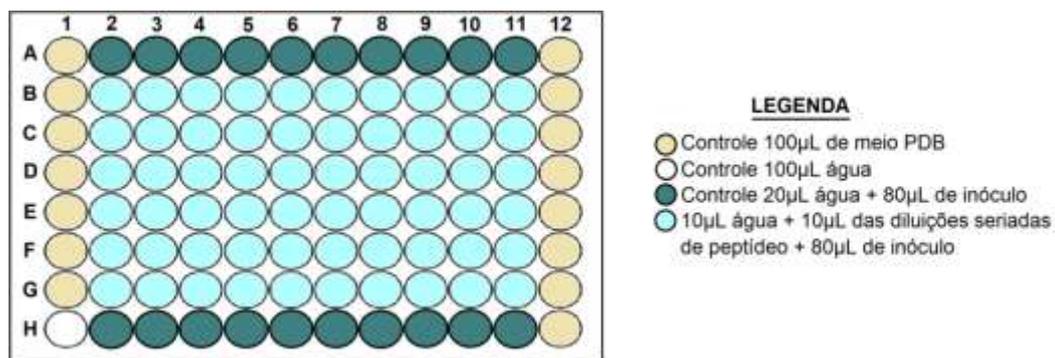
Foi empregada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC), utilizado um sistema de Waters, modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Water Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostrar manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C<sub>18</sub> 10 µm, 300 Å, 2,2 cm x 25 cm). As purificações foram realizadas em fluxo de 10 mL/min e em 210 nm usando os gradientes lineares descritos na **Tabela 12** do **item 4.1**.

A etapa final da purificação de peptídeos consiste na junção de frações que contém o peptídeo de interesse e liofilização destas para obtenção do peptídeo purificado. Por fim, o peptídeo purificado foi caracterizado quanto à composição de seus resíduos de aminoácidos através da análise de aminoácidos (CARVALHO, 2012).

### 3.5. Ensaio Biológicos

#### 3.5.1. Atividade Antifúngica (FEHLBAUM et al., 1994; HETRU; BULET, 1997; CLSI, 2002)

A atividade antifúngica foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo (CLSI/M27-A2 – vide **item 4.2.1.b**). Para isso, em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  de uma série de diluições de peptídeo ( $1,95 \mu\text{mol.L}^{-1}$  -  $1,0 \text{mmol.L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de água e 80  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de leveduras ( $\text{Abs}_{595\text{nm}} = 0,001$ ) com concentração final de  $2,5 \times 10^4$  células/mL em meio PDB (**Figura 14**).



**Figura 14.** Esquema de placa para ensaio antifúngico. *Adaptado de CARVALHO, 2012.*

Como controle positivo para o crescimento fúngico foram usados 20  $\mu\text{L}$  de água e 80  $\mu\text{L}$  de inóculo e para o controle negativo, foram utilizados 100 $\mu\text{L}$  do meio PDB, anfotericina B ( $0,078 \mu\text{mol.L}^{-1}$  -  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e melitina ( $1,95 \mu\text{mol.L}^{-1}$  -  $1,0 \text{mmol.L}^{-1}$ ). A placa foi mantida em uma estufa a 35  $^{\circ}\text{C}$  por 24h, sem agitação e sob uma atmosfera úmida. O crescimento microbiano foi quantificado pelo incremento da

absorbância a 595 nm em um leitor de ELISA (Labsystem iEMS Analyser). O valor da Concentração Mínima Inibitória (MIC) correspondeu à menor concentração do peptídeo que visualmente ocasionou 100% de inibição no crescimento dos fungos após incubação (EHRET-SABATIER et al., 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os efeitos na concentração de sal e de íons metálicos divalentes foram determinados com a substituição da água por soluções de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  nas concentrações finais de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### **3.5.2. Atividade Antifúngica em meio tamponado (KACPRZYK et al., 2007)**

As mesmas etapas descritas anteriormente para a atividade antifúngica foram seguidas, porém executadas na presença do tampão Tris 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4) preparado junto ao meio de cultura PDB. A fim de averiguar o possível efeito dos íons metálicos divalentes a água foi substituída pelas soluções de  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  nas concentrações finais de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para *Chef la* e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para *FAM-Chef la*.

### **3.5.3. Atividade Antifúngica em alta força iônica com meio tamponado e não tamponado (KACPRZYK et al., 2007)**

A fim de averiguar o possível efeito dos íons metálicos divalentes na atividade antifúngica dos peptídeos em alta força iônica, foram utilizados meios de cultura tamponados com tampão Tris 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4) com concentrações finais de NaCl (42,8  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 85,6 e 154  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Igualmente, foram utilizados meios de cultura não tamponados (pH 5,1) na presença das mesmas concentrações finais de NaCl (42,8  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 85,6 e 154  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Ao montar a placa do teste a água foi substituída pelas soluções de  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  nas concentrações finais 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,

25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para *Chef Ia* e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para *FAM-Chef Ia*.

#### **3.5.4. Atividade Fungicida** (CLSI, 1999; MACHADO et al., 2007)

Após o teste em microplaca para a determinação da MIC, o conteúdo dos poços (100  $\mu\text{L}$ ) que visualmente apresentaram inibição de crescimento foram utilizados para plaqueamento em meio sólido (Ágar Sabouraud) e o conteúdo do poço da diluição imediatamente inferior à MIC foi usado como controle positivo de crescimento. A concentração mínima fungicida (MFC) foi determinada após incubação numa estufa a 35 °C por 24 h.

#### **3.6. Análise do efeito de *FAM-Chef Ia* em células de *Candida parapsilosis***

(REMUZGO et al., 2014; PUSHPANATHAN et al., 2012)

O marcador *CellTracker CMAC-Blue* (7-amino-4-chloromethylcoumarin) do Kit *Yeast Vacuole Marker Sampler Y-7531* (Molecular Probes, EUA) foi utilizado. Para o teste do peptídeo, células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram incubadas por um período de 4 h a 35 °C em 5 mL de meio Sabouraud sob agitação de 150 rpm para atingir o crescimento celular exponencial ( $Abs_{595nm} = 0,4$ ; equivalente a  $10^7$  células/mL). Após este período, foi feito o ajuste para  $2 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram incubadas com o marcador de vacúolo *CMAC-Blue* do kit em tampão PBS (pH 7,4) por 15 min a 35 °C. Após este tempo, elas foram centrifugadas por 5 min em 10.000 g e lavadas três vezes com PBS. Em seguida, essas suspenções foram incubadas com concentrações do peptídeo na ausência e presença de zinco:

- 6, 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $\frac{1}{2}$  MIC) de *FAM-Chef Ia*
- 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (1 MIC) de *FAM-Chef Ia*
- 1,563  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $\frac{1}{2}$  MIC) de *FAM-Chef Ia* com 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$

- 3,125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (1 MIC) de FAM-*Chef Ia* com 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$

em meio PDB por um período de 15 min a 35 °C e, posteriormente, lavadas com PDB. Por fim, as células foram fixadas com 3,7% de formaldeído/PBS (20 min) (REMUZGO et al., 2014). As soluções de peptídeo e  $\text{ZnCl}_2$  foram incubadas em água por um período de 3 a 4h com o triplo das concentrações finais.

A fim de verificar a influência da fixação com formaldeído na marcação do marcador de vacúolo CMAC-*Blue*, foram realizados testes com as células vivas. Para isso os mesmos passos descritos anteriormente foram seguidos até a incubação com CMAC-*Blue*. Em seguida, as células (100  $\mu\text{L}$ ) foram transferidas para uma placa de Petri com 4 divisões e à estas foram adicionadas as concentrações finais de:

- 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (1 MIC) de FAM-*Chef Ia*;
- 3,125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (1 MIC) de FAM-*Chef Ia* com 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$

As células foram examinadas no microscópio de fluorescência multiusuário Nikon Eclipse TE300 do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Para a preparação das lâminas foram utilizadas lamínulas recobertas com poli-L-lisina, às quais se adicionou, junto às amostras celulares, o protetor de fluorescência *VectaShield* (Vector Laboratories, Inglaterra). As células analisadas foram divididas em quatro grupos conforme sua fluorescência:

- Células verdes: interior citoplasmático em verde, indicativo da presença de FAM-*Chef Ia*;
- Células azuis: região(ões) intracelular(es) em azul, indicativo(s) da presença de CMAC-*Blue*;
- Células com colocalização: região intracelular/vacúolo com sobreposição dos filtros azul e verde;

- Células não coradas.

Análises estatísticas foram utilizadas para validar a influência do zinco nos resultados encontrados, bem como a influência da fixação com formaldeído (3,7%) na marcação do marcador de vacúolo CMAC-*Blue*. Para tal foram utilizados: teste de normalidade D'Agostino, indicado para "k" amostras ( $n \geq 10$ ); teste paramétrico para amostras independentes (Teste-*t*); testes não paramétricos para amostras independentes (*Mann-Whitney* e Qui-quadrado); cálculo amostral para validar os dados obtidos. O teste de normalidade D'Agostino é um teste para amostras pequenas com valor de "n" igual ou superior a 10 unidades. Os resultados são comparados com os valores críticos estabelecidos ( $\alpha = 0,05$ ). A hipótese nula ( $H_0$ ) é a hipótese de normalidade da amostra e deve ser rejeitada quando o valor calculado é menor ou igual ao valor crítico mínimo e igual ou maior ao valor crítico máximo (BUSSAB; MORETTIN, 2003).

Uma vez calculada a normalidade das amostras tem-se duas opções para executar o teste de hipótese: amostras com distribuição normal (paramétricas) ou sem distribuição normal (não paramétricas). Para o primeiro tipo de amostras o teste utilizado foi o Teste-*t* para duas amostras independentes, onde o cálculo se baseia em informações sobre as médias amostrais e seus respectivos desvios padrões informando o poder, nível alfa ( $\alpha = 0,05$ ) e direcionamento do teste (uni ou bilateral) (BUSSAB; MORETTIN, 2003; AYRES; AYRES JR, 2007).

Já para as amostras que não apresentaram distribuição normal foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Qui-quadrado. O primeiro teste é destinado para comparar duas amostras independentes do mesmo tamanho ou não, cujos valores tenham sido mensurados pelo menos a nível ordinal. Já para o teste do Qui-quadrado os valores devem ser mensurados a nível ordinal ou nominal e as

amostras devem apresentar duas ou mais categorias dispostas em tabelas de contingência  $I \times c$  (BUSSAB; MORETTIN, 2003; AYRES; AYRES JR, 2007). Em posse dos resultados, foram realizados testes para inferir os tamanhos populacionais de cada teste, a fim de verificar se o número de amostras utilizadas era suficiente para obter resultados confiáveis. Todos os dados foram processados no programa BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá/ Brasil).

### **3.7. Análises por espectroscopia de dicroísmo circular (REMUZGO et al., 2014)**

Os espectros foram adquiridos em um espectropolarímetro do modelo Jasco J-815 utilizando uma célula de quartzo como caminho óptico de 1 mm. Foram usados 300  $\mu\text{L}$  de uma solução com concentração final de 40  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Chef I, em tampão fosfato-borato-citrato (PBC) 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 5,0 e pH 7,4) na presença de 60% trifluoroetanol (TFE). As análises foram realizadas na ausência e presença de 20, 50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{CuCl}_2$  ou  $\text{ZnCl}_2$ . Todos os espectros foram medidos entre 190-260 nm a 25°C e obtidos pela subtração do espectro de tampão com ou sem TFE. Para gerar o espectro final foram realizadas oito leituras por amostra.

Através dos espectros finais, foram realizadas análises específicas a fim de inferir a porcentagem de cada estrutura secundária através do programa BeStSel (MICSONAI et al., 2015).

### **3.8. Modelo espacial teórico do peptídeo *Chef I* (LOVELL et al., 2003; PETERSEN et al., 2004; LAMIABLE et al., 2016)**

A sequência do peptídeo *Chef I* foi disponibilizada no PEP-FOLD 3, base de dados de predição de modelos espaciais para peptídeos cíclicos ou lineares, que conta com um conjunto de base de 56 peptídeos lineares em solução e 34 peptídeos cíclicos (THÉVENET et al., 2012; SHEN et al., 2014; LAMIABLE et al., 2016). A análise gerou 10 modelos teóricos, que após nova análise usando a ferramenta

RAMPAGE (Cambridge) (LOVELL et al., 2003) nos possibilitou selecionar o modelo estrutural que apresentava a maior porcentagem de resíduos de aminoácidos com ângulos  $\phi$  e  $\psi$  em regiões conformacionais permitidas no diagrama de Ramachandran. O processamento e manipulação do modelo utilizado foram realizados através no Chimera 1.11.2 (PETTERSEN et al., 2004).

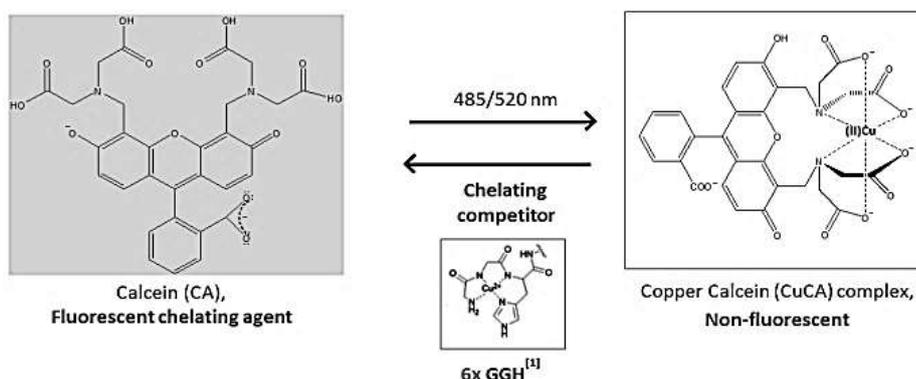
### **3.9. Interação dos peptídeos *FAM-Chef Ia* e *Chef Ia* com íons $\text{Cu}^{2+}$ por espectroscopia eletrônica no ultravioleta/visível e fluorimetria**

Esta parte dos experimentos foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Breno P. Espósito do Depto. de Química Fundamental do nosso Instituto. Todas as amostras foram analisadas em tampão HBS (HEPES *Buffered Saline*, HEPES 20  $\text{mmo.L}^{-1}$ , NaCl 150  $\text{mmo.L}^{-1}$  e pH 7,4) tratado com Chelex<sup>®</sup> (0,01  $\text{g.mL}^{-1}$ , para reduzir a contaminação por íons metálicos). Os espectros eletrônicos foram obtidos utilizando microplacas de plástico de 96 poços em um leitor de microplacas SpectraMax M4 (Molecular Devices), de propriedade do Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos. Inicialmente, foi realizada uma varredura entre os comprimentos de onda 400 e 900 nm para averiguar a complexação entre *Chef Ia* e  $\text{CuCl}_2$ , para tal, as amostras foram analisadas na concentração de 3,15  $\text{mmol.L}^{-1}$  em tampão HBS (pH 7,4).

Diversos íons metálicos, incluindo íons  $\text{Cu}^{2+}$ , tem a capacidade de suprimir a fluorescência da calceína, um ligante orgânico, que quando não complexado, emite fluorescência em 520 nm e após ser excitado, em 485 nm (FURRY, 1985). A **Figura 15** exemplifica o ensaio de equilíbrio competitivo com o complexo Cobre-calceína ( $\text{CuCA}$ ) (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  / HBS) realizado a fim de identificar a afinidade de ligação entre cobre e *Chef Ia* ou L-His (0-158  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Posteriormente, ensaios fluorimétricos também foram aplicados para avaliar:

- (i) Estequiometria de ligação da FAM-*Chef Ia* ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  / HBS) a cobre ( $0-10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na ausência e presença de zinco ( $1, 10$  ou  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ );
- (ii) Estequiometria de ligação da FAM-*Chef Ia* ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  / HBS) a zinco ( $0-100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).



**Figura 15.** Esquemática do ensaio de equilíbrio competitivo com o complexo Cobre-calceína (CuCA) na presença do peptídeo *Chef Ia*. Adaptado de REICHERT et al., 2017. Estruturas químicas gentilmente cedidas por Prof. Dr. Breno Espósito.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Purificação e caracterização química dos peptídeos

Os rendimentos das reações de clivagem da resina e desproteção total do peptídeo para obtenção dos produtos brutos variaram de 11% (*Chef I*) a 50% (*Chef Ia* 1ª purificação) (Tabela 11). Todos os análogos, exceto a *Chef I*, foram purificados nas mesmas condições (RP-HPLC em coluna preparativa C<sub>18</sub>, a um fluxo de 10 mL/min, solvente A como 0,1% TFA em água, solvente B como 30%ACN/0,09% TFA em água, detecção a 210 nm) (Tabela 12). O peptídeo *Chef I* foi purificado em sistema de RP-HPLC usando coluna semi-preparativa C<sub>18</sub>, fluxo de 3 mL/min, solvente A como 0,1% TFA/água, solvente B como 20%ACN/0,09% TFA em água e detecção a 210 nm. Todas as purificações foram bem sucedidas, sendo que todos os purificados apresentaram graus de pureza superiores ou iguais a 98%.

Com exceção do peptídeo purificado *Chef I* (massa final de 2,4 mg) todos os outros tiveram seus conteúdos peptídicos (CP) determinados. O peptídeo FAM-*Chef*

*I(3-28)a* apresentou o menor CP (27,08 %), seguido do análogo *FAM-Chef I(6-28)a* (44,48%). Os conteúdos peptídicos dos análogos *Chef Ia* e *FAM-Chef Ia* oscilaram em torno de 56% e 58%, respectivamente. É importante ressaltar que, para as duas purificações realizadas do peptídeo *Chef Ia* os CP obtidos foram bastante próximos (57,8 % e 56,1 %) e que a diferença se explica pelo fato dos peptídeos brutos obtidos procederem de diferentes pesagens de uma mesma peptidil-resina, bem como derivar de diferentes purificações com condições desiguais de calor e umidade, por exemplo.

#### a) **Cheferina I e Cheferina Ia**

Os perfis cromatográficos e a caracterização química dos peptídeos *Chef I* e *Chef Ia* brutos e purificados (1ª purificação) estão apresentados na **Figura 16**. A segunda purificação do peptídeo *Chef Ia* se encontra na **Figura 17**. Os dados de ESI-MS confirmaram as identidades dos peptídeos purificados e os de RP-HPLC, os seus altos graus de pureza (**Tabela 11**).

#### a) **FAM-Chef Ia, FAM-Chef I(3-28)a e FAM-Chef I(6-28)a**

Da mesma forma, os perfis cromatográficos e a caracterização química dos peptídeos *FAM-Chef Ia*, *FAM-Chef I(3-28)a* e *FAM-Chef I(6-28)a* brutos e purificados estão representados nas **Figuras 17 e 18**. Os dados de ESI-MS também confirmaram as identidades dos peptídeos purificados e os seus altos graus de pureza (**Tabela 11**).

## 4.2. Bioensaios

### 4.2.1. Considerações gerais

#### a) **Cepa de *Candida* utilizada**

Inicialmente, os bioensaios foram realizados com o peptídeo *Chef Ia* e as cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6578 e *C. parapsilosis*

**Tabela 11.** Dados de clivagem dos peptídeos das resinas e desproteção total, purificação e caracterização dos peptídeos purificados .

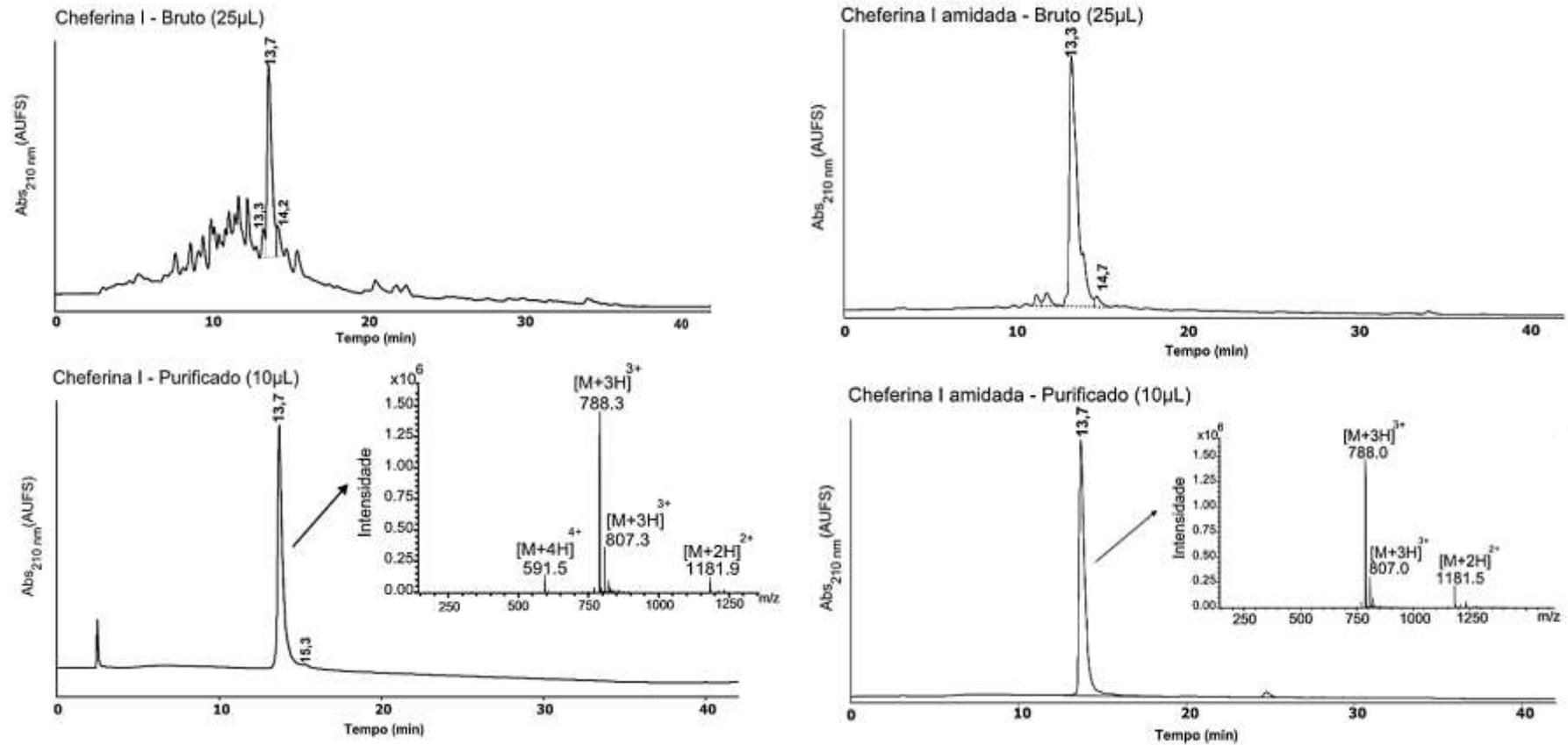
Peptídeo	Massa de peptidil-resina usada (mg)	Bruto Recuperado (%)	Rendimento Purificação (%)	Grau de Pureza*	LC/ESI-MS [M+xH] <sup>x+</sup> esperado/obtido	Conteúdo Peptídico (%)
Chef I	124	18	11	98	788,76/788,3 <sup>(3+)</sup>	ND
Chef Ia ( <b>Purif. 1</b> )	147	42	50	98	788,11/788,0 <sup>(3+)</sup>	57,8
Chef Ia ( <b>Purif. 2</b> )	338	32	26	99	788,11/788,13 <sup>(3+)</sup>	56,1
FAM-Chef Ia	224	35	14	100	907,88/907,4 <sup>(3+)</sup>	58,3
FAM-Chef I(3-28)a	217	30	41	100	834,47/834,0 <sup>(3+)</sup>	27,1
FAM-Chef I(6-28)a	217	30	22	100	751,05/750,3 <sup>(3+)</sup>	44,5

\* Valores obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC). ND: Valor não determinado.

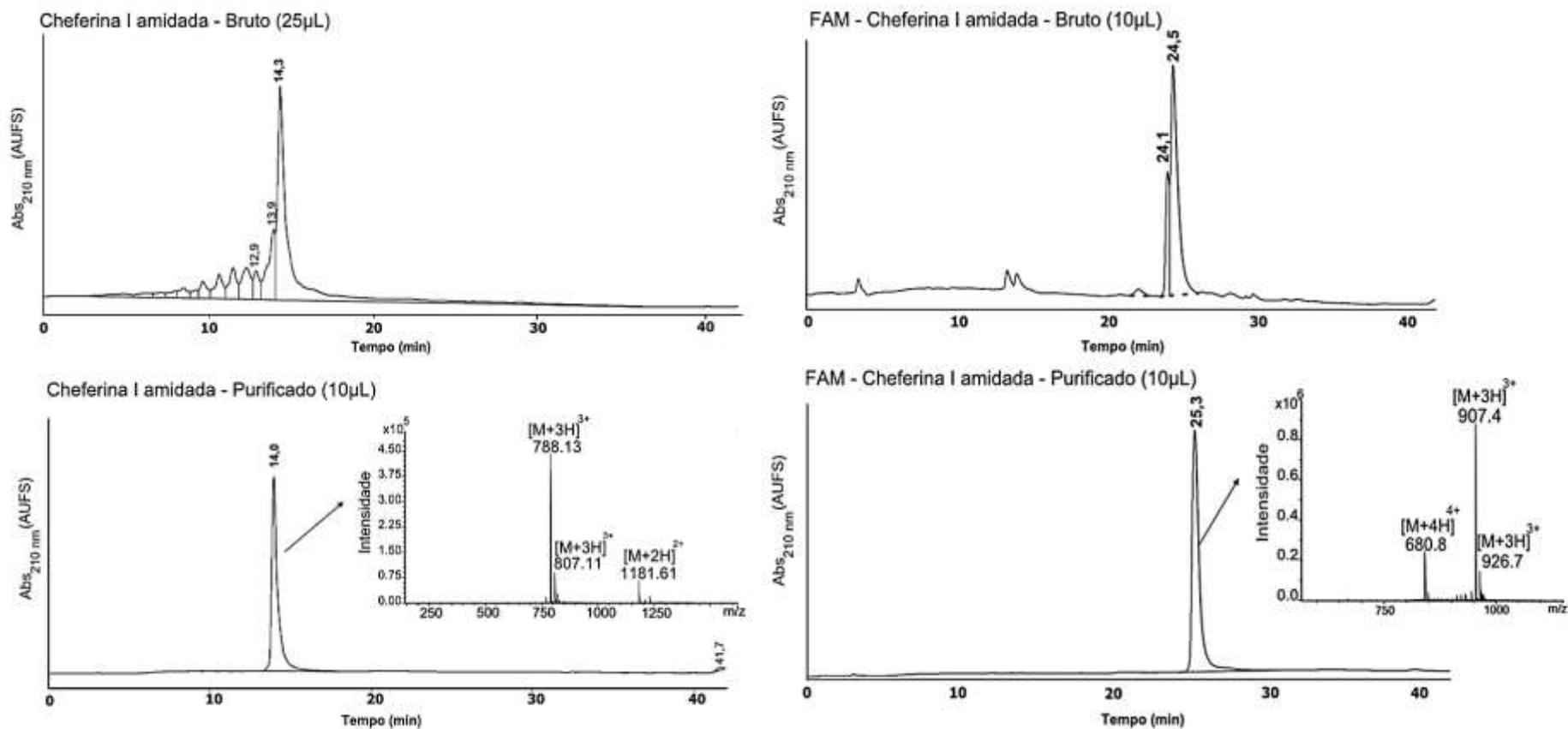
**Tabela 12.** Condições experimentais das purificações realizadas com os peptídeos brutos.

Coluna	PEPTÍDEOS				
	Chef Ia	Chef I	FAM - Chef Ia	FAM - Chef I(3-28)a	FAM - Chef I(6-28)a
	Preparativa C <sub>18</sub>	Semi-preparativa C <sub>18</sub>	Preparativa C <sub>18</sub>	Preparativa C <sub>18</sub>	Preparativa C <sub>18</sub>
<b>Solvente A</b>	0.1% TFA em água	0.1% TFA em água	0.1% TFA em água	0.1% TFA em água	0.1% TFA em água
<b>Solvente B</b>	30% ACN / 0.09% TFA em água	20% ACN / 0.09% TFA em água	30% ACN / 0.09% TFA em água	30% ACN / 0.09% TFA em água	30% ACN / 0.09% TFA em água
<b>Gradiente</b>	5-45% - 90min - 0.44%B/min	15-55% - 130min - 0.3%B/min	40-80% - 90min - 0.44%B/min	35-75% - 130min - 0.31%B/min	30-70% - 130min - 0.31%B/min
<b>Fluxo</b>	10 mL/min	3 mL/min	10 mL/min	10 mL/min	10mL/min
<b>Material Injetado</b>	61,6mg em 5 mL ( <b>Purif. 1</b> ) 108,6 mg em 13 mL ( <b>Purif. 2</b> )	22.5mg em 380µL	69,8mg em 6mL	64,5mg em 6mL	64,7mg em 6mL
<b>Condição Screening</b>	Isocrática de 25% solvente B (fluxo de 1.0 mL/min)	Infusão direta em ESI-MS do material coletado	Isocrática de 55% solvente B (fluxo de 1.5 mL/min)	Isocrática de 55% solvente B (fluxo de 1.0 mL/min)	Isocrática de 55% solvente B (fluxo de 1.0 mL/min)

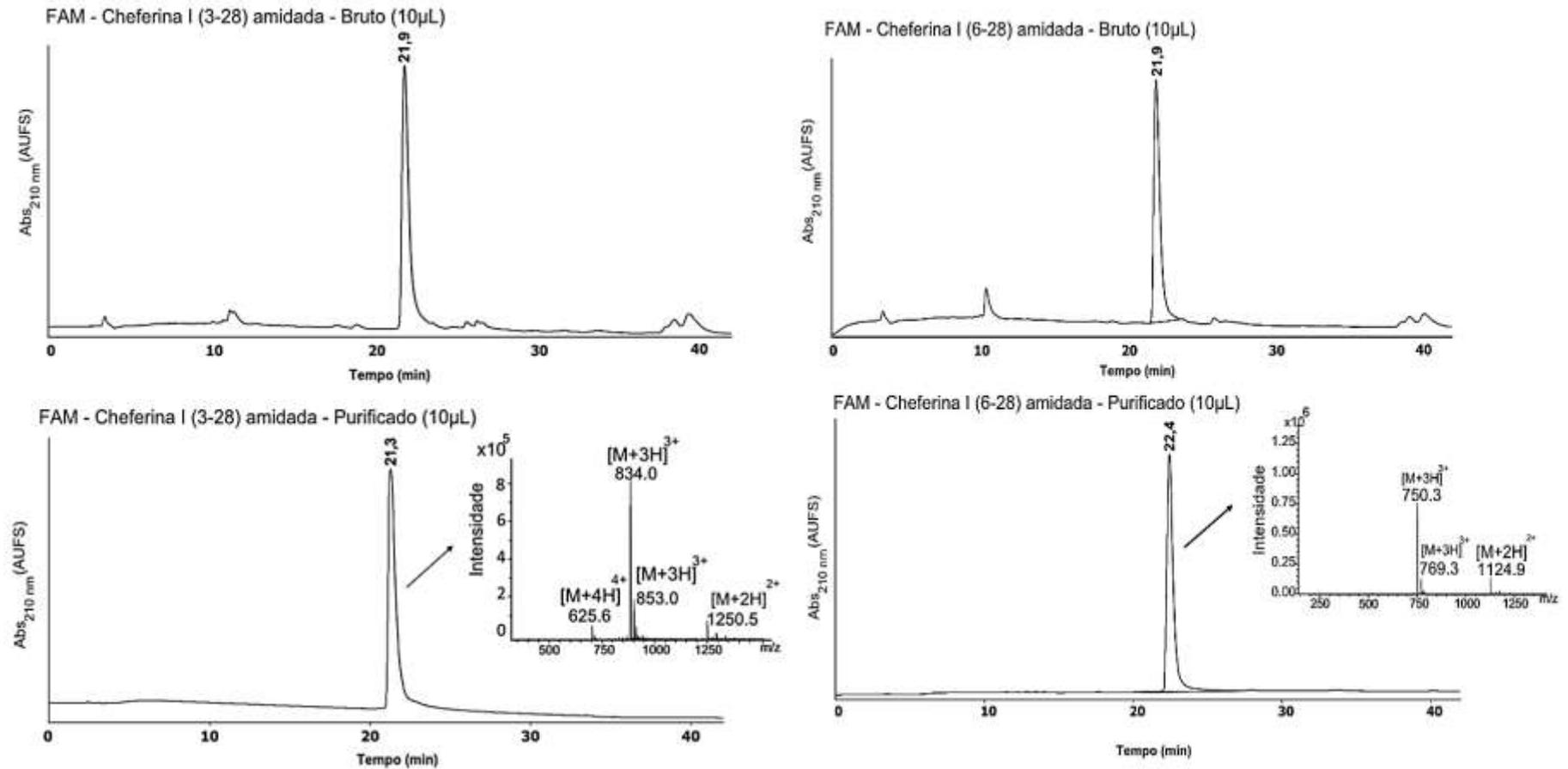




**Figura 16.** Perfis de RP-HPLC da *Chef I* (esq.) e *Chef Ia* (dir./ Purif.1) brutos e purificados; espectros de massas dos purificados. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1% TFA em água, solvente B: 20% ACN / 0,09% TFA em água para *Chef I* e 30% ACN/ 0,09% TFA em água para *Chef Ia*, λ: 210 nm, fluxo: 1 mL/min, gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: voltagem do capilar: 4,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.



**Figura 17.** Perfis de RP-HPLC da *Chef Ia* (esq./ Purif.2) e *FAM-Chef Ia* (dir.) brutos e purificados; espectros de massas dos purificados. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1% TFA em água, solvente B 30% ACN/ 0,09% TFA em água, λ: 210 nm, fluxo: 1 mL/min, gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: voltagem do capilar: 4,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.



**Figura 18.** Perfis de RP-HPLC da *FAM-Chef I(3-28)a* (esq.) e *FAM-Chef I(6-28)a* (dir.) brutos e purificados; espectros de massas dos purificados. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1% TFA em água, solvente B 30% ACN/0,09% TFA em água, λ: 210 nm, fluxo: 1 mL/min, gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: voltagem do capilar: 4,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.

iônica em suas atividades antimicrobianas (IIJIMA; KURATA; NATORI, 1993; SOHNLE et al., 2000; WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2007; SILVA et al., 2009; CARVALHO et al., 2015)-

Desta forma, as atividades antifúngica e fungicida dos peptídeos *Chef Ia* e seu análogo fluorescente (*FAM-Chef Ia*) foram testadas através de testes de microdiluição em caldo para inibição antifúngica de leveduras (método M27-A2 da CLSI), porém com a alteração acima citada. Os testes foram realizados na ausência e presença de meio tamponado.

### c) Íons $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ usados

Para o homem, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são essenciais para a manutenção do balanço de carga e equilíbrio osmótico, em especial para a osteogênese (ALBEE, 1920; SURMENEV; SURMENEVA; IVANOVA, 2014) e contração muscular (ALTURA; ALTURA, 1974; SZENT-GYÖRGYI, 1975; VALERIA, 2016). Estudos relacionam a falta de íons  $\text{Mg}^{2+}$  ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão e osteoporose. Já o aumento intracelular de íons  $\text{Ca}^{2+}$  tem sido relacionado à obesidade em modelos animais e o aumento da razão  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , relacionada a um maior risco cardiovascular (TONICK; MUNEYYIRCI-DELALE, 2016). A **Tabela 14** lista as concentrações destes íons no plasma sanguíneo, com especial enfoque para os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Tabela 14.** Concentrações de alguns íons presentes no plasma sanguíneo. Referências **[A]** WEI et al., 2007 **[B]** CATALANI et al., 2018 **[C]** MAFRA & COZZOLINO, 2004.

	Plasma (mmol.L <sup>-1</sup> )	Ref.
$\text{Ca}^{2+}$	2,5	A
$\text{Mg}^{2+}$	0,5 – 1,0	A
$\text{Na}^+$	140	A
$\text{K}^+$	0,03	A
$\text{Cu}^{2+}$	1,6 – 2,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	B
$\text{Zn}^{2+}$	> 70 mg/dL	C

Cerca de 80% dos íons  $Zn^{2+}$  se encontra ligado à hemoglobina nos eritrócitos ( $42,2 \pm 5,6$  mg/g) e à albumina no plasma (cerca de 16%) (MAFRA; COZZOLINO, 2004). Cerca de 70% dos íons  $Cu^{2+}$  no plasma está ligada à glicoproteína ceruloplasmina, envolvida no metabolismo de ferro e caracterizada por sua atividade oxidase dependente de íons  $Cu^{2+}$  (CATALANI et al., 2018). Os íons  $Cu^{2+}$  são fundamentais para a respiração celular, proteção contra o estresse oxidativo e crescimento normal das células, sendo essenciais em reações catalisadas por diversas enzimas funcionando como seus cofatores, como por exemplo: ceruloplasmina, lisil oxidase, citocromo c oxidase e superóxido dismutase (SOD) (DEVI; DHIVYA M; SULOCHANA, 2016).

Contudo, em excesso, os íons  $Cu^{2+}$  podem desencadear reações de danos oxidativos, como por exemplo, danos ao DNA (CERVANTES-CERVANTES et al., 2005). Estudos associam a quebra da homeostasia de íons  $Cu^{2+}$  à angiogênese tumoral/ metástase, sendo que o aumento intra-tumoral destes íons parece ser uma característica marcante de câncer metastáticos (p. ex. câncer de mama, colo-retal, pulmão, melanoma, pâncreas), devido ao fato destes íons atuarem como cofatores de moléculas efetoras, como fatores de crescimento (p.ex. *vascular endothelial growth fator/ VEGF* e *basic fibroblast growth fator/ bFGF*), fatores de transcrição (p.ex. fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)), além de ocasionar alterações na sinalização MAPK/ERK, fundamental para a sinalização e tradução de respostas a nível celular, incluindo o *on/off* do processo de divisão celular (PAN et al., 2002; DENOYER et al., 2015; JAZAYERI et al., 2016).

O desequilíbrio destes íons também tem sido relacionado às doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (LINDER, 2012; BOU-ABDALLAH; GIFFUNE, 2016; TOKUDA; FURUKAWA, 2016). No

primeiro caso a deposição e acúmulo das placas amilóides/peptídeo A $\beta$  no cérebro têm sido acompanhadas por reações oxidativas, que na presença de íons Cu<sup>2+</sup> são facilitadas devido à coordenação do metal ao peptídeo A $\beta$ , que promove a produção de EROs (LINDER, 2012; KEPP, 2017; GONZALEZ et al., 2018). Já no caso da ELA o desequilíbrio de íons Cu<sup>2+</sup> está relacionado a uma mutação na enzima Cu/Zn Superóxido dismutase 1 (SOD 1) resultando no aumento das concentrações de superóxido, que através de sua toxicidade, impulsiona a degeneração de neurônios saudáveis (PALLOTTA; ANDRADE; BISPO, 2012; BARROS, 2017).

Em contrapartida, íons Zn<sup>2+</sup> são essenciais para diversos processos biológicos, dentre eles: divisão e crescimento celular, cicatrização e resposta imune (ROOHANI et al., 2013). Metaloproteases ligadas a íons Zn<sup>2+</sup> são secretadas por algumas espécies de fungos patogênicos e estão diretamente ligadas a patogenicidade do fungo invasor (YIKE, 2011). A deuterolisina é um exemplo destas metaloproteases, que apresenta duas histidinas de ligação ao zinco e um glutamato em seu centro catalítico (ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018).

Alguns metais de transição são essenciais para invasão de certos patógenos, de tal forma, que o hospedeiro reduz os níveis destes íons metálicos livres (p.ex. Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>) para impedir o crescimento deles em um processo denominado “Imunidade Nutricional” (ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018). Já a deficiência de íons Zn<sup>2+</sup> é associada a problemas neuronais, imunes e de crescimento, que se não corrigidos podem levar à morte (AGGETT, 1983). Mais ainda, a absorção de íons Cu<sup>2+</sup> é afetada quando a concentração de Zn<sup>2+</sup> é maior do que a de íons Cu<sup>2+</sup> (FISHER; GIROUX; L’ABBÉ, 1981). Desta forma, o estudo e desenvolvimento de compostos que quelam estes metais são relevantes sob o ponto de vista científico e médico.

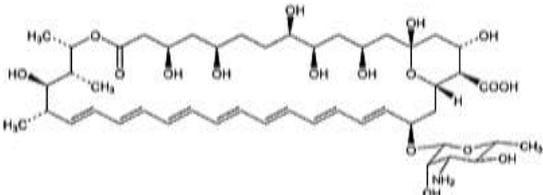
#### d) Bioensaios em meio não tamponado ou tamponado

Devido à característica catiônica dos peptídeos estudados neste trabalho (elevadas proporções de histidina) e elevada flexibilidade estrutural (elevada proporção de glicina), foram realizados bioensaios em meio tamponado e não tamponado para averiguar o efeito do pH e a importância da protonação dos resíduos de histidina em suas atividades. Os testes foram realizados em um meio de cultura não tamponado (meio PDB inalterado com pH 5,1) ou em um meio de cultura chamado de “tamponado” devido a adição do tampão Tris-HCl ao meio PDB com pH final de 7,4. Este tipo de elucidação em diferentes pHs se faz importante e é frequentemente observada na literatura de AMPs catiônicos (WALKENHORST et al., 2013; MALIK et al., 2016; HOLDBROOK et al., 2018; KHALIL et al., 2018).

#### e) Agentes antimicrobianos-controle

Os valores das MICs e MFCs da anfotericina B e melitina obtidos estão listados na **Tabela 15**. Ambos os controles foram ativos no meio de cultura PDB não tamponado em pH 5,1.

**Tabela 15.** Anfotericina B e melitina, suas estruturas e seus valores das MICs e MFCs em células de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em meio PDB pH 5,1.

Compostos	Estrutura ou sequência primária	MIC /MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
Anfotericina B		2/4
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ <sup>26</sup> -NH <sub>2</sub>	3,125/3,125

A anfotericina B é uma molécula anfipática e cíclica composta de 37 carbonos e diversos grupos polares (-OH); a melitina é um peptídeo anfipático, naturalmente amidado e com 26 resíduos de aminoácidos (básicos, aromáticos e ácidos). A

anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos que forma poros na membrana plasmática fúngica através da associação ao ergosterol. A ação em células de *C. albicans* deste composto se dá através da indução da via apoptótica (PHILLIPS; SUDBERY; RAMSDALE, 2003). Já a melitina é um AMP do veneno da abelha-europeia (*Apis mellifera*), que em solução aquosa forma um tetrâmero (TREWILLIGER; EISENBERG, 1981). Em 2005, Liu e colaboradores identificaram a necessidade da hidratação celular para a existência de tal tetrâmero e sua ação antimicrobiana (LIU et al., 2005), sendo esta também associada à apoptose, formação de poros e produção de EROs (PARK; LEE, 2010).

A **Tabela 16** traz valores de MIC e MFC para os dois compostos, bem como a espécie de levedura testada, meio de cultura utilizado, tamanho do inóculo, tempo de incubação e temperatura empregados para a obtenção deles.

**Tabela 16.** Valores de MIC e MFC para Anfotericina B e melitina, espécies de leveduras testadas, meio de cultura, tamanho do inóculo, tempo de incubação e temperatura. ND: valores não determinados.

Levedura		MIC / MFC ( $\mu\text{mo.L}^{-1}$ )	Meio de cultura/ tamanho do inóculo (célis/mL)	Tempo de incubação/ temperatura/ pH	Referências
<b>Anfotericina B</b>					
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	0,25 /ND	YPD / $5 \times 10^5$	24 h / 37°C/6,5	GRAY et al., 2012
		0,25/0,25	RPMI 1640 / $5 \times 10^5$	48 h / 28°C/ 7,0	LYU et al., 2016
		27/ND	YPD / $2 \times 10^4$	48 h / 32°C/ 6,5	SUNG; PARK; LEE, 2008
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	5,4/10,8	RPMI 1640 / $1,5 \times 10^3$	48 h / 35°C/ 7,0	Li et al., 2008
		2/4	PDB / $2,5 \times 10^4$	24 h / 35°C/ 5,1	Presente trabalho
<b>Melitina</b>					
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	3,125/3,125	YPD / $1 \times 10^6$	24 h / 28°C/ 7,2	PARK et al., 2008
		4/8	RPMI 1640 / $5 \times 10^5$	48 h / 28°C/ 7,0	LYU et al., 2016
		8,8/ND	YPD / $2 \times 10^4$	48 h / 32°C/ 6,5	SUNG; PARK; LEE, 2008
		6/ND	RPMI 1640 / $5 \times 10^4$	48 h / 35°C/ 7,0	URBÁN et al., 2007
		1,25/ND	YDP / $2 \times 10^3$	24 h / 28°C/ 6,5	LEE et al., 2003
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	3,125/ND	YPD / $2 \times 10^3$	24 h / 28°C/ 6,5	LEE et al., 2002
		64/64	RPMI 1640 / $2,5 \times 10^5$	24 h / 35°C/ 7,0	WANG et al., 2015
		3,125/3,125	PDB / $2,5 \times 10^4$	24 h / 35°C/ 5,1	Presente trabalho

Tais valores diferem em parte dos aqui obtidos, sendo possível explicar esta diferença através da utilização de meios de cultura diferentes, tamanho do inóculo,

tempo de incubação, pH e temperatura. Como no presente trabalho, Li e colaboradores (2008) utilizaram células de *C. parapsilosis* a 35°C, mas os valores de MIC e MFC encontrados são exatamente o dobro, além de meios de culturas e pHs diferentes, o tamanho de inóculo é menor ( $1,5 \times 10^3$  em relação a  $2,5 \times 10^4$  céls/mL, respectivamente) e o tempo de incubação é o dobro.

As MIC e MFC obtidas para a melitina no presente trabalho são idênticas às obtidas anteriormente em células de *C. albicans* (PARK et al., 2008) e em células de *C. parapsilosis* (LEE et al., 2002) ( $3,125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas diversas às descritas por Wang e colaboradores (2015) para células de *C. parapsilosis* (64 e  $3,125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente). Da mesma forma, esta diferença pode ser explicada pelos diferentes meios de culturas (RPMI 1640 e PDB), pH (7,0 e 5,1) e tamanho de inóculo utilizados ( $2,5 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^4$  céls/mL). Entretanto, por se tratar de um peptídeo catiônico, outra explicação possível é a falta do cálculo do conteúdo peptídico (CP) da melitina utilizada nesses diferentes trabalhos. De fato, a presença de água de hidratação e contra-íons, tais como TFA e íons cloreto e água afetam a concentração de peptídeo na solução de teste.

#### **4.2.2. Bioensaios com *Chef Ia* ou *FAM-Chef Ia* em meio não tamponado**

##### **a) Na ausência de íons divalentes metálicos**

As concentrações mínimas de inibição de crescimento fúngico (MICs) dos peptídeos *Chef Ia* e seu análogo fluorescente (*FAM-Chef Ia*), bem como os valores de suas concentrações mínimas fungicidas (MFCs) estão listados na **Tabela 17**. A MIC observada para *FAM-Chef Ia* foi inferior à da *Chef Ia*. Da mesma maneira, a MFC do peptídeo fluorescente também foi menor.

**Tabela 17.** Peptídeos, suas sequências e seus valores das MICs e MFCs em células de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em meio PDB pH 5,1.

Peptídeos	Sequência primária	MIC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
<b>Chef Ia</b>	GY-GGH-GGH-GGH-GGH-GGH-GGH-GHG	25	100
<b>FAM-Chef Ia</b>	FAM-GY-GGH-GGH-GGH-GGH-GGH-GGH-GHG	12,5	25

Em trabalho anterior, Park et al. (2000) demonstraram que o peptídeo natural *Chef I* era ativo frente às bactérias gram-negativas (*Erwinia herbícola*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *P. syringae*, *Salmonella typhimurium* e *Serratia sp.*) e fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium culmorum*) com  $\text{IC}_{50}$  de  $<2,5 - 62 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Entretanto, em trabalho recente de nosso laboratório, Remuzgo et al. (2014) obtiveram a *Chef I* sintética altamente purificada e observaram atividade frente a fungos (*C. albicans* MDM8, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* HU 168 - resistente a fluconazol, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* Squibb 1600 e *S. cerevisiae* ATCC 2601) com MICs de  $1,56 - 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , mas não frente às bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* A270, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) e gram-negativas (*E. coli* SBS 363, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, *Enterobacter cloacae* K12, *Serratia marcescens* CDC 4124), tampouco em fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* NCPF 2199 e *Aspergillus fumigatus* NCPF 2109).

Com relação aos análogos sintéticos de *Chef I*, o nosso grupo foi pioneiro em obtê-los e testá-los: o amidado (*Chef Ia*) foi ativo frente a *C. albicans* MDM8 (MIC  $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. albicans* ATCC 90028 (MIC  $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. albicans* HU 168 - resistente a fluconazol (MIC  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC  $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. krusei* ATCC 6258 (MIC  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. tropicalis* Squibb 1600 (MIC  $1,56 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e *S. cerevisiae* ATCC 2601 (MIC  $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Da mesma forma, seu análogo fluorescente *FAM-Chef Ia* apresentou atividade frente à *C. albicans* MDM8

(MIC 3,13  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), *C. albicans* ATCC 90028 (MIC 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (REMUZGO et al., 2014).

No presente trabalho observamos o mesmo, isto é, o análogo fluorescente *FAM-Chef la* se mostrou mais ativo que *Chef la* (MIC 12,5 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente; **Tabela 17**). A diferença entre os valores de MIC pode ser explicada pela utilização de linhagens diferentes de microrganismos e condições de cada teste. Condições como temperatura, umidade, tamanho do inóculo, tempo de incubação, pH do meio, concentração de glicose e a forma de leitura (a “olho nu” ou espectrofotométrica/*endpoint*) influenciam os valores de MIC obtidos e podem levar a resultados discrepantes (REVANKAR et al., 1998; ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002; COENYE et al., 2008). Como já descrito no **item 1.3.**, a comparação de valores de MIC para mesmos compostos e o possível uso destes como um agente terapêutico requer muito cuidado e atenção.

Quanto à atividade candidacida, os resultados confirmaram a maior atividade da *FAM-Chef la*, sendo a diferença com *Chef la* ainda mais marcante.

**b) Na presença de íons metálicos divalentes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$**

Remuzgo et al. (2014) observaram influência positiva dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na atividade do análogo *Chef la* frente às células de *Candida albicans* (MDM8, ATCC 90028 e HU 168/resistente a fluconazol), sendo que a presença destes íons o tornou 2 a 8 vezes mais potente (REMUZGO et al., 2014). Por essa razão, no presente trabalho foi realizada uma análise mais detalhada deste tipo de influência. Os resultados com os valores das MICs e MFCs encontrados estão na **Tabela 18**.

**Tabela 18.** Valores das MICs e MFCs obtidos para *Chef Ia* e *FAM-Chef Ia* frente a *C. parapsilosis* em meio PDB (pH 5,1) na ausência e presença dos íons divalentes.

<i>Chef Ia</i> +	MIC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) / MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )				
	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )	25/100	50/>100	100/>100	100/>100	>100/>100
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	25/100	25/100	25/50	12,5/12,5	6,25/12,5
Magnésio ( $\text{MgCl}_2$ )	25/100	50/>100	50/>100	50/>100	100/>100
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	25/100	3,125/>100	0,78/>100	0,78/>100	0,39/>100

<i>FAM-Chef Ia</i> +	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	12,5/25	12,5/100	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	12,5/25	3,125/25	0,78/25	0,78/25	0,39/25

Os resultados indicaram que a *Chef Ia* teve sua atividade negativamente influenciada pelos íons divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . De fato, na presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  os valores de MIC aumentaram de 2 a 4 vezes a partir de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente, sendo que na presença de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  o peptídeo perdeu a sua atividade; nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$  os valores de MIC aumentaram em 2 vezes, sendo que na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$  a atividade de inibição de crescimento do peptídeo foi mais afetada (aumento de 4 vezes na MIC).

Já os valores de MFC do peptídeo *Chef Ia* na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  evidenciaram que nas concentrações testadas destes íons o peptídeo *Chef Ia* foi capaz de inibir o crescimento de *C. parapsilosis* nos valores descritos na **Tabela 18**. Tais resultados podem ter relação com o conhecimento de que a atividade antimicrobiana de peptídeos catiônicos é antagonizada em presença dos cátions divalentes  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (em concentrações fisiológicas de 1-2  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) e cátions monovalentes como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (100  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) (HANCOCK; SAHL, 2006).

De fato, é possível encontrar diversos trabalhos que evidenciam essa influência negativa destes cátions. Por exemplo, Wu et al. (1999) observaram o efeito dos íons  $\text{K}^+$  nas atividades de alguns AMPs catiônicos, tendo notado que para

os peptídeos com estrutura  $\alpha$ -hélice (CP26, CEME, CEMA e CP29) os íons  $K^+$  não afetaram suas atividades, mas para outros como os peptídeos gramicidina S e indolicidina ocorreu aumento das MICs de 2 a 4 vezes em presença de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $K^+$  (WU et al., 1999). Iijima et al.(1993) observaram a influência negativa de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  na atividade anticandida do peptídeo rico em glicina e histidina AFP (**Tabela 6**), sendo que na concentração de  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  dos sais  $CaCl_2$  e  $MgCl_2$  a atividade do peptídeo foi totalmente perdida (IIJIMA; KURATA; NATORI, 1993). Da mesma forma, a atividade do análogo truncado do peptídeo rico em histidina MUC7 (MUC7 – 20 mer ou mucina salivar humana/ **Tabela 6**), MUC7-12mer, frente à *C. albicans* foi reduzida em presença de íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  a  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  (BOBEK; SITU, 2003). Similarmente, a atividade do peptídeo HP 2-20 (AKKVFKRLEKLFSKIQNDK<sup>19</sup>) caracterizado por formar poros em membrana plasmática de *C. albicans*, foi perdida na concentração de  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  dos íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (LEE et al., 2002; PARK et al., 2008). Já a adição de íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  bloquearam a ação da lactoferrina (**Tabela 5**) ao dificultar a sua interação com os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana plasmática de células de *E. coli* (FARNAUD; EVANS, 2003). Assim os resultados obtidos neste trabalho, em presença dos íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , corroboram com aqueles descritos na literatura para AMPs catiônicos e/ou ricos em histidina e/ou glicina.

Em contrapartida, os íons metálicos  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  podem ter influência positiva na atividade de diversos AMPs catiônicos, dependendo diretamente da composição de resíduos de aminoácidos e da estrutura do peptídeo (LIBARDO et al., 2014; ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018). Os resultados demonstram que os íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  afetaram diferentemente a atividade dos peptídeos *Chef Ia* e FAM-*Chef Ia*, influenciando suas atividades fungistáticas/anticandida (**Tabela 18**).

De fato, enquanto a atividade do peptídeo FAM-*Chef la* não foi afetada nas concentrações testadas de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , a de *Chef la* foi influenciada positivamente em concentrações iguais ou superiores a  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , onde observamos um decréscimo de 2 a 4 vezes nos valores de MIC ( $50$  e  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , respectivamente). Na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  foi possível observar melhor esta influência positiva, pois para ambos os peptídeos observamos decréscimo nas MICs, sendo que na presença de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  os valores de MIC decresceram em 4 e 8 vezes para FAM-*Chef la* e *Chef la*, respectivamente. A  $25$  e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , os valores das MICs diminuíram em 16 e 32 vezes, sendo que em  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  este decréscimo foi de 32 e 64 vezes, respectivamente. Tais diminuições dos valores de MICs permitem inferir uma maior influência dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  sobre a atividade anticandida do peptídeo *Chef la* em relação aos íons  $\text{Cu}^{2+}$ .

Estes resultados estão de acordo com os da literatura referentes a peptídeos ricos em histidina e peptídeos com a capacidade de coordenar zinco, tais como bacitracina A, dermcidina, clavanina A, kappacina e calprotectina (ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018). A bacitracina A é um AMP cíclico que na presença de íons  $\text{Mn}^{2+}$  inibe o crescimento de *S. aureus* e *Enterococcus spp.* Entretanto, sua ação antimicrobiana provém da ligação do peptídeo aos íons  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e à molécula de bactoprenol, essencial para a biossíntese de parede celular bacteriana (STORMS; STROMINGER, 1973).

Os íons  $\text{Zn}^{2+}$  também são fundamentais para a ação antimicrobiana do AMP dermcidina (DCD-1L: SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAVHDVK DVLDSVL<sup>48</sup>). Estes íons são responsáveis pela estabilização do canal formado na membrana plasmática pela sua ação, sendo ele formado por três dímeros antiparalelos de  $\alpha$ -hélice do peptídeo inserido perpendicularmente à membrana

plasmática (BECUCCI et al., 2014; ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018). Similarmente, a atividade antibacteriana da clavanina A (ClavA/**Tabela 6**) também é influenciada positivamente por íons  $Zn^{2+}$ , que potencializam a despolarização de membrana, fluxo extracelular de íons  $K^+$  e a formação de poros (JULIANO et al., 2017). O quelato Zn-ClavA induz a morte celular de *E. coli* através de danos ao DNA plasmidial (LEE; CHO; LEHRER, 1997; JULIANO et al., 2017).

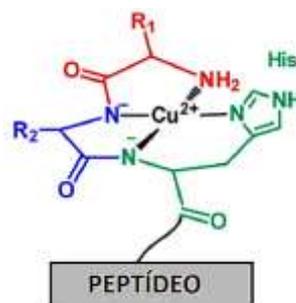
Outro exemplo da influência dos íons  $Zn^{2+}$  na atividade de AMP catiônico é a kappacina/ $\kappa$ -caseína não glicosilada (MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEA VESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV<sup>64</sup>), antibacteriano que se torna ativo em pH alcalino (pH 7,2) frente às células de *Streptococcus mutans* ao interagir com 2 íons  $Zn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  (DASHPER et al., 2005). De forma semelhante, a calprotectina que contém duas cadeias polipeptídicas só exibe atividade frente à *C. albicans* na presença de  $Zn^{2+}$  ( $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), sendo este íon responsável pela formação de seu heterodímero (MRP8-MRP14) e consequente atividade anticandida (SOHNLE et al., 2000).

Com relação às MFCs de *Chef la*, os íons divalentes metálicos testados  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  não influenciaram positivamente sua atividade candidada. O mesmo não ocorreu em concentrações iguais ou superiores a  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $Cu^{2+}$ , pois a *Chef la* exibiu atividade fungicida/candidada influenciada positivamente (diminuição de 2 a 4 vezes da MFC).

Quanto ao análogo fluorescente FAM-*Chef la*, a sua atividade candidada não foi influenciada na presença de  $Zn^{2+}$  (MFC:  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ao contrário do que ocorreu com a sua atividade anticandida. Os íons  $Cu^{2+}$  influenciaram de forma singular sua atividade: negativamente em  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $Cu^{2+}$  (aumento de 4 vezes da MFC, indicando atividade anticandida) e positivamente a partir de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de

$\text{Cu}^{2+}$  (diminuição de 2 vezes da MFC, indicando atividade candidacida). Assim, de forma geral, observou-se um padrão similar de influência dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  nas atividades candidacidas dos peptídeos *Chef Ia* e *FAM-Chef Ia*, o mesmo não ocorrendo com íons  $\text{Zn}^{2+}$ .

Tais observações estão em sintonia com estudos anteriores que verificaram a influência de íons divalentes nas atividades de AMPs ricos em histidina. Dentre eles, estão as histatinas, em especial a Hst 5 (**Tabela 6**), que apresenta maior atividade frente à *C. albicans* (MELINO et al., 1999) e liga  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  com alta afinidade devido ao motivo N-terminal ATCUN (**Figura 19**), que será discutido mais profundamente no **item 4.5** dessa dissertação. Devido à presença do sítio de ligação a  $\text{Zn}^{2+}$  (descrito como: HEXXH) as histatinas também quelam íons  $\text{Zn}^{2+}$  (MELINO et al., 1999; BREWER; LAJOIE, 2000).



**Figura 19.** Esquema do motivo ATCUN de um peptídeo. Adaptado de GONZALEZ et al., 2018.

De fato, Melino e colaboradores (1999) verificaram que a coordenação entre íons  $\text{Zn}^{2+}$  e a Hst 5 é responsável pela sua maior estruturação em  $\alpha$ -hélice em pH 7,3. Esses autores observaram que na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  o peptídeo induziu a fusão de lipossomos e se tornou mais ativo frente à *C. albicans*, sendo a ordem de influência positiva dos íons divalentes metálicos testados a seguinte:  $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$  (MELINO et al., 1999). A ação bactericida frente à *E. faecalis* da Hst 5 também foi aumentada na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  e diminuída em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , todos em  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (RYDENGARD et al., 2006). A quelação de

íons  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  à Hst 5 também a tornou resistente à ação proteolítica da tripsina (PURI et al., 2015).

De uma maneira geral, a ação da Hst 5 em células de *Candida albicans* é descrita pelos seguintes eventos: associação ao componente da parede celular (laminarina /  $\beta$ 1-3 glicano), acúmulo intracelular, inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria, extravasamento extracelular de ATP, interferência na enzima SOD (desequilíbrio no estresse oxidativo) e ligação ao DNA associada à atividade nuclease em presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  (GYURKO et al., 2000; MELINO et al., 2006, 2014; JANG et al., 2010; PURI; EDGERTON, 2014). Em presença de  $\text{Zn}^{2+}$  a Hst 5 se dimeriza e causa a fusão de membrana com formação de poros, o que explica o aumento de sua atividade quando em presença destes íons (MELINO et al., 2014).

A literatura também apresenta outros exemplos. Cole e colaboradores (2001) estudaram a ação de íons divalentes metálicos na atividade do peptídeo calcitermina (VAIALKAAHYHTHKE<sup>15</sup>), um derivado da proteína calgranulina C, tendo observado que a presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) era capaz de recuperar a atividade do peptídeo frente às células de *Listeria monocytogenes* e aumentá-la frente às células de *E. coli* (2 a 4 vezes). Eles também observaram uma influência negativa dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  na atividade da calcitermina, sendo que em  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  desses íons o peptídeo tornou-se inativo (COLE et al., 2001). Seis anos depois, Wei e colaboradores (2007) descreveram o aumento da atividade frente às células de *C. albicans* (diminuição de 2 vezes da MIC) do análogo truncado MUC7 12-mer em presença dos íons  $\text{Zn}^{2+}$ . Esses autores também observaram que a atividade antifúngica do peptídeo, mais alta em pHs 7-9, foi afetada negativamente por íons  $\text{Ca}^{2+}$  (aumento de 4 vezes da MIC) e ficou inalterada em presença de íons  $\text{Mg}^{2+}$  (até

5 mmol.L<sup>-1</sup>) (WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2007). Sete anos depois, Walkenhorst e colaboradores descreveram sinergismo entre o peptídeo antimicrobiano catiônico ARVA (RRGWALRLVLAY<sup>12</sup>-NH<sub>2</sub>) e os íons Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> na inibição de crescimento de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (WALKENHORST; SUNDRUD; LAVIOLETTE, 2014). Mais recentemente, Juliano e colaboradores (2017) também evidenciaram a influência dos íons Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> na atividade do peptídeo ClavA (**Tabela 6**) frente às células de *E. coli* (MIC 64 µmol.L<sup>-1</sup>), pois notaram a perda de atividade do peptídeo na presença de íons Ca<sup>2+</sup> na relação 2 metal: 1 peptídeo e o seu aumento na presença dos íons Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> (diminuição da MIC em 2 e 16 vezes, respectivamente) (JULIANO et al., 2017).

Por outro lado, a microplusina (HHQELCTKGDDALVTELECIRLRISPETNAA FDNAVQQLNCLNRACAYRKMCATNNLEQAMSVYFTNEQIKEIHDAATACDPEAHHE HDH<sup>90</sup>) é um peptídeo aniônico descrito como rico em cisteína e em histidina (suas porções N- e C-terminais) e quelante de íons Cu<sup>2+</sup> que não apresentou alterações de atividade frente a *Micrococcus luteus* na presença dos íons Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Entretanto, ele tem a sua atividade diminuída em presença de íons Cu<sup>2+</sup> (aumento de 8 vezes a MIC), sendo importante ressaltar que ele teve sua ação antibacteriana atribuída à “inanição/privação” de íons Cu<sup>2+</sup> (SILVA et al., 2009). Igualmente, o análogo truncado e amidado da Hst 5, P113 ou Demegen (Hst 5<sub>4-15</sub>: AKRHHGYKRKFH<sup>12</sup>-NH<sub>2</sub>) teve sua atividade em células de *C. albicans* perdida na presença de Cu<sup>2+</sup> (MIC > 500 µg/mL) e aumentada na presença de íons Zn<sup>2+</sup> (redução de 15 vezes da MIC). O estudo ainda enfatizou a possibilidade de estes íons atuarem como agonistas *in vivo* e do P113 levar à morte celular por coordenar estes íons tornando-os indisponíveis (semelhante à microplusina) (PORCIATTI et al., 2010).

Sumarizando, é possível notar diversos padrões de influências dos íons metálicos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Zn}^{2+}$  nas atividades dos AMPs aqui analisados e descritos, o que ratificam os resultados obtidos com os análogos *Chef la* e *FAM-Chef la*.

#### 4.2.3. Bioensaios com *Chef la* ou *FAM-Chef la* em meio tamponado

A fim de averiguar o estado de protonação dos oito resíduos de histidina presentes nos peptídeos *Chef la* e *FAM-Chef la*, optou-se pelo uso do pH 7,4 através da adição do tampão Tris-HCl ao meio de cultura PDB (como descrito no item 4.2.1.). Entretanto, nenhum dos peptídeos apresentou atividade neste meio tamponado (**Tabela 19**), corroborando os demais encontrados na literatura para AMPs ricos em histidina (p.ex. MUC7, H5WYG, Hst 5 e LAH4) que mostram que, de maneira geral, as atividades antimicrobianas destes AMPs são aumentadas em pH ácidos e reduzidas em pH alcalinos principalmente devido à protonação dos grupos imidazólicos que lhes conferem maior carga líquida (SATYANARAYANA et al., 2000; AISENBREY; BECHINGER, 2014; WANG, 2014; NICOL et al., 2018).

**Tabela 19.** Valores das MICs e MFCs de *Chef la* e *FAM-Chef la* em meio PDB tamponado (pH 7,4) frente a *C. parapsilosis* na ausência ou presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . ND: não determinado.

<i>Chef la</i> +	MIC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) / MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )				
	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	25/>100

<i>FAM-Chef la</i> +	MIC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) / MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )				
	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	>100/>100	ND	ND	>100/>100	>100/>100
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	ND	ND	>100/>100	>100/>100

O efeito do pH na atividade antimicrobiana do peptídeo rico em histidina *ClavA* foi examinado por Lee e colaboradores (1997), que o testaram e seu análogo amidado (*ClavA-NH<sub>2</sub>*) nos pH 5,5, pH 6,5 e pH 7,4, verificando maior atividade frente a *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *C. albicans* em pH 5,5 do que em pH

7,4, sendo que nenhum dos dois foi capaz de permeabilizar as membranas de *E. coli* em pH 7,4 (LEE; CHO; LEHRER, 1997). De forma semelhante, as gaduscidinas 1 e 2 (Gad 1 e Gad2/**Tabela 6**) apresentam atividades antimicrobianas dependentes de pH, pois estudo de 2015 evidenciou maior atividade de Gad 2 em pH ácido (pH 5) que em pH alcalino (pH 7) frente às células de *E. coli*, bem como capacidade de matar linhagens de células cancerígenas (carcinoma, ovário e próstata) através da formação de poros e rompimento da membrana celular (MCDONALD et al., 2015). Outro exemplo é o peptídeo calcitermina, estudado por Cole et al., 2001, que é mais ativo em pH 5,4, (*E. coli* e *L. monocytogenes*) e inativo em pH 7,4 (COLE et al., 2001).

Aisenbrey e Bechinger (2014) demonstraram a influência dos íons  $K^+$  na orientação e atividade antimicrobiana do peptídeo rico em histidina (LAH4/**Tabela 6**) que atua através de inserções na bicamada lipídica. Os resultados demonstraram que LAH4 foi mais ativo em pH menores que 5 do que em pH superiores a pH 7 (AISENBREY; BECHINGER, 2014). Devemos citar, entretanto, alguns AMPs que são mais ativos em pH alcalinos como o MUC7 20-mer/**Tabela 6**, que apresentou maior atividade anticandida para *C. albicans* em pH 7 - 9 do que em pH 5 - 6 (WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2007). Outro exemplo é o peptídeo dermcidina/ **Tabela 6**, que exibiu melhor estabilização dos dímeros de  $\alpha$ -hélice em pH 7,0 na presença de íons  $Zn^{2+}$  (BECUCCI et al., 2014).

Portanto, os resultados obtidos em meio não tamponado em pH 5,1 (**Tabela 18**) e em meio tamponado em pH 7,4 na presença de íons  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  mostrados na **Tabela 19** concordam com aqueles os citados acima, pois como é possível notar, em  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $Cu^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$  a atividade anticandida do peptídeo *Chef Ia* foi restaurada (MIC 100 e  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente), o que não ocorreu para FAM-

*Chef Ia*. No meio tamponado em pH 7,4 nenhum dos peptídeos apresentou atividade candidada na ausência ou presença dos íons, sugerindo que para cada peptídeo houve a formação de quelatos estruturalmente diferentes na presença de cada íon aumentando ou diminuindo sua atividade frente às células de *C. parapsilosis*. Ainda é importante mencionar que Kulon e colaboradores (2008) estudaram a capacidade de coordenação do peptídeo Demegen - P113 (análogo truncado da Hst 5) com íons  $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes pHs e com maior estabilidade e atividade em pHs 5 - 6.

Em geral, biomoléculas que contém histidinas envolvidas na coordenação de íons  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  se mostram mais ativos em pH ácidos principalmente devido à protonação desses resíduos, que favorecem a coordenação (LEE; CHO; LEHRER, 1997; COLE et al., 2001; ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018). Situações similares foram evidenciadas em algumas proteínas humanas que reconhecem peptideoglicanos (WANG et al., 2007), como a glicoproteína rica em histidina (HRG) que se liga a heparina e  $\text{Zn}^{2+}$  (MORGAN, 1981; RYDENGÅRD et al., 2007). A ligação da HRG à heparina depende da protonação dos resíduos de histidina (13% de sua composição) em pH ácido, que na presença dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  sofre uma mudança conformacional que resulta em uma ligação de maior afinidade à heparina (JONES; HULETT; PARISH, 2005).

Segundo a *PhytAMP* (base de dados de AMPs de plantas/ HAMMAMI et al., 2009), o ponto isoelétrico (pI) do peptídeo *Chef I* é 8,04. Se levarmos em conta os valores de pKas descritos na **Tabela 20**, é possível calculá-lo para seus análogos chegando a 9,62 para *Chef Ia* e 8,24 para o análogo fluorescente *FAM-Chef Ia*. A **Tabela 21**, portanto, traz as cargas líquidas dos análogos nos pHs de estudo 5,1 e pH 7,4.

**Tabela 20.** Relação dos valores de pKa dos grupos ionizáveis presentes nos peptídeos estudados. Referências **(1):** (NELSON; COX, 2002) **(2):** (MOLECULAR PROBES, 2010)

Grupos	pKa	Ref.
$\gamma$ COOH	2,35	1
Histidina	6,0 (pK <sub>R</sub> )	1
5(6)-carboxifluoresceína ou FAM	6,4	2
$\alpha$ NH <sub>2</sub>	9,87	1
Tirosina	10,07 (pK <sub>R</sub> )	1

**Tabela 21.** Cargas líquidas estimadas dos peptídeos *Chef la* e *FAM-Chef la* nos pHs 5,1 e 7,4, bem como os estados de protonação previsto de suas histidinas.

	pH 5,1		pH 7,4	
	Carga líquida	Estado das histidinas	Carga líquida	Estado das histidinas
<i>Chef la</i>	+9	Protonadas	+1	Desprotonadas
<i>FAM-Chef la</i>	+9	Protonadas	0	Desprotonadas

Em resumo, os resultados aqui descritos estão de acordo com os da literatura ao indicarem que a ação antimicrobiana dos peptídeos estudados são favorecidas em pH 5,1 e, principalmente, quando coordenados com íons Cu<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup>. De fato, a protonação dos resíduos de histidina parece ser um fator limitante para a atividade biológica dos peptídeos *Chef la* e *FAM-Chef la* nos pHs estudados.

#### 4.2.4. Bioensaios com *Chef la* ou *FAM-Chef la* em meios não tamponado ou tamponados de alta força iônica

- Na ausência/presença dos íons Zn<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>

Por se tratar de peptídeos catiônicos era esperado que as suas atividades antifúngicas fossem alteradas em presença de NaCl. Esta alteração ocorre, principalmente, devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas entre o AMP e os grupos aniônicos da membrana celular, primeira etapa do modo de ação de AMPs (vide item 1.2.). Os ensaios realizados em pH 5,1 e 7,4 na ausência dos íons Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> evidenciaram inatividade. Ambos os peptídeos só foram ativos em pH 5,1 na presença dos íons (**Tabela 22**).

Resultados semelhantes foram encontrados por Remuzgo e colaboradores (2014) para *Chef la*, pois somente em 17,1 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl o peptídeo foi ativo

(MIC  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) frente às células de *C. albicans* MDM8. Contudo, em concentrações iguais ou superiores a  $34,3 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl o peptídeo perdeu totalmente sua atividade (REMUZGO et al., 2014).

Diversos resultados da literatura encontrados para peptídeos ricos em glicina e/ou histidina ratificam tais resultados como, por exemplo, os obtidos para o peptídeo AFP (**Tabela 6**), que teve sua atividade abolida frente à *C. albicans* na concentração de  $154 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl (IIJIMA; KURATA; NATORI, 1993).

**Tabela 22.** Valores das MICs e MFCs da *Chef Ia* e *FAM-Chef Ia* frente a *C. parapsilosis* em presença de NaCl ( $42,8 - 154 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), pH 5,1, na ausência e presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . ND: não determinado.

		MIC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) / MFC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )				
<i>Chef Ia</i> +	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
<b>42,8 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	3,125/>100	1,56/>100	0,78/>100	
<b>85,6 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	50/>100	
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	12,5/>100	3,125/>100	1,56/>100	0,78/>100	
<b>154 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	>100/>100	1,56/>100	0,78/>100	0,78/>100	
<b>FAM-Chef Ia +</b>						
	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
<b>42,8 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	ND	ND	ND	1,56/3,125	
<b>85,6 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	ND	ND	ND	1,56/3,125	
<b>154 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl +</b>						
Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )	>100/>100	ND	ND	ND	3,125/3,125	

Da mesma forma, o análogo MUC7 12-mer, rico em histidina, teve sua atividade afetada a partir de  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, sendo praticamente perdida em  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  (10% de perda da viabilidade celular de *C. albicans*)(WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2007). Similarmente, os peptídeos ClavA (**Tabela 6**) e seu análogo amidado foram inativos frente às células de *E. coli* (LEE; CHO; LEHRER, 1997) em NaCl  $300 \text{ mmol.L}^{-1}$ , bem como o peptídeo magainina-1 foi inativo em NaCl

100 mmol.L<sup>-1</sup>. O peptídeo tenecin 3 (**Tabela 6**) também perdeu sua atividade frente à *C. albicans* e *S. cerevisiae* na presença de NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, reforçando a influência negativa destes íons monovalentes na atividade dos peptídeos ricos em glicina e/ou histidina (KIM et al., 2001).

Já com relação aos AMPs catiônicos, podemos citar o do peptídeo catiônico HP (2-20) (AKKVKRLEKLFISKIQNDK<sup>19</sup>), inativo frente à *C. albicans* em presença de NaCl 135 mmol.L<sup>-1</sup> (PARK et al., 2008) e o peptídeo anfipático calcitermina (VAIALKAAHYHHTHKE<sup>15</sup>) inativo frente à *E. coli* em NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> (COLE et al., 2001). Por outro lado, sabe-se que os derivados sintéticos de cecropina e melitina (CEME, CEMA, CP26, CP29, CP201 e CP208) estudados por Friedrich e colaboradores (1999) tiveram mantidas a atividade de permeabilização celular em *Pseudomonas aeruginosa* a 300 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl (FRIEDRICH et al., 1999) e que o peptídeo P18 (derivado de cecropina A e magainina 2) foi capaz de matar *C. albicans* na presença de 100-200 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, (SHIN et al., 2002). Da mesma forma, as seis catelicidinas estudadas por Travis e colaboradores (2000), que incluem LL-37 e CAP18, foram ativas em 25 a 175 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl (TRAVIS et al., 2000), apesar de a primeira ter sido inativada frente à *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em 140 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl e concentrações superiores do sal (TANAKA; MIYASAKI; LEHRER, 2000).

Resumidamente, os resultados em altas salinidade e força iônica obtidos no presente trabalho na ausência dos íons Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> estão em concordância com os resultados encontrados na literatura para peptídeos ricos em histidina e/ou glicina. Como mostra a **Tabela 22** em NaCl 42,8 mmol.L<sup>-1</sup> e nas concentrações testadas de Cu<sup>2+</sup>, o peptídeo *Chef la* não foi ativo. Na mesma concentração de NaCl ele foi capaz de recuperar sua atividade a partir de 25 µmol.L<sup>-1</sup> de Zn<sup>2+</sup> (MIC 3,125 µmol.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>), tendo sido observada a diminuição da MIC de 2 e 4 vezes em 50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do metal, respectivamente). Em NaCl 85,6  $\text{mmol.L}^{-1}$  os íons  $\text{Cu}^{2+}$  (100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram capazes de recuperar a atividade anticandida do peptídeo (MIC 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), o mesmo ocorrendo com íons  $\text{Zn}^{2+}$  a partir de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (diminuição da MIC de 4, 8 e 16 vezes em 25, 50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ , respectivamente). Finalmente, em NaCl 154  $\text{mmol.L}^{-1}$  em presença dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  *Chef la* se mostrou inativo, oposto ao que ocorre nas mesmas condições em presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$ , sendo que a partir de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  a MIC foi de 1,56  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Com relação aos valores de MFC os resultados também mostrados na **Tabela 22**, indicaram inatividade candidacida do peptídeo *Chef la* em todas as concentrações de NaCl testadas.

Quanto ao peptídeo FAM-*Chef la*, ele foi ensaiado apenas em 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  nas três concentrações de NaCl já citadas acima. Em todas elas, o peptídeo foi ativo na presença de  $\text{Zn}^{2+}$ , as MICs foram de 1,56 - 3,125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  evidenciando mais uma vez sua influência positiva na atividade anticandida. Com relação aos valores de MFC os resultados obtidos indicaram atividade fungicida/candidacida significativa (3,125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) do peptídeo FAM-*Chef la* quando em presença de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{Zn}^{2+}$  nas concentrações de NaCl testadas.

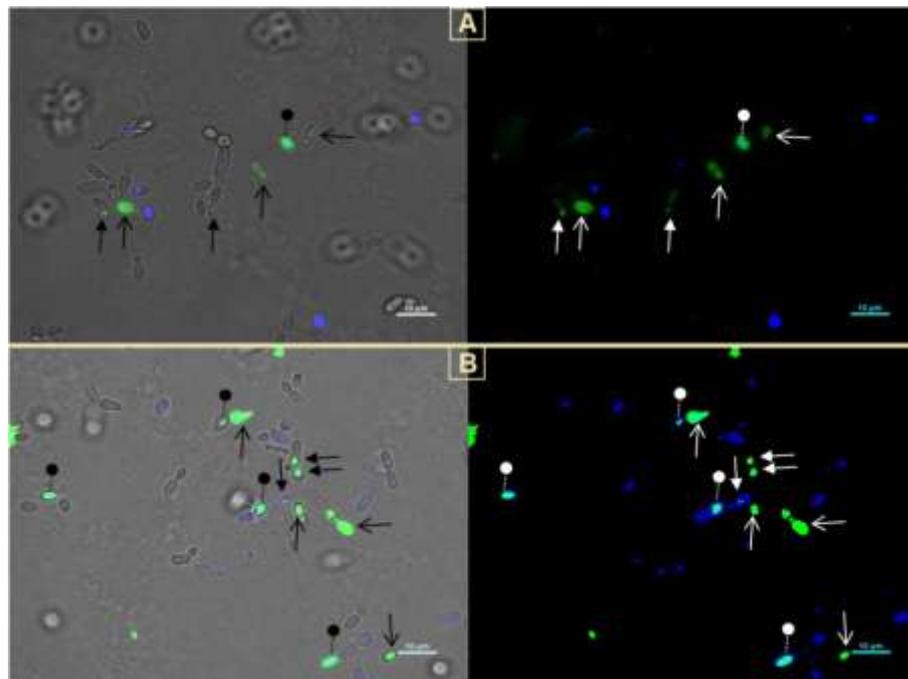
Em conjunto, os resultados obtidos na presença de zinco evidenciam a importância do metal para a atividade fungicida de um peptídeo rico em histidina e glicina (*FAM-Chef la*) tanto em baixa e alta força iônica.

#### **4.3. Análise do efeito de *FAM-Chef la* em células vivas ou fixadas de *C. parapsilosis***

- **Na ausência/presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$**

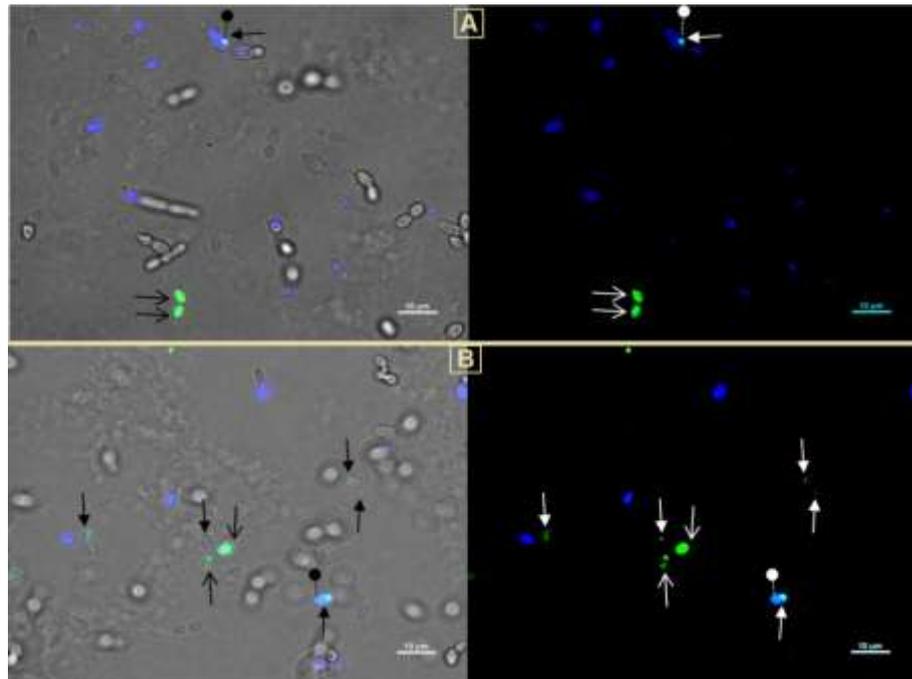
As análises das células previamente incubadas com o peptídeo (0,5 MIC 6,25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou 1 MIC 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e o marcador de vacúolo CMAC-*Blue* (25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

na ausência ou presença de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$  evidenciaram a internalização do peptídeo fluorescente tanto em células fixadas em formaldeído 3,7 % (**Figuras 20 e 21, Apêndices 1-4 e 7**) quanto em células vivas (**Figura 22, Apêndices 5-7**). Foram observados dois padrões de localização celular, sendo o primeiro a concentração no vacúolo (**Figuras 20-22, setas cheias →**) e o outro, distribuição por todo o conteúdo interno celular (citoplasma/ **Figuras 20-22, setas simples →**).

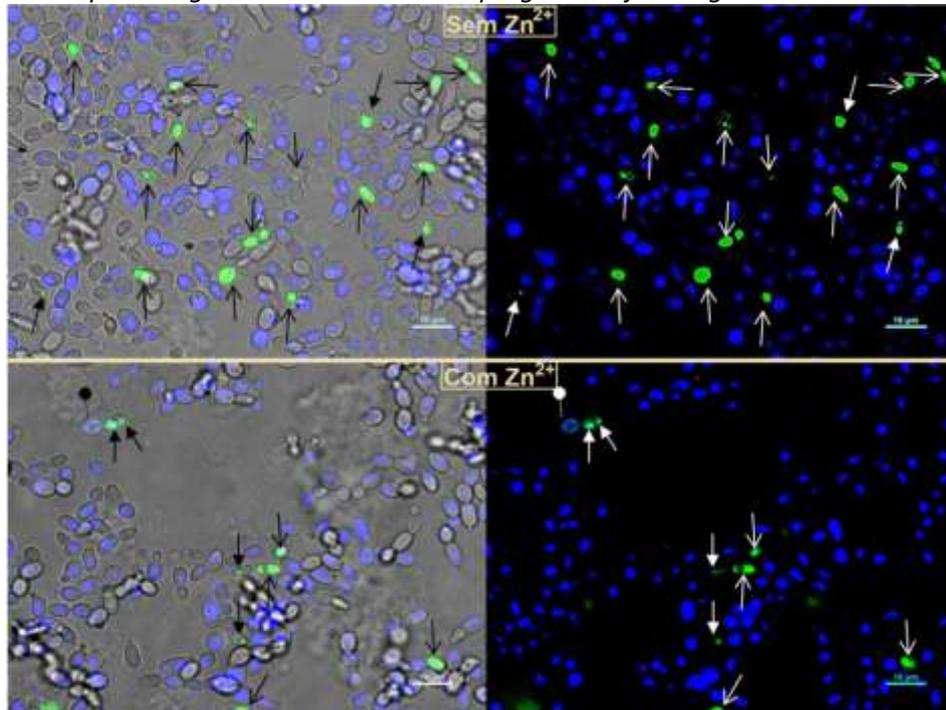


**Figura 20.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação do marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef Ia* [verde/ 0,5 MIC (**A**) e 1 MIC (**B**)] na ausência de íons  $\text{ZnCl}_2$ , evidenciando localizações no vacúolo (setas cheias →), citoplasma (setas simples →) e, em alguns casos, colocalização dos marcadores (setas ponta redonda ●). **À esquerda:** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à direita:** sobreposição dos canais azul e verde. *Barra inferior direita: 10 $\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J<sup>o</sup>.*

Colocalizações do peptídeo com o marcador de vacúolo celular foram observadas nas células fixadas e vivas na ausência ou presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  (**Figuras 20-22, setas ponta redonda ●**). Porém, nas células vivas e na ausência de íons  $\text{Zn}^{2+}$  foi observada somente uma unidade com colocalização (**Apêndices 5 e 7**), resultado diferente daqueles observados nas mesmas condições em células fixadas (**Apêndices 2 e 7**).



**Figura 21.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação do marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef 1a* [verde/ 0,5 MIC (A) e 1 MIC (B)] e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , evidenciando localizações no vacúolo (setas cheias  $\rightarrow$ ), citoplasma (setas simples  $\rightarrow$ ) e, em alguns casos, colocalização dos marcadores (setas ponta redonda  $\bullet$ ). **À esquerda:** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à direita:** sobreposição dos canais azul e verde. Barra inferior direita: 10 $\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J<sup>®</sup>.



**Figura 22.** Células vivas de *C. parapsilosis* após incubação do marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef 1a* (verde/ 1 MIC: 12  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **na ausência (em cima) ou presença (embaixo) de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$** , evidenciando localizações no vacúolo (setas cheias  $\rightarrow$ ) ou citoplasma (setas simples  $\rightarrow$ ). **À esquerda:** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à direita:** sobreposição dos canais azul e verde. Barra inferior direita: 10 $\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J<sup>®</sup>.

Em todas as análises o número total de células marcadas em azul (CMAC-Blue) foi maior do que o de células marcadas em verde (FAM-Chef Ia) (Tabela 23), variando de 2 a 3 vezes mais nas células fixadas (0,5 ou 1 MIC e ausência ou presença de  $ZnCl_2$ , respectivamente) e de 5 a 9 vezes mais nas células vivas (ausência e presença de  $ZnCl_2$ , respectivamente). As colocalizações nas células fixadas foram expressivas tanto na ausência (2 vezes/1 MIC) e presença de  $ZnCl_2$  (2 vezes/0,5 MIC), entretanto, nas células vivas, estas colocalizações foram mais expressivas na presença de  $ZnCl_2$ .

**Tabela 23.** Relação dos valores totais de células azuis (A), verdes (V), não coradas (S), total e azuis pertencentes a verde/colocalização azul e verde (AeV) para células fixadas (0,5 e 1 MIC) e vivas na ausência ou presença de  $ZnCl_2$ .

		A	V	S	AeV	Total
<b>Células fixadas</b>						
0,5 MIC	Sem $Zn^{2+}$	136	78	202	18	434
	Com $Zn^{2+}$	148	57	193	31	429
1 MIC	Sem $Zn^{2+}$	173	101	108	48	430
	Com $Zn^{2+}$	127	64	116	27	334
<b>Células vivas</b>						
1 MIC	Sem $Zn^{2+}$	760	155	549	1	1465
	Com $Zn^{2+}$	938	103	471	26	1538

Ao comparar o número de células totais fixadas e vivas analisadas na ausência de  $ZnCl_2$  (1 MIC), percebe-se que o primeiro caso representa um pouco mais de um terço do número total de células vivas analisadas. Já na presença de  $ZnCl_2$ , o valor total de células fixadas analisadas representa mais de um quarto do valor total de células vivas. Por isso, análises estatísticas foram realizadas, bem como cálculos do tamanho amostral adequado, a fim de assegurar resultados estatisticamente confiáveis e concretos.

Para se realizar a análise estatística é necessário definir o tipo de teste de hipótese mais adequado para cada amostra, tendo sido realizados testes de normalidade (teste D'Agostino, amostras k) para as amostras (Anexo 7) das

seguintes variáveis: azuis (A), verdes (V) e colocalizações (AeV). A **Tabela 24** traz o resultado dos testes de normalidade com os p-valores encontrados para todas as amostras.

**Tabela 24.** Relação dos p-valores para os testes de normalidade D'Agostino, valores significativos estão em negrito (nível de significância de 0,05).

Azul (A)		
		p-valor
<b>Células fixadas</b>		
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05
<b>Células vivas</b>		
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05
Verde (V)		
		p-valor
<b>Células fixadas</b>		
0,5 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	<b>&lt;0,05</b>
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	<b>&lt;0,05</b>
<b>Células vivas</b>		
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05
Colocalizações (AeV)		
		p-valor
<b>Células fixadas</b>		
0,5 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	>0,05
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	<b>&lt;0,01</b>
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05
<b>Células vivas</b>		
1 MIC	Sem Zn <sup>2+</sup>	<b>&lt;0,01</b>
	Com Zn <sup>2+</sup>	>0,05

De posse desses resultados, foram realizados cálculos do tamanho amostral adequado e teste de hipótese adequado. A maioria das amostras não apresentaram distribuição normal e para essas foram realizados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Qui-quadrado. Já as amostras da variável verde (V) na presença de Zn<sup>2+</sup> e nas concentrações de 0,5 e 1 MIC apresentaram distribuição normal e para essas, portanto, foi realizado o teste paramétrico do Teste t.

A **Tabela 25** traz os resultados dos testes de hipóteses realizados.

**Tabela 25.** Resultados dos cálculos de tamanho amostral, teste de hipóteses (p-valores) e poder dos testes para as variáveis: "colocalizações" e "ausência/presença de Zn<sup>2+</sup>" ou "concentrações do peptídeo de 0,5 e 1 MIC"; "células verdes/ sem colocalizações" e "ausência/presença de Zn<sup>2+</sup>" ou "concentrações do peptídeo de 0,5 e 1 MIC"; "células azuis" e "células fixadas e não fixadas".

Colocalizações (AeV)				
Tamanho amostral			Poder do teste	p-valor
Obtido Sem Zn <sup>2+</sup> /com Zn <sup>2+</sup>	Calculado			
• <b>Células fixadas</b>				
<b>0,5 MIC</b>	18/31	31/31	78% (18/18)*	0,4057
<b>1 MIC</b>	48/27	8/8	95%	<b>0,0191</b>
• <b>Células vivas</b>				
<b>1 MIC</b>	1/26	3/3	78% (1/1)*	<b>0,0002</b>
<b>Obtido 0,5 MIC e 1MIC</b>				
• <b>Células fixadas</b>				
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	18/48	2/2	95%	<b>0,0015</b>
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	31/27	∞/∞	Tamanho amostral não se aplica, teste é inviável	0,8206
Células verdes (V)				
<b>Obtido Sem Zn<sup>2+</sup>/com Zn<sup>2+</sup></b>				
• <b>Células fixadas</b>				
<b>0,5 MIC</b>	78/57	16/16	95%	0,0963
<b>1 MIC</b>	101/64	5/5	95%	<b>0,0140</b>
• <b>Células vivas</b>				
<b>1 MIC</b>	155/103	7/7	95%	<b>0,0343</b>
<b>Obtido 0,5 MIC/ 1MIC</b>				
• <b>Células fixadas</b>				
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	78/101	16/16	95%	0,0890
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	57/64	648/648	12% (57/57)*	0,6463
Células azuis (A)				
<b>Obtido Fixadas/Vivas</b>				
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	173/127	55/55	95%	<b>0,0002</b>
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	760/938	363/363	95%	<b>0,0002</b>

**Obs.:** \*Poder dos testes obtidos para os tamanhos amostrais indicados entre parênteses. Para cada teste foi levado em conta um dos conjuntos das hipóteses (hipótese nula: a presença de zinco/ concentração de peptídeo/ não afeta os resultados ( $\mu_1=\mu_2$ ); hipótese alternativa: a presença de zinco/ concentração de peptídeo/ afeta os resultados ( $\mu_1\neq\mu_2$ )).

No teste realizado entre as variáveis "colocalizações" (AeV) e "ausência ou presença de Zn<sup>2+</sup>", observou-se que a presença de íons Zn<sup>2+</sup> afetou as colocalizações observadas para as amostras de 1 MIC (fixadas e vivas), mas não para as de 0,5 MIC fixadas. Desta forma, pode-se dizer que a presença do peptídeo *FAM-Chef Ia* no vacúolo das células está diretamente relacionada a presença de

íons  $Zn^{2+}$ , sendo este resultado mais confiável para as amostras fixadas, onde o poder do teste é de 95%.

Na ausência de  $Zn^{2+}$  as colocalizações dependeram da concentração do peptídeo e foram influenciadas na MIC. Com relação à presença de  $Zn^{2+}$ , o teste de hipótese não elucidou a influência ou não da concentração do peptídeo na variável “colocalizações”, uma vez que o cálculo do tamanho amostral necessário ( $\infty/\infty$ ) tornou o teste inviável.

Outro teste de hipótese foi realizado a fim de averiguar a internalização do peptídeo nas células de *C. parapsilosis* para as variáveis “células verdes/ sem colocalização” e “ausência ou presença de  $Zn^{2+}$ ”. Os íons  $Zn^{2+}$  afetaram a internalização de *FAM-Chef Ia* na MIC (fixadas e vivas) e não afetaram para as de 0,5 MIC fixadas, sendo que o poder dos testes obtidos foi de 95% para todas as amostras testadas. Tais resultados são similares àqueles obtidos no teste de hipótese com a variável “colocalizações”, indicando que as localizações intracelulares do peptídeo *FAM-Chef Ia* observadas neste trabalho (vacúolo ou citoplasma) foram afetadas pela presença de íons  $Zn^{2+}$ .

Para a variável “células verdes/ sem colocalizações” a concentração de peptídeo não afetou os resultados obtidos na ausência ou presença de  $Zn^{2+}$ . Estes resultados demonstram que a localização citoplasmática de *FAM-Chef Ia* não dependeu da concentração de peptídeo nas células fixadas. Com a finalidade de verificar a influência da fixação com formaldeído (3,7%) na ação do marcador de vacúolo um último teste de hipótese foi realizado entre as variáveis “células azuis” e “células fixadas e não fixadas”. Os resultados indicaram que a fixação com formaldeído afetou a ação do marcador de vacúolo celular (*CMAC-Blue*) tanto na ausência quanto na presença de  $Zn^{2+}$ .

Entretanto, as análises usando o teste do Qui-quadrado revelaram que as diferenças observadas entre as categorias de células analisadas (**Tabela 26**) foram significativas somente para as amostras na MIC, tanto para células vivas (p-valor<0,0001) quanto para as fixadas (p-valor 0,0222).

**Tabela 26.** Tabelas de contingência (2x4) utilizadas nos testes do Qui-quadrado para células fixadas (0,5 e 1MIC) e vivas (1MIC) com os valores de células azuis (A), verdes (V), não coradas (S), azuis pertencentes a verde/colocalização azul e verde (AeV), total e os p-valores obtidos.

<b>Células fixadas (0,5 MIC)</b>					
	A	V	S	AeV	Total
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	136	78	202	18	<b>434</b>
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	148	57	193	31	<b>429</b>
<b>Total</b>	<b>284</b>	<b>135</b>	<b>395</b>	<b>49</b>	<b>863</b>
<b>p-valor</b>					<b>0,0602</b>
<b>Células fixadas (1 MIC)</b>					
	A	V	S	AeV	Total
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	173	101	108	48	<b>430</b>
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	127	64	116	27	<b>334</b>
<b>Total</b>	<b>300</b>	<b>165</b>	<b>224</b>	<b>75</b>	<b>764</b>
<b>p-valor</b>					<b>0,0222</b>
<b>Células vivas 1 MIC</b>					
	A	V	S	AeV	Total
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>	760	155	549	1	<b>1465</b>
<b>Com Zn<sup>2+</sup></b>	938	103	471	26	<b>1538</b>
<b>Total</b>	<b>1698</b>	<b>258</b>	<b>1020</b>	<b>27</b>	<b>3003</b>
<b>p-valor</b>					<b>&lt;0,0001</b>

Assim, as análises estatísticas feitas revelaram que:

- A concentração do peptídeo (1/2 ou 1 MIC) não interferiu na sua localização intracelular (p-valor 0,0602);
- As diferenças observadas entre as categorias de células analisadas (verdes, azuis e colocalizações) foram significativas para as análises feitas com o peptídeo fluorescente na MIC, tanto em células vivas (p-valor<0,0001) quanto fixadas (p-valor 0,0222);
- A fixação com formaldeído (3,7%) afetou a ação do marcador de vacúolo CMAC-Blue (p-valor 0,0002);

- Os íons  $Zn^{2+}$  nas células fixadas influenciaram negativamente as localizações do peptídeo citoplasmática e vacuolar (p-valores 0,0014 e 0,0191, respectivamente);
- Nas células vivas a presença dos íons  $Zn^{2+}$  influenciou negativamente a localização do peptídeo citoplasmática (p-valor 0,0343) e, positivamente a vacuolar (p-valor 0,0002);

Dentre os mecanismos de ação celulares descritos para os peptídeos que não perturbam a membrana plasmática (CPPs) temos a translocação direta (independente de energia) e a endocitose (dependente de energia). Hällbrink e colaboradores (2001) investigaram a internalização e cinética de alguns deles (penetratina, TAT<sub>48-60</sub> e MAP) e atribuíram uma relação positiva direta entre o potencial de distúrbio de membrana e o momento hidrofóbico peptídico (HÄLLBRINK et al., 2001). Zaro e Shen (2003) verificaram a entrada do peptídeo TAT<sub>47-57</sub> em células eucarióticas e atribuíram o mecanismo de translocação como dependente a um sítio de ligação/ligante na endocitose e ao número de cargas positivas do peptídeo (ZARO; SHEN, 2003).

A translocação direta e endocitose são mecanismos de ação descritos para o peptídeo Hst 5. Jang e colaboradores (2010) o estudaram e descreveram que somente a translocação direta, e não a endocitose, foi capaz de matar células de *C. albicans*. Esses autores observaram que a entrada do peptídeo nas células era concentração-dependente e que somente acima de certo limiar ocorreu a entrada de iodeto de propídeo (IP), tendo concluído que a translocação em si não era responsável pela perturbação na membrana e sim, a alta densidade de peptídeo, que causava os dobramento e posterior rompimento da bicamada lipídica (JANG et al., 2010). Resultados semelhantes já tinham sido encontrados por Remuzgo (2009) com o peptídeo *Chef Ia* quando observou que o peptídeo penetrava as células de *C.*

*albicans* MDM8 e somente acarretava a entrada de IP em concentrações maiores ou iguais a 2,5 x MIC de *Chef Ia*.

De uma maneira geral, os resultados do presente trabalho sugeriram dois mecanismos de ação para o peptídeo *FAM-Chef Ia*: a translocação direta e a endocitose. Através das análises estatísticas, poderíamos inferir que o mecanismo seria a translocação direta, porém, ambos os mecanismos parecem acontecer nas células analisadas e, portanto, o resultado do efeito dos íons  $Zn^{2+}$  aqui observado não exclui a endocitose. De fato, um trabalho anterior a este evidenciou que a internalização do peptídeo *FAM-Chef Ia* em células de *C. albicans* MDM8 ocorria através de mecanismo dependente de energia e temperatura (REMUZGO, 2009).

Juliano e colaboradores (2017) investigaram a localização intracelular do peptídeo ClavA (**Tabela 6**) em presença de íons  $Zn^{2+}$  (proporção 1:2 de peptídeo e metal) e observaram uma localização intracelular diferente daquela descrita para o peptídeo sozinho (LEE; CHO; LEHRER, 1997), pois 80% das células bacterianas analisadas apresentavam o composto Zn-ClavA ligado à membrana celular e concentrados em um único “loci” por célula. Eles também observaram que o peptídeo ClavA na presença de  $Zn^{2+}$  apresentou atividade nucleásica e, possivelmente, o DNA como alvo intracelular, tendo concluído que Zn-ClavA atuou em células de *E. coli* através do mecanismo carpete/”detergente-like” (**Figura 5**).

Com base nas informações já listadas na introdução desta dissertação (**item 1.2.**), diversos peptídeos tiveram os seus mecanismos de ação estudados, dentre eles os ricos em histidina e/ou glicina como o peptídeo tenecina 3 (**Tabela 6**), que apresenta mecanismo de ação dependente de energia e temperatura (endocitose) ocasionando a morte celular em *C. albicans*, enquanto que o do peptídeo MUC 7 20-mer (**Tabela 6**) foi descrito por atuar de forma independente de energia e sem

perturbação de membrana (translocação direta) (KIM et al., 2001; BOBEK; SITU, 2003).

Por outro lado, a Hst (**Tabela 6**) e seu análogo N-terminal (região rica em glicina) foram descritos com a capacidade de se ligar à quitina, indicando um possível ligante deste peptídeo nas células estudadas (*C. albicans*, *E. coli* e *S. cerevisiae*) e mecanismos de internalização por translocação direta ou endocitose (SPERSTAD et al., 2009). Já o peptídeo AFP (**Tabela 6**) foi descrito como capaz de se ligar às células de *C. albicans*, causar efluxo do conteúdo intracelular e, por consequência, inviabilizá-las (IIJIMA; KURATA; NATORI, 1993). O peptídeo YD1 (**Tabela 6**) foi relatado por inviabilizar as células de *E. coli* através da translocação direta e associação ao DNA (RAHMAN et al., 2017).

Cabe ainda comentar que os peptídeos que possuem a capacidade de penetrar a célula através da endocitose também apresentam capacidade endossomolítica, como por exemplo, os CPPs ricos em histidina H5WYG e LAH4, que apresentam alto grau de transfecção de DNA e demais *cargos* intracelulares e são caracterizados pela sua capacidade de romper a membrana do endossomo. Uma vez dentro do endossomo (pH 4-7) os resíduos de histidina são protonados e possibilitam o rompimento da membrana endossomal e liberação intracelular dos *cargos* (MANN et al., 2008).

#### **4.4. Análises por espectroscopia de dicroísmo circular**

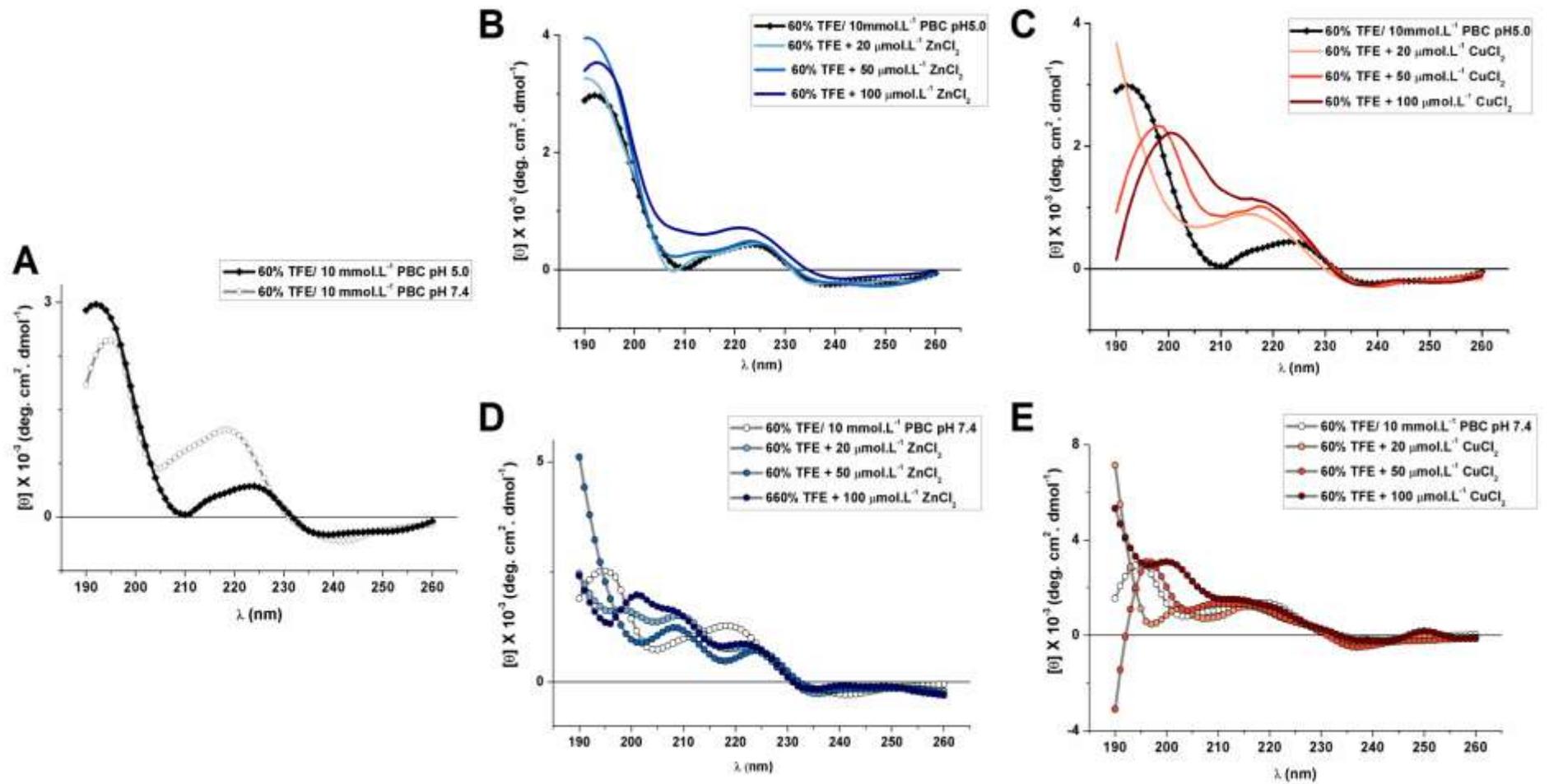
Os espectros de dicroísmo circular (DC) da *Chef Ia* foram obtidos na ausência e presença dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (0 - 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em pH 5,0 e pH 7,4 (**Figura 23A**). A **Tabela 27** lista todas as bandas observadas. As bandas positivas de 192 e 223 são indicativas da presença de estruturas em folha- $\beta$  pregueada e dobras  $\beta$  (CHANG; WU; YANG, 1978; POWERS; ROZEK; HANCOCK, 2004; DONG et al., 2012).

**Tabela 27.** Relação das bandas máximas e mínimas (nm) obtidas nos espectros de DC da *Chef Ia* em pH 5,0 na ausência e presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  e na ausência destes em pH 7,4.

		Bandas	
		Positivas (nm)	Negativas (nm)
<b><i>Chef Ia</i> pH 5,0</b>			
0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\text{Zn}^{2+}$ ou $\text{Cu}^{2+}$	192; 223	210; 235
20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	<b><math>\text{ZnCl}_2</math></b>	191; 235	208; 235
50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$		191; 223	208; 237; 248
100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$		192; 221	207; 214; 241
20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	<b><math>\text{CuCl}_2</math></b>	190; 215	205; 237
50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$		198; 218	190; 210; 239
100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$		200; 216	190; 214; 237
<b><i>Chef Ia</i> pH 7,4</b>			
0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\text{Zn}^{2+}$ ou $\text{Cu}^{2+}$	195; 219	190; 205; 242

Ambos os íons influenciaram diferentemente os espectros de *Chef Ia* em pH 5,0, sendo que a partir de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  dos íons foram observadas alterações e deslocamentos das bandas indicativas de estruturas  $\beta$ , visto que na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  ocorreu estabilização de estruturas em folha- $\beta$  pregueada (**Figura 23B**) e na presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , estabilização de estruturas em dobra- $\beta$  (**Figura 23C**) (CHANG; WU; YANG, 1978). Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para o peptídeo *Chef I*. Park e colaboradores (2000) investigaram a estrutura secundária do peptídeo *Chef I* por dicroísmo circular (DC), sendo que na presença de 50% TFE em pH 7,4 os autores obtiveram a porcentagem de 33,3% para folhas  $\beta$  e 77,7% para estruturas aleatórias (PARK et al., 2000). Em trabalho posterior do nosso grupo de pesquisa, espectros do análogo amidado (*Chef Ia*) evidenciaram resultados semelhantes, pois na presença de 60% TFE (pH 5,0) os autores também observaram estruturação em folhas  $\beta$  pregueadas e dobras  $\beta$  (REMUZGO et al., 2014).

Contudo, os resultados em pH 7,4 na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  (**Figura 23D**) e  $\text{Cu}^{2+}$  (**Figura 23E**) não foram conclusivos quanto à estrutura secundária do peptídeo nas condições de análise, bem como os valores de  $\lambda_{\text{máx. e mín}}$  dos espectros obtidos.



**Figura 23.** Espectros de DC da *Chef Ia* pH 5,0 e pH 7,4 (**A**) e na presença de ZnCl<sub>2</sub> ou CuCl<sub>2</sub> em pH 5,0 (**B** e **C**, respectivamente) ou em pH 7,4 (**D** e **E**, respectivamente).

Desta forma, a fim de tentar interpretar as diferenças observadas em pH 7,4 utilizamos a base de dados “BeStSel” e os resultados destas análises estão na **Tabela 28**, que lista as porcentagens de estruturas secundárias previstas para cada espectro da *Chef Ia* nos dois pHs estudados (pH 5,0 e 7,4), sendo altas as de “dobras”, “folha  $\beta$  antiparalela” e “outras estruturas” nos dois pHs tanto na ausência quanto presença dos íons metálicos divalentes.

**Tabela 28.** Porcentagens das estruturas secundarias através da análise dos espectros DC de *Chef Ia* em pH 5,0 e 7,4.

%	Chef Ia													
	pH	ZnCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			CuCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			pH	ZnCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			CuCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )		
		5,0	20	50	100	20	50		100	7,4	20	50	100	20
<b>Dobras</b>	13,6	16,2	13,9	15,7	19,9	11	11,8	19,1	16	18,5	16,1	23,7	11	17,8
<b>Folha <math>\beta</math> Antiparalela</b>	46	56,7	48	42,7	55,8	40,2	53,9	56,3	54,2	60,2	72,7	76,3	32,7	68,6
<b>Folha <math>\beta</math> Paralela</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Hélice</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Outros</b>	40,4	27,1	38,1	41,6	24,3	48,8	34,3	24,6	29,7	21,2	11,2	0	56,3	13,5

A porcentagem de “outras estruturas” parece estar diretamente relacionada à atividade anticandida de *Chef Ia* sozinha em pH 5,0 (40,4%). Na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Zn}^{2+}$  neste pH, notamos porcentagens similares de “folha  $\beta$  antiparalela” e “outras estruturas” àquelas observadas no espectro de *Chef Ia* sozinha (42,7 e 46%, para “folha  $\beta$  antiparalela” e 41,6 e 40,4% para “outras estruturas”, respectivamente). Já na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  notamos uma menor porcentagem de “dobras” e “outras estruturas” (pH 5,0) e, portanto, maiores proporções de “folha  $\beta$  antiparalela” que àquelas observadas na ausência destes íons. Portanto, a análise por “BeStSel” se mostrou condizente com as análises dos espectros em pH 5,0 descritos anteriormente para os íons  $\text{Zn}^{2+}$ , mas não para os íons  $\text{Cu}^{2+}$ , pois os espectros mostraram uma menor proporção de “dobras” e maiores proporções de “folha  $\beta$  antiparalela”.

Nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Zn}^{2+}$  a atividade anticandida de *Chef la* não foi afetada (MIC 0,78  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ /**Tabela 18**) indicando que uma maior porcentagem de “folha  $\beta$  antiparalela” não estaria relacionada ao aumento de atividade, pois os valores de MIC observados foram os mesmos (MIC 0,78  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ /**Tabela 18**) e as porcentagens desta estrutura não (56,7% e 48%, respectivamente). A influência positiva destes íons em pH 5,0, parece estar relacionada ao aumento das porcentagens de “outras estruturas” na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Zn}^{2+}$  com 41,6% e valor de MIC de 0,39  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (**Tabela 18**).

Em concentrações inferiores a 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  apenas a atividade candida de *Chef la* foi afetada (diminuição de 2 vezes a MFC em 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ /**Tabela 18**); somente a partir de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , os íons  $\text{Cu}^{2+}$  afetaram positivamente a atividade anticandida de *Chef la*, diminuindo de 2 a 4 vezes a MIC (**Tabela 18**). Ao analisarmos as estruturas secundárias observadas a partir 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cu}^{2+}$  notamos que uma menor porcentagem de “dobras” e maiores porcentagens de “outras estruturas” coincidiram com a diminuição dos valores de MIC e MFC.

Juliano e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes com o peptídeo ClavA (**Tabela 6**) na ausência e na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$ , tendo observado estrutura secundária definida por DC na presença 50% TFE em pH 5,5, bem como mudanças espectrais após adição de  $\text{Zn}^{2+}$  devido ao aumento na porcentagem de  $\alpha$ -hélice; os resultados indicaram formação de composto de coordenação com estrutura “amarrada” pelos íons  $\text{Zn}^{2+}$  (JULIANO et al., 2017). Este tipo de estruturação com estabilização de folhas  $\beta$  na presença de íons metálicos divalentes também foi observada com os peptídeos de estrutura  $\beta$ -hairpin

KHYTVSINGKKITVHI<sup>16</sup> e HKHYTVSINGKKITVHI<sup>17</sup> na presença de 10 equiv. de ZnCl<sub>2</sub> (PLATT; SEARLE; CHUNG, 2001).

A análise do espectro de *Chef Ia* em pH 7,4 forneceu uma maior porcentagem de “dobras” e “folhas  $\beta$  antiparalelas” em relação a do espectro em pH 5,0 (**Tabela 28**). Nas maiores concentrações de Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> foram detectadas elevadas porcentagens de “folha  $\beta$  antiparalela” (72,7% e 68,8%, respectivamente) e porcentagens similares de “dobras” (16,1 e 17,8%, respectivamente) e “outras estruturas” (11,2 e 13,5%, respectivamente). Desta forma, em pH 7,4 a menor porcentagem de “outras estruturas” parece estar relacionada à ausência de atividade candidada do peptídeo *Chef Ia* em pH 7,4, mesmo em presença de Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.

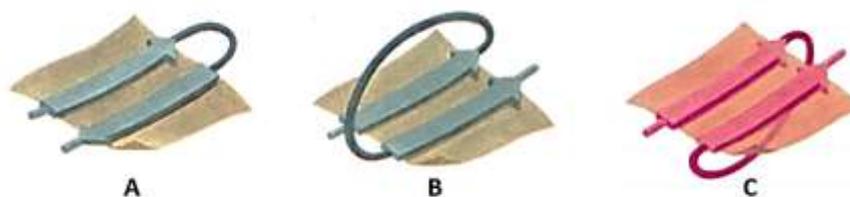
Uma alta porcentagem de “folha  $\beta$  antiparalela” parece ser fundamental para atividade anticandida de *Chef Ia* na presença de íons Zn<sup>2+</sup> em pH 7,4, entretanto, o mesmo não se aplica à presença de íons Cu<sup>2+</sup>, uma vez que a maior porcentagem de “folha  $\beta$  antiparalela” observada (76,3%) coincidiu com a inatividade do peptídeo em pH 7,4 a 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de íons Cu<sup>2+</sup> (MIC >100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ /**Tabela 19**). Somente em porcentagens similares de “dobras” e “outras estruturas” o peptídeo *Chef Ia* foi ativo (MIC 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ /**Tabela 19**) nesse pH, indicando a necessidade de flexibilidade estrutural para sua atividade em presença de íons Cu<sup>2+</sup>.

As análises por “BeStSel” dos espectros na ausência e presença de íons Cu<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup> evidenciaram porcentagens diferentes para os três tipos de folhas  $\beta$ . A **Tabela 29** traz estes resultados: na ausência dos íons metálicos observa-se maiores porcentagens de folha  $\beta$  antiparalela relaxada (**Figura 24**) em pHs 5,0 e 7,4, mas na presença de Cu<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup> essas porcentagens aumentaram, sendo que em pH 5,0 a maior porcentagem observada foi na maior concentração de íons Cu<sup>2+</sup> (100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com 35,6%) e o mesmo ocorreu em pH 7,4 com os íons Zn<sup>2+</sup> (100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com

42,7%). Com base nesses resultados pode ser sugerido que a atividade de *Chef Ia* é exibida com maiores porcentagens de folha  $\beta$  antiparalela relaxada.

**Tabela 29.** Porcentagens de estruturação nos diferentes tipos de folha  $\beta$  através da análise dos espectros DC de *Chef Ia* em pH 5,0 e pH 7,4 na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ .

Folha $\beta$ (%)							
Chef Ia pH 5,0							
	0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ $\text{Zn}^{2+}$ ou $\text{Cu}^{2+}$	$\text{ZnCl}_2$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			$\text{CuCl}_2$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )		
		20	50	100	20	50	100
Antiparalela relaxada	24,2	33,8	32,2	29	32,7	28,8	35,6
Paralela direita	17,6	17,8	10,9	9,3	19,6	6,1	12,2
Paralela esquerda	4,2	5,1	4,9	4,4	3,5	5,2	6,2
Chef Ia pH 7,4							
Antiparalela relaxada	33,7	40,8	39,4	42,7	38,7	19,7	40,9
Paralela direita	19	7,9	16,8	23,8	37,6	6,9	21,3
Paralela esquerda	3,6	5,6	4	6,2	0	6,1	6,4



**Figura 24.** Tipos de folha  $\beta$  pregueada (A) antiparalela relaxada ou “hairpin” (B) paralela direita (C) paralela esquerda. Adaptado de MARTEL, P. Universidade de Algarve, Portugal. Disponível em < [http://w3.ualg.pt/~pmartel/cadeiras/be/aulas\\_9.pdf](http://w3.ualg.pt/~pmartel/cadeiras/be/aulas_9.pdf)>. Acesso em: 26/06/18.

Em resumo, os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  parecem afetar diferentemente a *Chef Ia* nos pHs estudados, provavelmente por “amarrarem” diferentemente o peptídeo formando quelatos distintos.

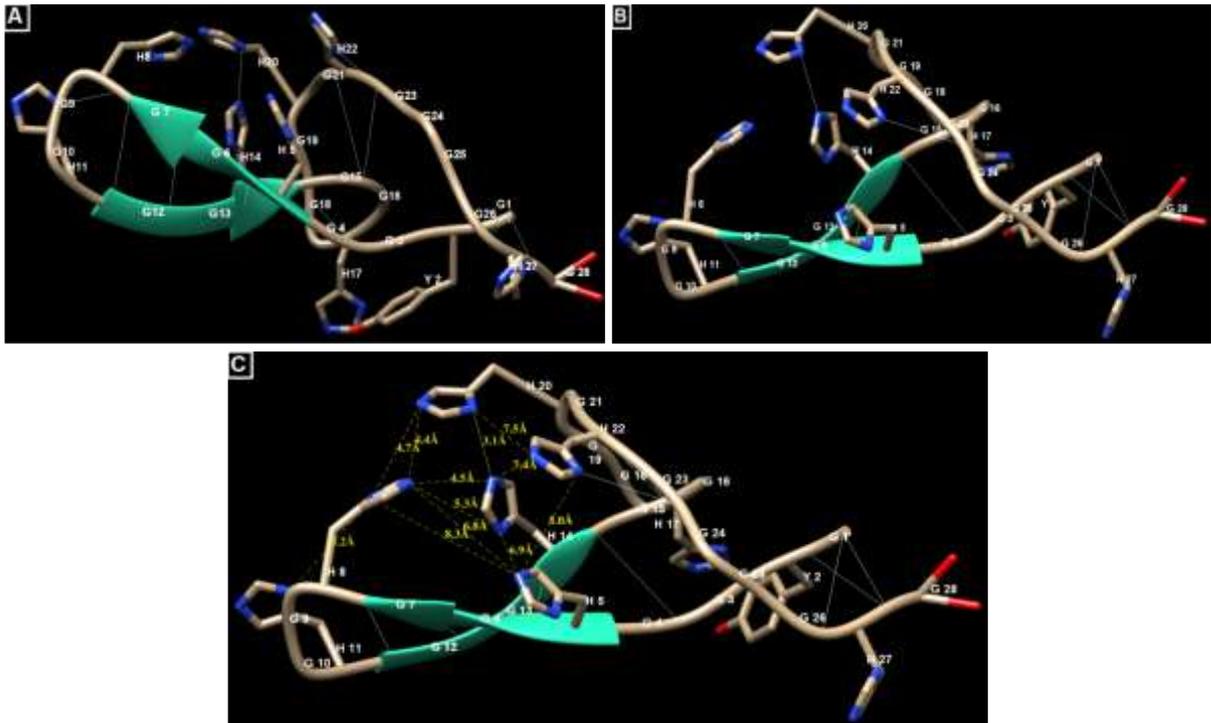
Estudo realizado em 2009 evidenciou uma mudança conformacional do peptídeo H5WYG (Tabela 6) na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$ ; os autores observaram a substituição de estruturas  $\beta$  em pH alcalino por estruturas randômicas em pH levemente ácido (pH 6,0) (BURÉ et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por Porciatti e colaboradores (2010) ao estudar o análogo truncado da Hst 5 por DC e RMN, pois o espectro de DC do peptídeo na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  em 50% e 90% de TFE e pH 7 foi significativamente diferente daquele do peptídeo

livre, sendo possível inferir que a ligação de íons  $Zn^{2+}$  foi acompanhada por transições estruturais. Neste trabalho os autores também associaram a presença destes íons à perda das bandas características de  $\alpha$ -hélice, indicando outra estruturação/formação de quelato na presença dos íons  $Zn^{2+}$  (PORCIATTI et al., 2010).

Devido à grande flexibilidade estrutural dos peptídeos ricos em glicina, a determinação de suas estruturas secundárias é parcial e pouco expressiva quando comparada às demais classes de AMPs (REMUZGO et al., 2014; VERDON et al., 2016). De fato, tentativas anteriores ao presente estudo de examinar o comportamento estrutural da *Chef Ia* experimentalmente por  $H^1$ -RMN na ausência e na presença de TFE não foram bem sucedidas, o que corroborava o fato dos espectros de DC das histatinas 3 e 5 registrados na presença dos íons  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em pH 7,4 não terem sido conclusivos quanto às estruturas secundárias (BREWER; LAJOIE, 2000). Posteriormente, resultados semelhantes também foram encontrados no estudo do peptídeo Armadilidina H (**Tabela 6**), em que os autores não conseguiram identificar estruturas secundárias por DC e RMN, mesmo em ambientes miméticos ao da membrana celular (VERDON et al., 2016).

#### **4.5. Modelo espacial teórico do peptídeo *Chef I* e a interação com $Zn^{2+}$ e $Cu^{2+}$**

Na impossibilidade de obter uma estrutura através de dados experimentais, foi investigada a possibilidade de conseguir um modelo teórico. A **Figura 25** mostra a disposição espacial dos resíduos de aminoácidos, bem como a presença de uma folha  $\beta$  pregueada antiparalela unida por uma dobra  $\beta$ , relaxada ou “hairpin” na estrutura obtida. As distâncias entre os nitrogênios dos anéis imidazólicos das histidinas nesta região indicam provável sítio de coordenação dos metais divalentes. Certamente, histidinas são reconhecidas como bons ligantes de  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,



**Figura 25.** A e B: Estrutura do modelo espacial teórico do peptídeo *Chef I*, seus resíduos de aminoácidos e ligações de hidrogênio em branco, bem como as folha  $\beta$  pregueadas antiparalelas previstas, em verde, nos resíduos H5 a G7; G12 a H14, e a dobra  $\beta$  envolvendo os resíduos H8 a H11 prevista. C: as distâncias entre os nitrogênios dos anéis imidazólicos das histidinas.

$\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  e diversos metalopeptídeos são descritos na literatura (ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018; ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018), sendo os motivos N-terminais XH e XXH sítios de ligação de alta afinidade para íons  $\text{Cu}^{2+}$  (GONZALEZ et al., 2018) e o HEXXH, sítio de ligação específico de íons  $\text{Zn}^{2+}$  (MELINO et al., 1999).

O motivo XXH é conhecido como ATCUN (“*Amino-terminal copper and nickel binding unit*”), sendo “X” qualquer outro resíduo de aminoácido. É encontrado em diversas proteínas, dentre elas a albumina (Figura 19 – item 4.2.2.b) e, por se tratar de um motivo N-terminal, não ocorre em regiões de  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$  (SANKARARAMAKRISHNAN; VERMA; KUMAR, 2004). Muitos grupos de pesquisa vêm estudando e os motivos ATCUN porque eles estão associados à produção de EROs (principalmente radicais  $\text{HO}\cdot$ ) que causam danos ao DNA (HARFORD;

SARKAR, 1997; ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018) e alguns deles, como é o caso do motivo GGH, exibem atividade antitumoral (KIMOTO et al., 1983).

Libardo e colaboradores (2014) adicionaram às sequências dos peptídeos *anoplin* (GLLKRIKTLL<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>), pró-apoptótico (PAP; KLAKLAKKLAKLAK<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>) e *sh-buforin* (RAGLQFPVGRVHRLLRK<sup>17</sup>-NH<sub>2</sub>) os motivos ATCUN (“DAH” ou “GGH” ou “VIH”), tendo demonstrado que a atividade bactericida (*B. subtilis* e *E. coli*) destes AMPs modificados foi aumentada em presença de íons Cu<sup>2+</sup> na proporção 1:1 (LIBARDO et al., 2014). Em estudos recentes, o motivo ATCUN GGH foi descrito como quelante de íons K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, sendo que na presença de íons Cu<sup>2+</sup> o GGH foi capaz de induzir o estresse oxidativo e a quebra de DNA (JOYNER; REICHFIELD; COWAN, 2011; HU et al., 2016). Quando conjugado à sequência do peptídeo “*octreotide*”, que possui como alvo células tumorais, a presença de íons Cu<sup>2+</sup> levou ao aumento de estabilidade em plasma sanguíneo e de atividade antitumoral (MIYAMOTO et al., 2016).

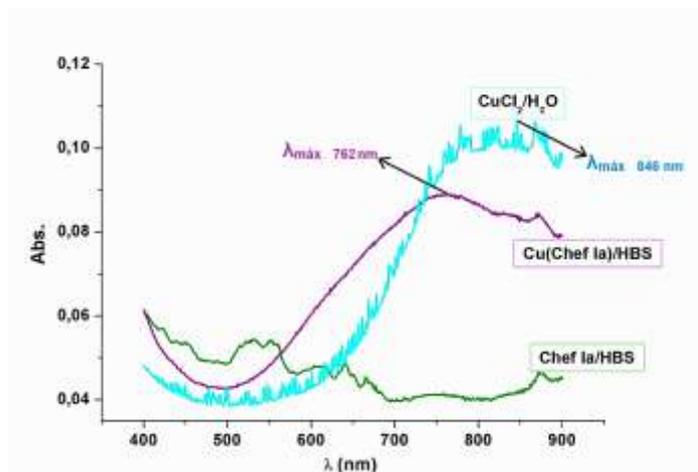
Dentre os metalopeptídeos conhecidos, ClavA, Hst 5, P113 e dermcidina também coordenam metais divalentes através de seus resíduos de histidina. A ClavA (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF<sup>23</sup>) coordena íons Zn<sup>2+</sup> através de seus resíduos His17 e His21 (aumentando a porcentagem de  $\alpha$ -hélice) e o quelato resultante foi capaz de despolarizar a membrana de *B. subtilis* mais rapidamente em menores concentrações do que o peptídeo (JULIANO et al., 2017). A Hst 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSH RGY<sup>24</sup>-NH<sub>2</sub>) na presença de íons Cu<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup> induz a produção de EROs e danos à membrana mitocondrial/fosfolípidios, devido ao motivo ATCUN “DSH” em sua sequência peptídica que possibilita a coordenação de tais íons em geometria quadrada planar distorcida (HARFORD; SARKAR, 1997; MELINO et al., 2014; GONZALEZ et al., 2018). De fato, elevada atividade pró-

oxidante da Hst 5 foi observada quando em presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  (CABRAS et al., 2007). Da mesma forma, a ligação de íons  $\text{Zn}^{2+}$  à Hst 5 potencializou sua atividade e despolarização de membrana em *E. faecalis* e *C. albicans*, através da coordenação deste metal ao sítio de ligação HEXXH (His15, Glu16, Lys17, His18 e His19, respectivamente) (MELINO et al., 1999).

O análogo P113 (Hst 5<sub>4-15</sub>: AKRHHGYKRKFH<sup>12</sup>-NH<sub>2</sub>) coordena com íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  via resíduos Ala1, His4, His5 e His12, sendo os dois quelatos formados completamente diferentes, indicando diferentes geometrias de coordenação para cada metal (HARDING, 2002; PORCIATTI et al., 2010). Finalmente, dermcidina (SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAVHDVKDVLDSVL<sup>48</sup>) coordena-se a íons  $\text{Zn}^{2+}$  através dos seus resíduos Glu5, Asp9, His38 e Asp42 (BECUCCI et al., 2014). Sendo assim, o modelo teórico aqui obtido parece ser adequado, bem como as suposições de sítios de coordenação de metais.

#### **4.6. Estudo da interação dos peptídeos FAM-Chef Ia e Chef Ia com íons $\text{Cu}^{2+}$ por espectroscopia eletrônica no ultravioleta/visível e por fluorimetria**

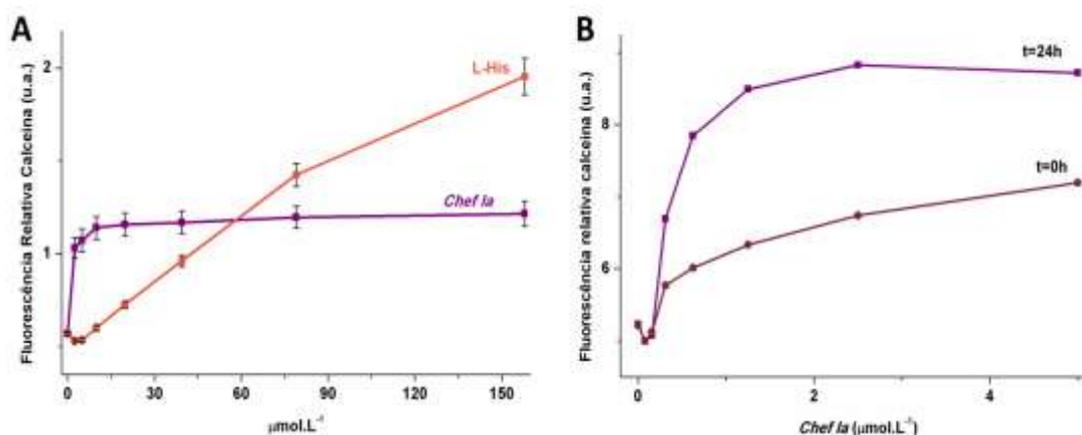
O espectro eletrônico UV/visível de  $\text{Cu}(\text{Chef Ia})$  mostrou um deslocamento hipsocrômico em relação ao espectro de  $\text{CuCl}_2$ , uma vez que estas soluções apresentaram  $\lambda_{\text{máx}}$  em 762 nm e em 846 nm, respectivamente (**Figura 26**). Como este tipo de deslocamento ocorre através “da mudança de absorção para um comprimento de onda mais curto devido à substituição ou efeito solvente” (IUPAC, 1997), esses resultados possibilitaram inferir a ocorrência de coordenação do ligante (*Chef Ia*) com o íon metálico ( $\text{Cu}^{2+}$ ).



**Figura 26.** Espectro da absorção (400-900 nm) das soluções de *Chef Ia*,  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{Cu}(\text{Chef Ia})$  todas na concentração de  $3,15 \text{ mmol.L}^{-1}$  em tampão HBS, pH 7,4, e seus respectivos  $\lambda_{\text{máx}}$ .

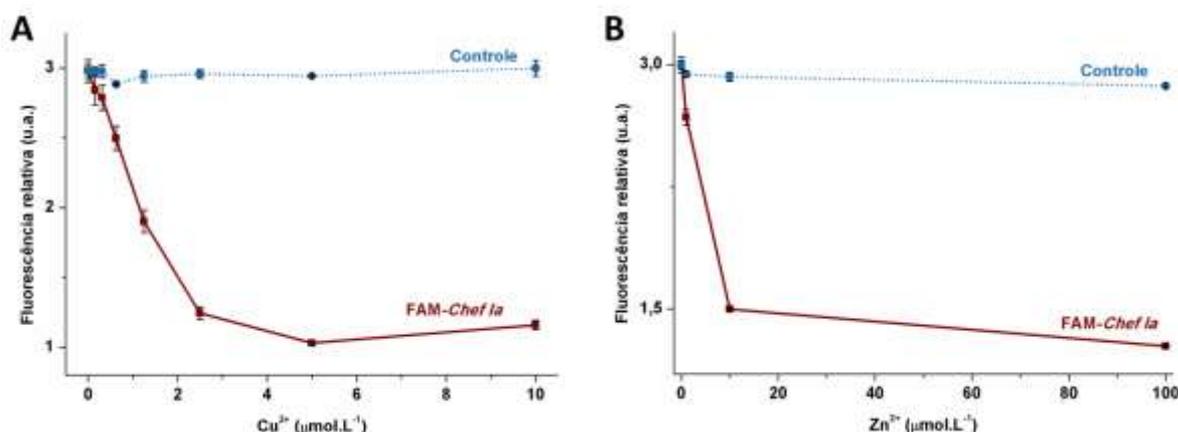
Os experimentos realizados usando o complexo Cobre-calceína (CuCA) mostraram menor estabilidade do mesmo na presença de *Chef Ia* do que na presença de L-His, sendo que 50% de recuperação de fluorescência de calceína ocorreu em  $2,5$  e  $39,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente (**Figura 27A**). A maior concentração de L-His testada ( $158 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) não foi capaz de recuperar totalmente a fluorescência da calceína. Tal diferença pode ser atribuída ao fato de as histidinas livres e presentes na cadeia peptídica experimentarem condições/ambientes diferentes enquanto na solução empregada.

Em ensaio posterior em que a concentração do peptídeo *Chef Ia* variou de 0 a  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi observado que em 0h certa fluorescência da calceína era recuperada num primeiro contato com o AMP, mas que em 24 h em  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  do mesmo, tal recuperação era muito mais significativa (**Figura 27B**), indicando que a *Chef Ia* pudesse ser um bom quelante de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com capacidade de sequestrar todo o metal da calceína, sonda comercial amplamente utilizada (FURRY, 1985). De fato, a partir deste resultado concluímos que a *Chef Ia* é um quelante de cobre (II) na proporção de 1:1.



**Figura 27.** Espectros da fluorescência da calceína na presença de (A) *Chef Ia* e His-L (0-158  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e (B) *Chef Ia* (0-5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) nos tempos 0h e 24 h.

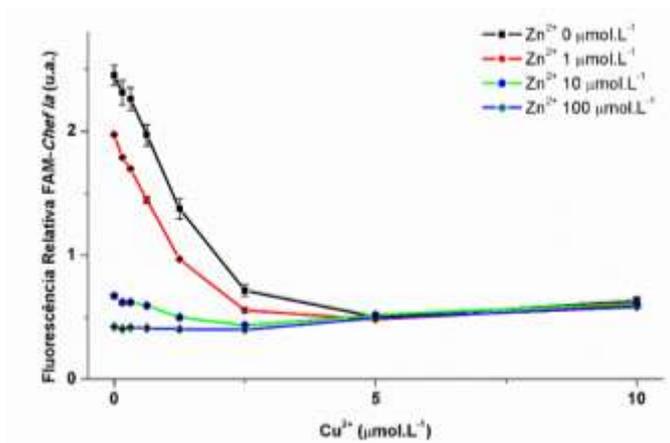
Nos experimentos adicionais feitos com o análogo fluorescente *FAM-Chef Ia* observamos o oposto: supressão da molécula fluorescente ligada covalentemente ao N-terminal do peptídeo na presença do íon divalente metálico. A fluorescência de *FAM-Chef Ia* foi totalmente suprimida na presença de 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , indicando uma razão molar de 1:2 (**Figura 28A**).



**Figura 28.** (A) Supressão da fluorescência relativa do peptídeo *FAM-Chef Ia* e da molécula FAM [5(6)-carboxifluoresceína] em presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  (0-10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e (B)  $\text{Zn}^{2+}$  (0-100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Entretanto, na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foi observada a supressão da fluorescência da *FAM-Chef Ia* por íons  $\text{Cu}^{2+}$  (a partir de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ ), evidenciando a competição entre os diferentes íons pelo ligante/peptídeo (**Figura 29**) e, portanto, uma interação entre os íons  $\text{Zn}^{2+}$  e *FAM-Chef Ia* suficientemente estável para impedir a quelação do peptídeo com íons  $\text{Cu}^{2+}$ . De fato, isso foi

confirmado através dos resultados obtidos na incubação do peptídeo com íons  $Zn^{2+}$  (**Figura 28B**) que revelou uma proporção de 1:10 entre FAM-*Chef Ia* e íons  $Zn^{2+}$ .



**Figura 29.** Supressão da fluorescência relativa do peptídeo FAM-*Chef Ia* em presença de íons  $Cu^{2+}$  (0-10  $\mu mol.L^{-1}$ ) e  $Zn^{2+}$  (0-100  $\mu mol.L^{-1}$ ).

Esses resultados são importantes porque, nos últimos anos, o estudo de metalopeptídeos tem despertado grande interesse na comunidade científica. De fato, vários são os exemplos de AMPs que quelam íons metálicos, sendo aceitas duas utilidades para a interação do metal com os mesmos. A primeira é a aquisição de carga e/ou estrutura que desencadeie a atividade antimicrobiana do peptídeo; a segunda utilidade tem a ver com o modo de ação do metalo-AMP, que ao quelar o metal torna-o menos ou totalmente indisponível para o microrganismo causando morte celular (ALEXANDER; THOMPSON; COWAN, 2018; GONZALEZ et al., 2018; ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018).

Além disso, os resultados acima descritos condizem com os da literatura, principalmente, aqueles referentes aos metalopeptídeos ricos em histidina. Por exemplo, Brewer & Lajoie (2000) evidenciou a ligação dos íons de  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  às histatinas 3 e 5 através de análises por ESI-MS, tendo demonstrado que a histatina 3 foi capaz de coordenar de 2-5 íons  $Cu^{2+}$  e de 1-2 íons  $Zn^{2+}$ , bem como que a Hst 5 coordenou com 1-4 íons  $Cu^{2+}$  e 1-2 íons  $Zn^{2+}$  (BREWER; LAJOIE, 2000). Em 2005,

foi descrito que a glicoproteína humana rica em histidina (HRG) coordena a íons  $Zn^{2+}$  nas proporções de 1:1 e 1:10, dependendo da necessidade metabólica e concentrações disponíveis (JONES; HULETT; PARISH, 2005). Outro exemplo envolve o peptídeo Demegen - P113 (Hst 5<sub>4-15</sub>) capaz de coordenar a íons  $Cu^{2+}$  em diferentes pHs na proporção de 1:1 (KULON et al., 2008).

Em 2009, Buré e colaboradores evidenciaram a mudança conformacional do peptídeo rico em histidina H5WYG na presença de íons  $Zn^{2+}$ , tendo proposto a proporção de 1:1 (BURÉ et al., 2009). Em estudo realizado em 2010, Porciatti e colaboradores observaram que os quelatos formados pelo P113 com os íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  foram completamente diferentes; em ambos os casos, a coordenação aos metais não favoreceu a atividade antimicrobiana do peptídeo normalmente ativo frente a bactérias e fungos, levando a conclusão de que os quelatos formados não possibilitaram a entrada do peptídeo na célula (PORCIATTI et al., 2010). Por outro lado, Puri e colaboradores (2015) evidenciaram a coordenação da Hst 5 a íons  $Fe^{3+}$  na proporção de 1:10, sendo que esta quelação conferiu estabilidade frente à tripsina mas induziu a perda de estrutura e atividade biológica. Os autores também observaram que o análogo fluorescente FITC-Hst 5 coordenou a íons  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , na proporção de 1:1 e teve sua atividade antimicrobiana frente à *C. albicans* aumentada (PURI et al., 2015).

Quanto ao motivo presente repetidamente na *Chef I* e nos seus análogos aqui estudados, um estudo de 2016 investigou a coordenação do tripeptídeo GGH a íons  $Cu^{2+}$ , tendo demonstrado através da espectroscopia UV-Vis, que o tripeptídeo é capaz de quelar íons na proporção de 4:1 e, por isso, ele seria um bom candidato ao tratamento de Alzheimer necessários para a agregação dos peptídeos A $\beta$  amilóides (vide **item 4.2.1.**; HU et al., 2016). Assim, nossos resultados apontam para a

necessidade de investigar a possibilidade de a *Chef la* aqui estudada ser fonte de inspiração para o desenho de quelantes deste metal, o que já está sendo feito pelo nosso grupo de pesquisa.

Em 2001, Lodyga-Chruscinska e colaboradores propuseram uma nova classe de peptídeos quelantes de  $\text{Cu}^{2+}$ : os peptídeos tetrazólicos, em especial o Ala-Ala-( $\text{CN}_4$ )-Ala-Ala, tendo demonstrado através dos espectros de UV-Vis que ele era capaz de quelar tal íon na proporção de 1:1 (LODYGA-CHRUSCINSKA et al., 2001). Posteriormente, foram estudados peptídeos com tal capacidade que foram isolados por RP-HPLC com uma coluna  $\text{C}_{18}$  contendo íons  $\text{Cu}^{2+}$  a partir de hidrolisados de sementes de girassóis (MEGÍAS et al., 2007). A microplusina foi descrita em 2009 como um peptídeo quelante de íons  $\text{Cu}^{2+}$  que leva a morte celular através da “inanição” de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na proporção de 1:1 (SILVA et al., 2009).

Atualmente, o estudo da possibilidade de aumentar a atividade e estabilidade de AMPs na presença de íons metálicos divalentes e a procura por sondas intracelulares destes íons, principalmente íons  $\text{Cu}^{2+}$  (associado à angiogênese e progressão tumoral – vide **item 4.2.1.**), vem sendo intensificados (LIBARDO et al., 2014; DENOYER et al., 2015; GONZALEZ et al., 2018; ŁOBODA; KOZŁOWSKI; ROWIŃSKA-ZYREK, 2018). Da mesma forma, a doença de Alzheimer também tem sido associada a um desequilíbrio destes íons, em especial  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , que são acumulados nas placas amiloides depositadas no cérebro através da coordenação com o peptídeo  $\text{A}\beta$  (CHEN et al., 2006; HU et al., 2016; KEPP, 2017).

Um representante de tentativa de aplicação que novos agentes quelantes do cobre para o tratamento de câncer é o tetratiomolibdato de amônio (TM), que por possui rápida ação e tolerância, vêm exibindo bons resultados no combate à doença pelos efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórios através da inibição de citocinas pró-

fibróticas e pró-inflamatórias (YU; COWAN, 2017) e diminuição da progressão tumoral pela redução de angiogênese (YANG; BIERBACH, 2017). A importância destes íons para a quimioterapia é expressiva. Já foram descritos casos de resistência a quimioterápicos (p. ex. cisplatina para câncer de colo de útero) através da expressão de transportadores de cobre que alteram a homeostase e inviabilizam a ação do quimioterápico (SANTINI et al., 2014; WEHBE et al., 2017).

Assim sendo, os resultados do estudo aqui descrito são cientificamente relevantes e estudos futuros da *Chef Ia* e seus análogos devem ser continuados.

## 5. Conclusões

► Confirmando resultados anteriores do nosso grupo (REMUZGO, 2009; REMUZGO et al., 2014), os peptídeos sintéticos *Chef Ia* e *FAM-Chef Ia* foram capazes de inibir o crescimento e matar células de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em pH 5,1, sendo um fator limitante para estas atividades a protonação de seus oito resíduos de histidina. De fato, esses AMPs sintéticos foram inativos em pH 7,4, corroborando com os resultados encontrados na literatura para peptídeos ricos em histidina.

► A *Chef Ia* em pH 5,1:

– Exibiu atividade fungistática/anticandida a  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e fungicida/candidacida a partir de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , sendo tal propriedade negativamente influenciada por íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (aumento da MIC de 2-4 vezes) que levaram à total perda de atividade anticandida em  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ;

– Os íons  $\text{Zn}^{2+}$  extinguiram sua atividade candidacida ( $\text{MFC} > 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), porém influenciaram positivamente e de forma progressiva a sua atividade anticandida (diminuição da MIC de 8-64 vezes);

– Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  influenciaram positivamente sua atividade anticandida (diminuição da MIC de 2-4 vezes) e candidacida (diminuição da MFC de 2-8 vezes).

▶ O análogo *FAM-Chef Ia* em pH 5,1:

– Foi mais ativo devido à hidrofobicidade do marcador fluorescente [5(6)-carboxifluoresceína], confirmando nossos resultados de estudo anterior (REMUZGO et al., 2014), tendo sido observada neste estudo atividade fungistática/anticandida a  $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e fungicida/candidacida a  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;

– Os íons  $\text{Zn}^{2+}$  não afetaram sua atividade candidacida (MFC de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas sim a sua capacidade de inibir o crescimento das células de *C. parapsilosis*, sendo tal influência positiva (diminuição da MIC de 4-32 vezes);

– Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  atuaram de forma oposta, não afetando sua atividade anticandida (MIC de  $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas influenciando positivamente a candidacida (diminuição da MIC de 2 vezes).

▶ Ambos os peptídeos em pH 7,4 foram inativos tanto na ausência ou presença destes íons, com exceção da *Chef Ia* que apresentou atividade anticandida na presença de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  (MICs de 25 e  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente).

▶ Tanto em pH 5,1 quanto em 7,4 e na ausência de íons metálicos divalentes, a influência negativa do aumento da salinidade na atividade antimicrobiana foi confirmada através da inatividade dos peptídeos estudados em 154, 85,6 e  $42,8 \text{mmol.L}^{-1}$  de NaCl, corroborando os resultados de estudos prévios com peptídeos ricos em histidina e/ou glicina.

▶ O estudo do aumento da salinidade do meio em pH 5,1 revelou que:

- Os íons  $Zn^{2+}$  restauraram a atividade anticandida da *Chef Ia* em todas as concentrações de NaCl testadas, sendo esta atividade mais positivamente afetada em  $85,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  NaCl (diminuição da MIC de 4-16 vezes);
  - Os íons  $Cu^{2+}$  não restauraram a atividade de *Chef Ia*, exceto em  $85,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl e  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $Cu^{2+}$ , que apresentou atividade anticandida (MIC  $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ );
  - O aumento da força iônica não afetou a atividade candidada de *FAM-Chef Ia* na presença de  $Zn^{2+}$  (MFC de  $3,125 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Entretanto, na maior concentração de NaCl testada ( $154 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) sua atividade anticandida foi aumentada 2 vezes na presença de  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$   $Zn^{2+}$  (MIC de  $1,56 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).
- Em resumo, em pH 5,1 e  $154 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl os dois peptídeos exibiram atividade anticandida em presença de  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $Zn^{2+}$ . Entretanto somente o análogo fluorescente *FAM-Chef Ia*, foi capaz de matar as células de *C. parapsilosis* em baixa, moderada e alta força iônica.
- Os ensaios de internalização celular de *FAM-Chef Ia* em pH 5,1 evidenciaram uma influência negativa da fixação com formaldeído (3,7%) à ação do marcador de vacúolo celular *CMAC-Blue* (p-valor 0,0002). Os resultados obtidos permitiram a suposição de dois possíveis mecanismos de ação: a translocação direta e a endocitose, sendo que estas ações não dependeram da concentração do peptídeo (p 0,0602).
- As diferenças observadas entre as categorias de células analisadas (verdes, azuis e colocalizações) foram significativas a 1 MIC tanto em células vivas (p<0,0001) quanto fixadas (p 0,0222), sendo que para as primeiras os íons  $Zn^{2+}$  influenciaram negativamente as localizações do peptídeo citoplasmática/translocação e vacuolar/endocitose (p-valores 0,0014 e 0,0191, respectivamente). Já nas células

vivas estes íons influenciaram negativamente a localização citoplasmática (p-valor 0,0343) e, positivamente a vacuolar (p-valor 0,0002);

► As análises dos espectros de DC de *Chef Ia* (pH 5,0 e 7,4) evidenciaram que:

– Em pH 5,0 o espectro de *Chef Ia* exibiu folhas  $\beta$  e dobras  $\beta$ , corroborando com resultados anteriores do laboratório;

– Neste pH e na presença de íons  $Zn^{2+}$  sua atividade anticandida parece estar diretamente relacionada à maior porcentagem da categoria “outras estruturas” e não a maior proporção de “folha  $\beta$  antiparalela”;

– Nesse caso, a atividade candidada em presença de íons  $Cu^{2+}$  coincidiu à maior porcentagem de “outras estruturas” e menores porcentagens de “dobras  $\beta$ ”;

– Em conjunto, tais resultados indicaram que, neste pH, a atividade candidada não parece estar estritamente relacionada à estrutura do peptídeo em presença destes íons metálicos. É possível que o(s) alvo(s) intracelular(es) na presença de íons  $Cu^{2+}$  difiram daqueles em presença de íons  $Zn^{2+}$  e que os quelatos do peptídeo formados com ele sejam distintos;

– As maiores porcentagens de “dobras” e “folhas  $\beta$  antiparalelas” foram observadas em pH 7,4. Entretanto, a menor porcentagem de “outras estruturas” coincide com ausência de atividade candidada do peptídeo neste pH;

– Em ambos os pHs analisados foram observadas as maiores porcentagens do tipo de folha  $\beta$  antiparalela relaxada, que coincide com o modelo espacial teórico obtido para a *Chef I* neste trabalho.

► Os resultados de fluorimetria revelaram ambos os peptídeos como bioquelantes em potencial, sendo um deles um quelante para íons  $Cu^{2+}$  na proporção 1:1 (*Chef Ia*) e o outro um quelante fluorescente (*FAM-Chef Ia*) para íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  nas proporções 1:2 e 1:10, respectivamente.

► De forma geral, os resultados até agora obtidos não nos permitiram estabelecer com certeza os mecanismos de ação que estes peptídeos atuaram na ausência e na presença dos íons metálicos estudados. Entretanto, eles nos permitiram sugerir as seguintes hipóteses:

– Na ausência dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  o mecanismo de ação dos peptídeos *Chef Ia* e seu análogo fluorescente *FAM-Chef Ia* em células de *C. parapsilosis* deve envolver igualmente a translocação direta e a endocitose;

– Na presença de íons  $\text{Zn}^{2+}$  os peptídeos parecem atuar predominante por endocitose que acaba por não induzir a morte celular, corroborando com o mecanismo do peptídeo rico em histidina, Hst 5, em células de *C. albicans* (JANG et al., 2010);

– Já na presença dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  eles atuam predominantemente através da translocação direta. É possível que no espaço intracelular a presença dos peptídeos e estes íons levem à produção de EROs e morte celular como descrito para peptídeos com o motivo ATCUN (p.ex. família das piscidinas, MUC 7 e Hst 5).

► Levando se em conta os resultados apresentados e lembrando que a parte mínima ativa do peptídeo amidado *Chef Ia* é GGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG-NH<sub>2</sub> e foi descrita como *Chef I(6-28)a* em trabalho nosso anterior (REMUZGO et al., 2014), podemos concluir que a presença do motivo ATCUN é fundamental para as atividades antimicrobianas, bem como que a interação com os metais aqui descritos podem afetá-las através da formação de quelatos de estruturas distintas. Uma vez que estes peptídeos são antifúngicos ativos em pH 5,1 que quelam os íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em concentrações micromolares, a elucidação do modo pelo qual eles atuam precisa ser elucidado e a manipulação da sequência de aminoácidos dos análogos de *Chef I* com enfoque nas 6 repetições do tripeptídeo

GGH, é de extrema importância tanto para a área analítica (p.ex. para o desenvolvimento de sondas intracelulares e biosensores) quanto para a área biológica/médica (p.ex. desenvolvimento de novos candidacidas e/ou quelantes de cobre para combate às doenças descritas anteriormente ou, ainda, de novos CPPs). Estes estudos já foram iniciados em nosso laboratório.

## 6. Referências Bibliográficas

- AGGETT, P. J. Acrodermatitis Enteropathica. **J. Inher. Metab. Dis.**, v. 6, n. 1, p. 39–43, 1983.
- AISENBREY, C.; BECHINGER, B. Molecular packing of amphipathic peptides on the surface of lipid membranes. **Langmuir**, v. 30, n. 34, p. 10374–10383, 2014.
- ALBEE, F. H. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate As a Stimulus To Osteogenesis. **Ann. Surg.**, v. 71, n. 1, p. 32–39, 1920.
- ALEXANDER, J. L.; THOMPSON, Z.; COWAN, J. A. Antimicrobial Metallopeptides. **ACS Chem. Biol.** v. 13, n. 4, p. 844–853, 2018.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Magnesium and contraction of arterial smooth muscle. **Microvasc. Res.**, v. 7, n. 2, p. 145–155, 1974.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. **Mol. Biotechnol.**, v. 33, p. 239–254, 2006.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resist. Updat.**, v. 26, p. 43–57, 2016.
- ANTINORI, S.; CORBELLINO, M.; PARRAVICINI, C. Challenges in the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Hosts. **Current Fungal Infec. Repor.**, v. 12, n. 1, p. 12–22, 2018.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; FRADE, J. P.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A.; HARRISON, L. H.; SOFAIR, A. N.; WARNOCK, D. W. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing Candida. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2477–2481, 2002.
- AYRES, M.; AYRES JR, M. **Manual Biostat. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas.** Belém, Pará. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/>>. Acesso em: 31/08/18.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.
- BARROS, A. N. de A. B. **Associação entre status de cobre, perfil lipídico e capacidade funcional em pacientes com esclerose lateral amiotrófica.** 2017. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- BECHINGER, B.; GORR, S. Antimicrobial Peptides : Mechanisms of Action and Resistance. **J. Dental Res.**, v. 96, n. 3, p. 254–260, 2017.
- BECUCCI, L.; VALENSIN, D.; INNOCENTI, M.; GUIDELLI, R. Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: Influence of lipid charge, pH and Zn<sup>2+</sup> on its interaction with a biomimetic membrane. **Soft Matter**, v. 10, n. 4, p. 616–626, 2014.
- BEHRENDT, R.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **J. Pept. Sci.**, v. 22, p. 4–27, 2016.
- BOBEK, L. A.; SITU, H. MUC7 20-Mer: Investigation of Antimicrobial Activity, Secondary Structure, and Possible Mechanism of Antifungal Action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 2, p. 643–652, 2003.
- BOU-ABDALLAH, F.; GIFFUNE, T. R. The thermodynamics of protein interactions with essential first row

- transition metals. **BBA - General Subjects**, v. 1860, n. 5, p. 879–891, 2016.
- BRASIL. ANVISA. **Comunicado de risco N° 01/2017. Relatos de surtos de Candida auris em serviços de saúde da América Latina**. Brasília. ANVISA, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-01-2017-candida-auris>>. Acesso em: 30/09/18.
- BRASIL. ANVISA. **Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília. ANVISA, 2013. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/manuais>>. Acesso em: 30/09/18.
- 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 Spectrom.** v. 1745, p. 1736–1745, 2000.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: Human fungal infections. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, n. 165, 2012.
- BROWNE, M. J.; FENG, C. Y.; BOOTH, V.; RISE, M. L. Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Dev. Comp Immunol.**, v. 35, n. 3, p. 399–408, 2011.
- BURÉ, C.; MAGET, R.; DELMAS, A. F.; PICHON, C.; MIDOUX, P. Histidine-rich peptide: Evidence for a single zinc-binding site on H5WYG peptide that promotes membrane fusion at neutral pH. **J. Mass Spectrom.**, v. 44, n. 1, p. 81–89, 2009.
- BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2003.
- CABRAS, T.; PATAMIA, M.; MELINO, S.; INZITARI, R.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; PETRUZZELLI, R. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 358, n. 1, p. 277–284, 2007.
- CANELA, H. M. S.; COELHO, H. C.; CARDOSO, B.; VITALI, L. H.; MARTINEZ, R.; FERREIRA, M. E. da S. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. August 2017, p. 11–21, 2018.
- CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; TANABE, K.; NIIMI, M.; MONK, B. C. *Candida albicans* drug resistance - Another way to cope with stress. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3211–3217, 2007.
- CARVALHO, L. A. C.; REMUZGO, C.; PEREZ, K. R.; MACHINI, M. T. Hb40-61a: Novel analogues help expanding the knowledge on chemistry, properties and candidacidal action of this bovine  $\alpha$ -hemoglobin-derived peptide. **BBA**, v. 1848, n. 12, p. 3140–3149, 2015.
- CARVALHO, L. A. D. C. **Hemocidina sintética hb40-61a : estudo das propriedades, mecanismo de ação e interação com nanopartículas poliméricas**. 2012. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.
- CATALANI, S.; PAGANELLI, M.; GILBERTI, M. E.; ROZZINI, L.; LANFRANCHI, F.; PADOVANI, A.; APOSTOLI, P. Free copper in serum: An analytical challenge and its possible applications. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 45, p. 176–180, 2018.
- CERVANTES-CERVANTES, M. P.; CALDERÓN-SALINAS, J. V.; ALBORES, A.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J. L. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 103, n. 3, p. 229–48, 2005.
- CHAFFIN, W. L. A. J.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 1, p. 130–180, 1998.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- CHANG, C. T.; WU, C. S. C.; YANG, J. T. Circular dichroic analysis of protein conformation: Inclusion of the  $\beta$ -turns. **Analytical Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 13–31, 1978.
- CHEN, Y. R.; HUANG, H. B.; CHYAN, C. L.; SHIAO, M. S.; LIN, T. H.; CHEN, Y. C. The effect of A $\beta$  conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism

- spectroscopy. **J. Biochem.**, v. 139, n. 4, p. 733–740, 2006.
- CLSI. **M26-A**: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. 1 Ed. 1999, p. 1–50.
- CLSI. **M27-A2**: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada. 2Ed. 2002, p. 1–51.
- COENYE, T.; DE VOS, M.; VANDENBOSCH, D.; NELIS, H. Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n. 5, p. 495–497, 2008.
- COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis : from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nature Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3247–3256, 2007.
- COLE, A. M.; KIM, Y. H.; TAHK, S.; HONG, T.; WEIS, P.; WARING, A. J.; GANZ, T. Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. **Febs Letters**, v. 504, p. 5–10, 2001.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria : uma abordagem clínica e terapêutica Candiduria : a clinical and therapeutic approach. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 332–337, 2007.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUE, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D. Epidemiology of Candidemia in Brazil : a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.
- COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress , Drugs , and Evolution : the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 747–764, 2008.
- DA CUNHA, N. B.; COBACHO, N.; VIANA, J. F. C.; LIMA, L. A.; SAMPAIO, K. B. O.; DOHMS, S. S. M.; FERREIRA, A. C. R.; FUENTE-NÚÑEZ, C. de la; COSTA, F. F.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 234–248, 2017.
- DA MATTA, D. A.; DE ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J. U.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995–2003. **Diagn Microbiol Infect Dis** , v. 57, n. 4, p. 399–404, 2007.
- DASHPER, S. G.; BRIEN-SIMPSON, N. M. O.; CROSS, K. J.; PAOLINI, R. a; HOFFMANN, B.; CATMULL, D. V.; MALKOSKI, M.; REYNOLDS, E. C. Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2322–2328, 2005.
- DENOYER, D.; MASALDAN, S.; LA FONTAINE, S.; CATER, M. A. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”. **Metallomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 2015.
- DESCHAMPS, P.; KULKARNI, P. P.; GAUTAM-BASAK, M.; SARKAR, B. The saga of copper(II)-L-histidine. **Coord. Chem. Rev.**, v. 249, n. 9–10, p. 895–909, 2005.
- DESHAYES, S.; MORRIS, M.; HEITZ, F.; DIVITA, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, n. 4–5, p. 537–547, 2008.
- DEVI, S. R. B.; DHIVYA M, A.; SULOCHANA, K. N. Copper transporters and chaperones: Their function on angiogenesis and cellular signalling. **J Biosci**, v. 41, n. 3, p. 487–496, 2016.
- DONG, X.; YUAN, Q.; QI, H.; YANG, J.; ZHU, B.; ZHOU, D.; MURATA, Y.; YE, W. Isolation and Characterization of Pepsin-Soluble Collagen from Abalone (*Haliotis discus hannai*) Gastropod Muscle Part II. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 18, n. 2, p. 271–278, 2012.
- DRGONA, L.; KHACHATRYAN, A.; STEPHENS, J.; CHARBONNEAU, C.; KANTECKI, M.; HAIDER, S.; BARNES, R. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: Focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 33, n. 1, p. 7–21, 2014.
- DUTTA, P.; DAS, S. Mammalian Antimicrobial Peptides: Promising Therapeutic Targets Against Infection and Chronic Inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 99–129, 2016.
- EGUCHI, A.; DOWDY, S. F. siRNA delivery using peptide transduction domains. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 7, p. 341–345, 2009.
- EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; FEHLBAUM, P.; JULES, A.; DORSSELAER, A. Van; CHEM, J. B.; GOYFFON, M.; HOFFMANN, J. a; BULET, P. Protein Chemistry and Structure : Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 47, p. 29537–29544, 1996.

- EIRÍKSDÓTTIR, E.; KONATE, K.; LANGEL, Ü.; DIVITA, G.; DESHAYES, S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. **BBA**, v. 1798, n. 6, p. 1119–1128, 2010.
- EL-SAYED, A.; KHALIL, I. A.; KOGURE, K.; FUTAKI, S.; HARASHIMA, H. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 34, p. 23450–23461, 2008.
- ENDO, T.; OHTSUKI, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 61, n. 9, p. 704–709, 2009.
- FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. W. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 32, p. 19298–19303, 1996.
- FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molec. Immunol.**, v. 40, n. 7, p. 395–405, 2003.
- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. Insect immunity: Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 52, p. 33159–33163, 1994.
- FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health Matthew. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 1–18, 2013.
- FISHER, P. W. F.; GIROUX, A.; L'ABBÉ, M. R. The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. **Am J Clin Nutr**, v. 34, p. 1670–1675, 1981.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics : current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015.
- FRIEDRICH, C.; SCOTT, M. G.; KARUNARATNE, N.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 43, n. 7, p. 1542–8, 1999.
- FURRY, J. W. **Preparation, Properties and Applications of Calcein in a Highly Pure Form**. 1985. Tese de Doutorado, Iowa State University, Ames, Iowa, 1985.
- GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 9, p. 710–720, 2003.
- GERA, J. F.; LICHTENSTEIN, A. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. **Cellular Immunology**, v. 138, n. 1, p. 108–120, 1991.
- GIORDANO, R.; FÁBIO, F.; BALDINI, R.; HOTTA, C.; WINCK, F. **Manual de Biossegurança - Instituto de Química/ Universidade de São PAULO (USP)**. São Paulo, 2016. Disponível em: <[http://www3.iq.usp.br/paginas\\_view.php?idPagina=1109](http://www3.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=1109)> Acesso em: 30/08/18.
- GONZALEZ, P.; BOSSAK, K.; STEFANIAK, E.; HUREAU, C.; RAIBAUT, L.; BAL, W.; FALLER, P. N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, n. 32, p. 8029–8041, 2018.
- GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 2012.
- GROS, E.; DESHAYES, S.; MORRIS, M. C.; ALDRIAN-HERRADA, G.; DEPOLLIÉ, J.; HEITZ, F.; DIVITA, G. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. **BBA**, v. 1758, n. 3, p. 384–393, 2006.
- GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 4, p. 406–424, 2017.
- GUPTA, B.; LEVCHENKO, T. S.; TORCHILIN, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 637–651, 2005.
- GYURKO, C.; LENDENMANN, U.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. Candida albicans mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, n. 2, p. 348–354, 2000.
- HÄLLBRINK, M.; FLORÉN, A.; ELMQUIST, A.; POOGA, M.; BARTFAI, T.; LANGEL, Ü. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. **BBA**, v. 1515, n. 2, p. 101–109, 2001.
- HAMMAMI, R.; BEN HAMIDA, J.; VERGOTEN, G.; FLISS, I. PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 963–968, 2009.
- 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, 2016.
- HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, 2000.
- HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotech.**, v. 24, n. 12, p. 1551–7, 2006.
- HANEY, E.; HANCOCK, R. Peptide Design for Antimicrobial and Immunomodulatory Applications. **Biopolymers**, v. 100, n. 6, p. 572–583, 2014.
- HANEY, E.; MANSOUR, S.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: HANSEN, P. R. **Antimicrobial Peptides - Methods and Protocols**. 14. ed. New York: Humana Press, 2017. p. 3–22.
- HARDING, M. M. Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: Sodium and potassium. **Acta Cryst. D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 5, p. 872–874, 2002.
- 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 Chem. Res.**, v. 30, n. 3, p. 123–130, 1997.
- HAYDEN, R. M.; GOLDBERG, G. K.; FERGUSON, B. M.; SCHOENECK, M. W.; LIBARDO, M. D. J.; MAYEUX, S. E.; SHRESTHA, A.; BOGARDUS, K. A.; HAMMER, J.; PRYSHCHEP, S.; LEHMAN, H. K.; MCCORMICK, M. L.; BLAZYK, J.; ANGELES-BOZA, A. M.; FU, R.; COTTEN, M. L. Complementary Effects of Host Defense Peptides Piscidin 1 and Piscidin 3 on DNA and Lipid Membranes: Biophysical Insights into Contrasting Biological Activities. **J. Phys. Chem. B**, v. 119, n. 49, p. 15235–15246, 2015.
- HEIMANN, S. M.; CORNELLY, O. A.; WISPLINGHOFF, H.; KOCHANNEK, M.; STIPPEL, D.; PADOSCH, S. A.; LANGEBAEDEL, G.; REUTER, H.; REINER, M.; VIERZIG, A.; SEIFERT, H.; VEHRSCCHILD, M. J. G. T.; GLOSSMANN, J.; FRANKE, B.; VEHRSCCHILD, J. J. Candidemia in the intensive care unit: analysis of direct treatment costs and clinical outcome in patients treated with echinocandins or fluconazole. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 34, n. 2, p. 331–338, 2014.
- HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Analytical Biochem.**, v. 136, n. 1, p. 65–74, 1984.
- HELMERHORST, E. J.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; SIMOONS-SMIT, I.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. **Biochem J**, v. 326, p. 39–45, 1997.
- HENRIQUES, S. T.; MELO, M. N.; CASTANHO, M. a R. B. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? **Biochem J**, v. 399, p. 1–7, 2006.
- HERBINIÈRE, J.; BRAQUART-VARNIER, C.; GRÈVE, P.; STRUB, J. M.; FRÈRE, J.; VAN DORSSELAER, A.; MARTIN, G. Armadillidin: A novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). **Dev Comp Immunol**, v. 29, n. 6, p. 489–499, 2005.
- HETRU, C.; BULET, P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. In: SHAFER, W. M. **Antibacterial Peptide Protocols (Methods in Molecular Biology)**. 1. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1997. p. 35–49.
- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, É.; AGUIAR, T.; VILELLA, S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 41, n. 4, p. 394–398, 2008.
- HODGES, R. S.; BURKE, LORNE, T. W.; MANT, C. T. Preparative purification of peptides by reversed-phase chromatography. Sample displacement mode versus gradient elution mode. **J. Chromatogr.**, v. 444, p. 349–362, 1988.
- HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.
- HOLDBROOK, D. A.; SINGH, S.; CHOONG, Y. K.; PETRLOVA, J.; MALMSTEN, M.; BOND, P. J.; VERMA, N. K.; SCHMIDTCHEN, A.; SARAVANAN, R. Influence of pH on the activity of thrombin-derived antimicrobial peptides. **BBA**, v. 1860, n. 11, p. 2374–2384, 2018.
- HU, X.; ZHANG, Q.; WANG, W.; YUAN, Z.; ZHU, X.; CHEN, B.; CHEN, X. Tripeptide GGH as the Inhibitor of Copper-Amyloid- $\beta$ -Mediated Redox Reaction and Toxicity. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 1255–1263, 2016.
- HYNDMAN, L.; LEMOINE, J. L.; HUANG, L.; PORTEOUS, D. J.; BOYD, A. C.; NAN, X. HIV-1 Tat protein

- transduction domain peptide facilitates gene transfer in combination with cationic liposomes. **J. Control Rel.**, v. 99, n. 3, p. 435–444, 2004.
- IIJIMA, R.; KURATA, S.; NATORI, S. Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 16, p. 12055–61, 1993.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology - the “Gold Book”**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- JANG, W. S.; BAJWA, J. S.; SUN, J. N.; EDGERTON, M. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. **Mol Microbiol.**, v. 77, n. 2, p. 354–370, 2010.
- JÄRVER, P.; MÄGER, I.; LANGEL, Ü. In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 11, p. 528–535, 2010.
- JAZAYERI, S.; FELI, A.; BITARAF, M. A.; SOLAYMANI, M. Effects of Copper Reduction on Angiogenesis-Related Factors in Recurrent Glioblastoma Cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 4609–4614, 2016.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.
- JONES, A. L.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 2, p. 106–118, 2005.
- JOYNER, J. C.; REICHHFIELD, J.; COWAN, J. A. Factors Influencing the DNA Nuclease Activity of Iron, Cobalt, Nickel, and Copper Chelates. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 199, n. 39, p. 15613–15626, 2011.
- JULIANO, S. A.; PIERCE, S.; DEMAYO, J. A.; BALUNAS, M. J.; ANGELES-BOZA, A. M. Exploration of the Innate Immune System of *Styela clava*: Zn<sup>2+</sup> Binding Enhances the Antimicrobial Activity of the Tunicate Peptide Clavanin A. **Biochemistry**, v. 56, n. 10, p. 1403–1414, 2017.
- KABIR, M. A.; AHMAD, Z. *Candida* Infections and Their Prevention. **ISRN Preventive Medicine**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- KACPRZYK, L.; RYDENGÅRD, V.; MÖRGELIN, M.; DAVOUDI, M.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. **BBA**, v. 1768, n. 11, p. 2667–2680, 2007.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; I., C. P. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.
- KANG, H.; KIM, C.; SEO, C. H.; PARK, Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KELLER, B.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 12, p. 3625–33, 1988.
- KEMPE, M.; BARANY, G.; E, P. S. S. CLEAR: A Novel Family of Highly Cross-Linked Polymeric Supports for Solid-Phase Peptide Synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, n. 30, p. 7083–7093, 1996.
- KEPP, K. P. Alzheimer’s disease: How metal ions define  $\beta$ -amyloid function. **Coord. Chem. Rev.**, v. 351, p. 127–159, 2017.
- KHALIL, I. A.; KIMURA, S.; SATO, Y.; HARASHIMA, H. Synergism between a cell penetrating peptide and a pH-sensitive cationic lipid in efficient gene delivery based on double-coated nanoparticles. **J. Control. Release**, v. 275, p. 107–116, 2018.
- KICHLER, A.; MASON, A. J.; BECHINGER, B. Cationic amphiphathic histidine-rich peptides for gene delivery. **BBA**, v. 1758, n. 3, p. 301–307, 2006.
- KIM, D. H.; LEE, D. G.; KIM, K. L.; LEE, Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. **Eur J Biochem.**, v. 268, n. 16, p. 4449–4458, 2001.
- KIMOTO, E.; TANAKA, H.; GYOTOKU, J.; MORISHIGE, F.; PAULING, L. Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the Copper : Glycylglycylhistidine complex. **Cancer Res.**, v. 43, n. 2, p. 824–828, 1983.
- KORDALEWSKA, M.; LEE, A.; PARK, S.; BERRIO, I.; CHOWDHARY, A.; ZHAO, Y.; PERLIN, D. S. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 62, n. 5, 2018.
- KULON, K.; VALENSIN, D.; KAMYSZ, W.; VALENSIN, G.; NADOLSKI, P.; PORCIATTI, E.; GAGGELLI, E.;

- KOZŁOWSKI, H. The His-His sequence of the antimicrobial peptide demegen P-113 makes it very attractive ligand for Cu<sup>2+</sup>. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, n. 4, p. 960–972, 2008.
- LAMIABLE, A.; THÉVENET, P.; REY, J.; VAVRUSA, M.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. PEP-FOLD3: faster *de novo* structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W449–W454, 2016.
- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides : Historical perspectives , current development trends , and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018.
- LAVIER, D. R. The Barrel-Stave Model as Applied to Alamethicin and Its Analogues Reevaluated. **Biophys. J.**, v. 66, p. 355–359, 1994.
- LE, C.-F.; FANG, C.-M.; SEKARANC, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 61, n. 4, p. 1–16, 2017.
- LEE, D. G.; KIM, H. K.; KIM, S. A.; PARK, Y.; PARK, S. C.; JANG, S. H.; HAHM, K. S. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 305, n. 2, p. 305–310, 2003.
- LEE, D. G.; PARK, Y.; KIM, H. N.; KIM, H. K.; KIM, P. II; CHOI, B. H.; HAHM, K. S. Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of Helicobacter pylori Ribosomal Protein L1 against Candida albicans. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 291, n. 4, p. 1006–1013, 2002.
- LEE, I. H.; CHO, Y.; LEHRER, R. I. Effects of pH and Salinity on the Antimicrobial Properties of Clavanins. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2898–2903, 1997.
- LEE, S. Y.; MOON, H. J.; KURATA, S.; NATORI, S.; LEE, B. L. Purification and cDNA cloning of an Antifungal Protein from the Hemolymph of Holotrichia diomphalia Larvae. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 8, p. 1049–1052, 1995.
- LEE, Y. J.; CHUNG, T. J.; PARK, C. W.; HAHN, Y.; CHUNG, J. H.; LEE, B. L.; HAN, D. M.; JUNG, Y. H.; KIM, S.; LEE, Y. Structure and expression of the tenecin 3 gene in Tenebrio molitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, n. 1, p. 6–11, 1996.
- LEHTO, T.; EZZAT, K.; WOOD, M. J. A.; EL, S. Peptides for nucleic acid delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 106, n. 2016, p. 172–182, 2017.
- LI, J.; KOH, J. J.; LIU, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; VERMA, C. S.; BEUERMAN, R. W. Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. 73, p. 1–18, 2017.
- LI, X. C.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; KHALID ASHFAQ, M.; SURESH BABU, K.; AGARWAL, A. K.; ELSOHLI, H. N.; MANLY, S. P.; CLARK, A. M. Potent in vitro antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2442–2448, 2008.
- LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012.
- LIBARDO, M. D.; CERVANTES, J. L.; SALAZAR, J. C.; ANGELES-BOZA, A. M. Improved bioactivity of antimicrobial peptides by addition of amino-terminal copper and nickel (ATCUN) binding motifs. **ChemMedChem**, v. 9, n. 8, p. 1892–1901, 2014.
- LINDER, M. C. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1–2, p. 83–91, 2012.
- LIU, P.; HUANG, X.; ZHOU, R.; BERNE, B. J. Observation of a dewetting transition in the collapse of the melittin tetramer. **Nature**, v. 437, n. 7055, p. 159–162, 2005.
- ŁOBODA, D.; KOZŁOWSKI, H.; ROWIŃSKA-ZYREK, M. Antimicrobial peptide-metal ion interactions-a potential way of activity enhancement. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 7560–7568, 2018.
- LOCKHART, S. R.; ETIENNE, K. A.; VALLABHANENI, S.; FAROOQI, J.; CHOWDHARY, A.; GOVENDER, N. P.; COLOMBO, A. L.; CALVO, B.; CUOMO, C. A.; DESJARDINS, C. A.; BERKOW, E. L.; CASTANHEIRA, M.; MAGOBO, R. E.; JABEEN, K.; ASGHAR, R. J.; MEIS, J. F.; JACKSON, B.; CHILLER, T.; LITVINTSEVA, A. P. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 64, p. 134–140, 2017.
- LODYGA-CHRUSCINSKA, E.; MICERA, G.; SANNA, D.; OLCZAK, J.; ZABROCKI, J. A new class of peptide chelating agents towards copper(II) ions. **Polyhedron**, v. 20, n. 15–16, p. 1915–1923, 2001.
- LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N. A.; GERHARDT, J.; MIRANDA, M. T. M. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60°C : alternative conditions with low enantiomerization. **J. Pept. Sci.**, v. 15, p. 808–817, 2009.

- LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I.; FOGAÇA, A. C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: A novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev Comp Immunol**, v. 27, n. 9, p. 781–791, 2003.
- LORIN, A.; NOËL, M.; PROVENCHER, M. È.; TURCOTTE, V.; CARDINAL, S.; LAGÜE, P.; VOYER, N.; AUGER, M. Determining the mode of action involved in the antimicrobial activity of synthetic peptides: A solid-state NMR and FTIR study. **Biophys. J**, v. 103, n. 7, p. 1470–1479, 2012.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ADRENDALL, W. B.; DE BAKKER, P. I. W.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003.
- LYU, Y.; YANG, Y.; LYU, X.; DONG, N.; SHAN, A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.
- MACHADO, A.; FÁZIO, M. a.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MACHINI, M. T. Synthesis and properties of cyclic gomesin and analogues. **J. Pept. Sci**, v. 18, n. 9, p. 588–598, 2012.
- MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.
- MACHADO, A.; SFORÇA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. a; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. M. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine  $\alpha$ -hemoglobin: Effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v. 88, n. 3, p. 413–426, 2007.
- MADANI, F.; LINDBERG, S.; LANGEL, Ü.; FUTAKI, S.; GRÄSLUND, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. **Biophys. J**, v. 2011, p. 1–10, 2011.
- MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79–87, 2004.
- MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides : An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 194, p. 1–12, 2016.
- MALIK, E.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 1–35, 2016.
- MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur J Biochem.**, v. 269, n. 4, p. 1190–1198, 2002.
- MANGEON, A.; JUNQUEIRA, R. M.; SACHETTO-MARTINS, G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 2, p. 99–104, 2010.
- MANN, A.; THAKUR, G.; SHUKLA, V.; GANGULI, M. Peptides in DNA delivery: current insights and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 152–160, 2008.
- MANT, C. T.; HODGES, R. S. **High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation**. 1. ed. Florida: CRC Press, 1991.
- MARQUETTE, A.; BECHINGER, B. Biophysical Investigations Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and Their Synergism. **Biomolecules**, v. 8, n. 18, p. 1–22, 2018.
- MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial peptides for therapeutic use : obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 468–472, 2006.
- MARTENS, D. A.; LOEFFELMANN, K. L. Soil Amino Acid Composition Quantified by Acid Hydrolysis and Anion Chromatography - Pulsed Amperometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 22, p. 6521–6529, 2003.
- MARTIN, M. E.; RICE, K. G. Peptide-guided gene delivery. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E18–E29, 2007.
- MCDONALD, M.; MANNION, M.; PIKE, D.; LEWIS, K.; FLYNN, A.; BRANNAN, A. M.; BROWNE, M. J.; JACKMAN, D.; MADERA, L.; POWER COOMBS, M. R.; HOSKIN, D. W.; RISE, M. L.; BOOTH, V. Structure–function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod. **BBA**, v. 1848, n. 7, p. 1451–1461, 2015.
- MEADE, B. R.; DOWDY, S. F. Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 60, n. 4–5, p. 530–536, 2008.
- MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. D. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: The importance of *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17–20, 2006.
- MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Affinity

- purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 16, p. 6509–6514, 2007.
- MELINO, S.; GALLO, M.; TROTTA, E.; MONDELLO, F.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R.; VERGATA, T.; MOLECOLARE, M.; INFETTI, M.; IMMUNOMEDIATE, P.; SUPERIORE, I.; BIOMEDICHE, S.; UNI, V. Metal-Binding and Nuclease Activity of an Antimicrobial Peptide Analogue of the Salivary Histatin 5. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15373–15383, 2006.
- MELINO, S.; RUFINI, S.; SETTE, M.; MORERO, R.; GROTTESI, A.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R. Zn<sup>2+</sup> 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, n. 30, p. 9626–9633, 1999.
- MELINO, S.; SANTONE, C.; DI NARDO, P.; SARKAR, B. Histatins: Salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs - Perspectives for biomedical applications. **FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 657–672, 2014.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis I: The Synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149, 1963.
- MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **PNAS**, v. 112, n. 24, p. 3095–3103, 2015.
- MIRANDA-CADENA, K.; MARCOS-ARIAS, C.; MATEO, E.; AGUIRRE, J. M.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 100–107, 2018.
- MIYAMOTO, T.; FUKINO, Y.; KAMINO, S.; UEDA, M.; ENOMOTO, S. Enhanced stability of Cu<sup>2+</sup>-ATCUN complexes under physiologically relevant conditions by insertion of structurally bulky and hydrophobic amino acid residues into the ATCUN motif. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 23, p. 9436–9445, 2016.
- MOLECULAR PROBES. pH Indicators. In: **A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies**. 11. ed. Massachusetts, EUA: Thermo Fisher Scientific, 2010. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/ph-indicators.html>>. Acesso em: 11/09/18.
- MONGE, R. A. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 905–912, 2006.
- MORGAN, W. T. Interactions of the Histidine-Rich Glycoprotein of Serum with Metals. **Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1054–1061, 1981.
- MORII, D.; SEKI, M.; BINONGO, N.; BAN, R.; KOBAYASHI, A.; SATA, M.; HASHIMOTO, S.; SHIMIZU, J.; MORITA, S.; TOMONO, K. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. **J. Infect Chemother.**, v. 20, n. 9, p. 558–562, 2014.
- MORRIS, M. C.; CHALOIN, L.; MÉRY, J.; HEITZ, F.; DIVITA, G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 17, p. 3510–3517, 1999.
- MOULAY, G.; LEBORGNE, C.; MASON, A. J.; AISENBREY, C.; BECHINGER, B. Histidine-rich designer peptides of the LAH4 family promote cell delivery of a multitude of cargo. **J. Pept. Sci.**, v. 23, n. 4, p. 320–328, 2017.
- MOUSAVI, A.; HOTTA, Y. Glycine-Rich Proteins: A Class of Novel Proteins. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 120, n. 3, p. 169–174, 2005.
- MURATOVSKA, A.; ECCLES, M. R. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. **FEBS Letters**, v. 558, n. 1–3, p. 63–68, 2004.
- NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 887–895, 2012.
- NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIK, A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4. ed. São Paulo: SARVIER, 2006.
- NICOL, J. R.; HARRISON, E.; O'NEILL, S. M.; DIXON, D.; MCCARTHY, H. O.; COULTER, J. A. Unraveling the cell-type dependent radiosensitizing effects of gold through the development of a multifunctional gold nanoparticle. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 439–449, 2018.
- NISHIKATA, M.; KANEHIRA, T.; OH, H.; TANI, H.; TAZAKI, M.; KUBOKI, Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.

- 174, n. 2, p. 625–630, 1991.
- O'NEILL, J. **Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014.** Disponível em: <<https://amr-review.org>>. Acesso em: 16/07/18.
- O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.** 2016. Disponível em: <<https://amr-review.org>>. Acesso em: 16/07/18.
- ODDS, F. C. Review Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **J Antimicrob Chemother.**, v. 31, n. 4, p. 463–471, 1993.
- OKUDA-SHINAGAWA, N. M.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. da S.; MARQUES, C.; MOSKALENKO, Y. E.; MACHINI, M. T. **Design, synthesis, purification and characterization of new fluorescent or photosensitizer conjugates based on a cell penetrating peptide.** SBQ Annual Reunion, World Chemistry Congress and International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), São Paulo, 2017.
- PALLOTTA, R.; ANDRADE, A.; BISPO, O. C. M. A esclerose lateral amiotrófica como doença autoimune. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 144–152, 2012.
- PAN, Q.; KLEER, C. G.; VAN GOLEN, K. L.; IRANI, J.; BOTTEMA, K. M.; BIAS, C.; DE CARVALHO, M.; MESRI, E. A.; ROBINS, D. M.; DICK, R. D.; BREWER, G. J.; MERAJVER, S. D. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 62, n. 17, p. 4854–4859, 2002.
- PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 485–506, 2006.
- PARK, C. J.; PARK, C. B.; HONG, S. S.; LEE, H. S.; LEE, S. Y.; KIM, S. C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 2, p. 187–197, 2000.
- PARK, C.; LEE, D. G. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 394, n. 1, p. 170–172, 2010.
- PARK, S. C.; KIM, M. H.; HOSSAIN, M. A.; SHIN, S. Y.; KIM, Y.; STELLA, L.; WADE, J. D.; PARK, Y.; HAHM, K. S. Amphipathic  $\alpha$ -helical peptide, HP (2-20), and its analogues derived from *Helicobacter pylori*: Pore formation mechanism in various lipid compositions. **BBA**, v. 1778, n. 1, p. 229–241, 2008.
- PÄRN, K.; ERISTE, E.; LANGEL, Ü. The Antimicrobial and Antiviral Applications of Cell- Penetrating Peptides. In: LANGEL, Ü. **Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols.** 2. ed. New York: Human Press, 2015. p. 223-245.
- PATEL, L. N.; ZARO, J. L.; SHEN, W. Expert Review Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 11, 2007.
- PEARSON, DANIEL, A.; BLANCHETTE, M.; BAKER, L.; GUINDON, C. A. Trialkylsilanes As Scavengers For The Trifluoroacetic Acid Deblocking Of Protecting Groups In Peptide Synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 21, p. 2739–2742, 1989.
- PEPTIDES INTERNATIONAL. **General Information for Handling CLEAR Resins.** Louisville: Peptides International, 2017. Disponível em:<[https://www.pepnet.com/Technical-Library/Publication/74/CLEAR-Resins-\(Technical-Tips\)](https://www.pepnet.com/Technical-Library/Publication/74/CLEAR-Resins-(Technical-Tips))>. Acesso em 10/10/18.
- PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 121–130, 2007.
- PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 321–346, 2007.
- PETERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010.
- PHILLIPS, A. J.; SUDBERY, I.; RAMSDALE, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. **PNAS**, v. 100, n. 24, p. 14327–32, 2003.
- PINHATI, H. M. S. **Surto de candidemia por candida parapsilosis resistente ao fluconazol, em um hospital**

- em Brasília: caracterização clínica, molecular e avaliação dos fatores associados.** 2015. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2015.
- PINHATI, H. M. S.; CASULARI, L. A.; SOUZA, A. C. R.; SIQUEIRA, R. A.; DAMASCENO, C. M. G.; COLOMBO, A. L. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 433, p. 4–9, 2016.
- PLATT, G. W.; SEARLE, M. S.; CHUNG, C.-W. Design of histidine-Zn<sup>2+</sup> binding sites within a  $\beta$ -hairpin peptide: enhancement of  $\beta$ -sheet stability through metal complexation. **Chemical communications**, n. 13, p. 1162–1163, 2001.
- PORCIATTI, E.; MILENKOVIĆ, M.; GAGGELLI, E.; VALENSIN, G.; KOZLOWSKI, H.; KAMYSZ, W.; VALENSIN, D. Structural characterization and antimicrobial activity of the Zn(II) complex with P113 (demegen), a derivative of histatin 5. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 19, p. 8690–8698, 2010.
- POWERS, J. P. S.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. W. Structure-activity relationships for the B-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. **BBA**, v. 1698, n. 2, p. 239–250, 2004.
- PRIEBATSCH, K. M.; POON, I. K. H.; PATEL, K. K.; KVANSAKUL, M.; HULETT, M. D. Divalent metal binding by histidine-rich glycoprotein differentially regulates higher order oligomerisation and proteolytic processing. **FEBS Letters**, v. 591, n. 1, p. 164–176, 2017.
- PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill?: Understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 8, p. 958–964, 2014.
- PURI, S.; LI, R.; RUSZAJ, D.; TATI, S.; EDGERTON, M. Iron Binding Modulates Candidacidal Properties of Salivary Histatin 5. **J Dent Res.**, v. 94, n. 1, p. 201–208, 2015.
- PUSHPANATHAN, M.; RAJENDHRAN, J.; JAYASHREE, S.; SUNDARAKRISHNAN, B.; JAYACHANDRAN, S.; GUNASEKARAN, P. Direct cell penetration of the antifungal peptide, MMGP1, in *Candida albicans*. **J. Pept. Sci.**, v. 18, n. 11, p. 657–660, 2012.
- QU, X.; HARWIG, S. S. L.; SHAFER, W. M. Protegrin Structure and Activity Against *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 636–639, 1997.
- RAHMAN, M. S.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; YOO, J. C. Glycin-rich antimicrobial peptide YD1 from *B. amyloliquefaciens*, induced morphological alteration in and showed affinity for plasmid DNA of *E. coli*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- REICHERT, T.; REMUZGO, C.; ESPÓSITO, B. P.; MACHINI, M. T. **Shepherin Ia , an atypical antimicrobial peptide and a zinc / copper chelator.** SBQ Annual Reunion, World Chemistry Congress and International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), São Paulo, 2017.
- REMUZGO, C. **Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina.** 2009. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2009.
- REMUZGO, C.; ANDRADE, G. F. S.; TEMPERINI, M. L. A.; MIRANDA, M. T. M. Acanthoscurrin fragment 101-132: Total synthesis at 60°C of a novel difficult sequence. **Biopolymers**, v. 92, n. 1, p. 65–75, 2009.
- REMUZGO, C.; OEWEL, T. S.; DAFFRE, S.; LOPES, T. R. S.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TERESA MACHINI, M. Chemical synthesis, structure–activity relationship, and properties of shepherin I: a fungicidal peptide enriched in glycine-glycine-histidine motifs. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2573–2586, 2014.
- REVANKAR, S. G.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; FOTHERGILL, A. W.; REDDING, S. W.; RINALDI, M. G.; PATTERSON, T. F.; REVANKAR, S. G.; KIRKPATRICK, W. R.; ATEE, R. K. M. C. Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal Susceptibility Testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 153–156, 1998.
- REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance : evolution , mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, 2018.
- RIGOBELLO-MASINI, M.; PENTEADO, J. C. P.; LIRIA, C. W.; MIRANDA, M. T. M.; MASINI, J. C. Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography for fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae *Tetraselmis gracilis*. **Analytica Chimica Acta**, v. 628, n. 2, p. 123–132, 2008.
- RINGLI, C.; KELLER, B.; RYSER, U. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 10, p. 1430–1441, 2001.
- ROKITSKAYA, T. I.; KOLODKIN, N. I.; KOTOVA, E. A.; ANTONENKO, Y. N. Indolicidin action on membrane permeability: Carrier mechanism versus pore formation. **BBA**, v. 1808, n. 1, p. 91–97, 2011.

- ROOHANI, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R.; SCHULIN, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 144–157, 2013.
- RYDENGÅRD, V.; ANDERSSON NORDAHL, E.; SCHMIDTCHEN, A. Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*. **FEBS Journal**, v. 273, n. 11, p. 2399–2406, 2006.
- RYDENGÅRD, V.; OLSSON, A. K.; MÖRGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Histidine-rich glycoprotein exerts antibacterial activity. **FEBS Journal**, v. 274, n. 2, p. 377–389, 2007.
- SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L. O.; DE OLIVEIRA, D. E. Plant glycine-rich proteins: A family or just proteins with a common motif? **BBA**, v. 1492, n. 1, p. 1–14, 2000.
- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 379–385, 2002.
- SANKARARAMAKRISHNAN, R.; VERMA, S.; KUMAR, S. ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: Identification and characterization by crystal structure and sequence analysis. **Proteins**, v. 58, n. 1, p. 211–221, 2004.
- SANTINI, C.; PELLEI, M.; GANDIN, V.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; MARZANO, C.; SEZ, T.; CAMERINO, U.; AGOSTINO, S.; PADOVA, U. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chem Rev.**, v. 114, n. 1, p. 815–62, 2014.
- SAPALA, A. R.; DHAWAN, S.; HARIDAS, V. RSC Advances Vesicles : self-assembly beyond biological lipids. **RSC Advances**, v. 7, p. 26608–26624, 2017.
- SATYANARAYANA, J.; SITU, H.; NARASIMHAMURTHY, S.; BHAYANI, N.; BOBEK, L. A.; LEVINE, M. J. Divergent solid-phase synthesis and candidacidal N-terminal domain of human salivary mucin MUC7. **The Journal of Peptide Research**, v. 56, p. 275–282, 2000.
- SCHMIDT, S.; REINECKE, A.; WOJCIK, F.; PUSSAK, D.; HARTMANN, L.; HARRINGTON, M. J. Metal-mediated molecular self-healing in histidine-rich mussel peptides. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 5, p. 1644–1652, 2014.
- SHAHMIRI, M.; ENCISO, M.; ADDA, C. G.; SMITH, B. J.; PERUGINI, M. A.; MECHLER, A. Membrane Core-Specific Antimicrobial Action of Cathelicidin LL-37 Peptide Switches between Pore and Nanofibre Formation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.
- SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. **J. Chem. Theory Comput**, v. 10, n. 10, p. 4745–4758, 2014.
- SHIN, S. Y.; YANG, S. T.; PARK, E. J.; EOM, S. H.; SONG, W. K.; KIM, J. II; KIM, Y.; HAHM, K. S. Salt resistance and synergistic effect with vancomycin of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide P18. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 290, n. 1, p. 558–562, 2002.
- SHIRAIISHI, T.; BENDIFALLAH, N.; NIELSEN, P. E. Cellular delivery of polyheteroaromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 189–194, 2006.
- SILVA, F. A. de A.; TRAJANO, L. P. B.; NOGUEIRA, N. C.; SOUSA, K. S. de; COELHO, M. L.; NUNES, M. do R. C. M. Analysis of Consumption and Cost of Antifungal in a University Hospital. **JCS HU-UFPI**, v. 1, n. 1, p. 61–68, 2018.
- SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C. P.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 50, p. 34735–34746, 2009.
- SIMÕES, S.; SLEPUSHKIN, V.; GASPAR, R.; DE LIMA, M. C.; DÜZGÜNEŞ, N. Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. **Gene therapy**, v. 5, n. 7, p. 955–964, 1998.
- SINHA, M.; KAUSHIK, S.; KAUR, P.; SHARMA, S.; SINGH, T. P. Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. **International Journal of Peptides**, v. 2013, 2013.
- SITU, H.; WEI, G.; SMITH, C. J.; MASHHOON, S.; BOBEK, L. Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. **Biochem J.**, v. 375, p. 175–82, 2003.
- SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. The Role of Resistance in Candida Infections: Epidemiology and Treatment. In: MAYERS, D.; SOBEL, J.; OUELLETTE, M.; KAYE, K.; MARCHAIM, D. **Antimicrobial Drug Resistance**. 2. ed. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 1075–1097.
- SOHNLE, P. G.; HUNTER, M. J.; HAHN, B.; CHAZIN, W. J. Zinc-Reversible Antimicrobial Activity of

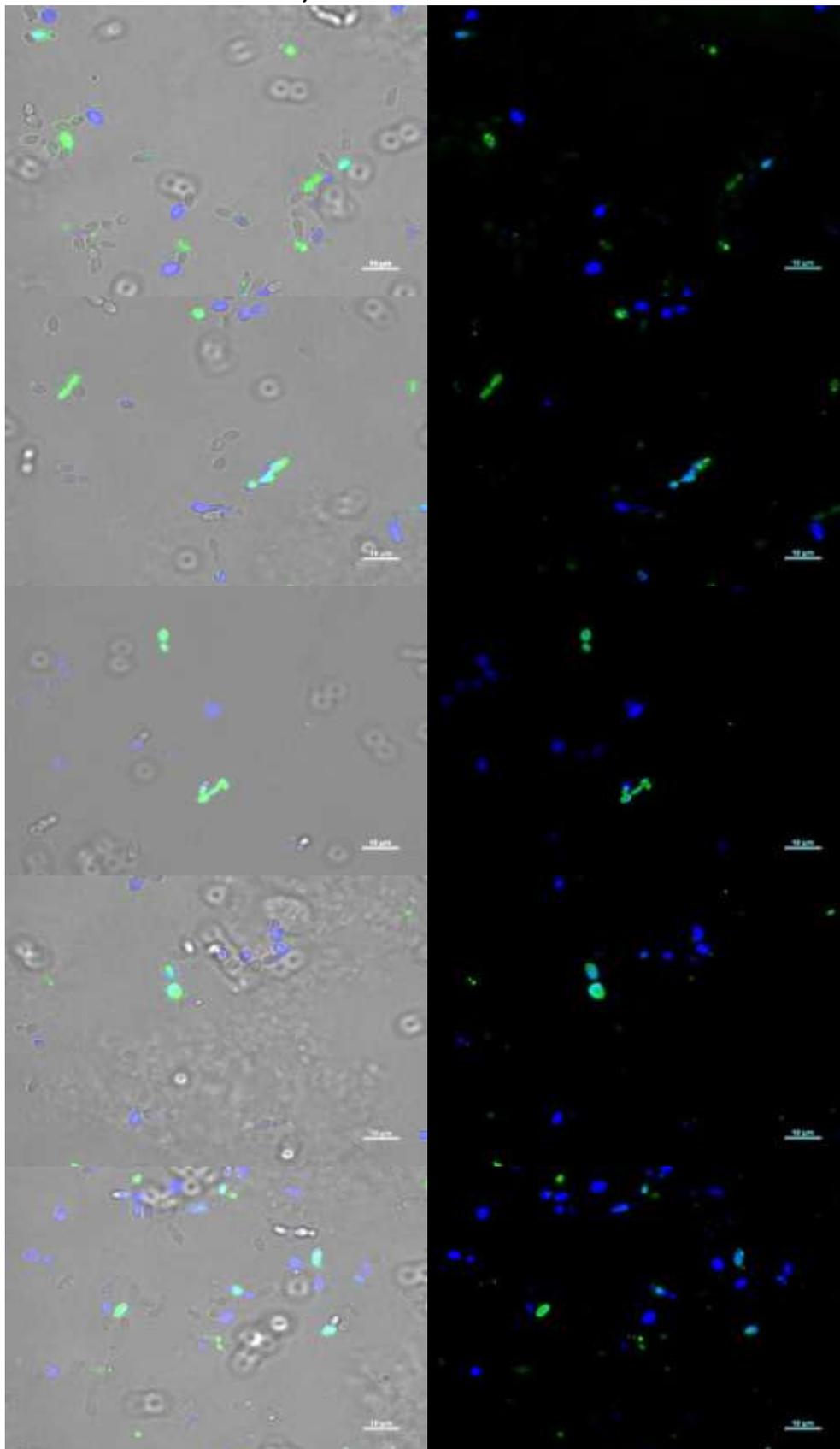
- Recombinant Calprotectin (Migration Inhibitory Factor–Related Proteins 8 and 14). **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 4, p. 1272–1275, 2000.
- SOLDINI, S.; POSTERARO, B.; VELLA, A.; DE CAROLIS, E.; BORGHI, E.; FALLENI, M.; LOSITO, A. R.; MAIURO, G.; TRECARCHI, E. M.; SANGUINETTI, M.; TUMBARELLO, M. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates associated with fungaemia and their impact on mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 7, p. 771–777, 2018.
- SOUZA, M. P.; TAVARES, M. F. M.; MIRANDA, M. T. M. Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures. **Tetrahedron**, v. 60, n. 21, p. 4671–4681, 2004.
- SPERSTAD, S. V.; HAUG, T.; VASSKOG, T.; STENSVÅG, K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 13, p. 2604–2612, 2009.
- SPINDLER, E. C.; HALE, J. D. F.; GIDDINGS, T. H.; HANCOCK, R. E. W.; GILL, R. T. Deciphering the mode of action of the synthetic antimicrobial peptide Bac8c. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1706–1716, 2011.
- STORMS, R.; STROMINGER, J. L. Complex isoprenyl formation between pyrophosphates bacitracin peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 11, p. 3940–3945, 1973.
- STROLLO, S.; LIONAKIS, M. S.; ADJEMIAN, J.; STEINER, C. A.; PREVOTS, D. R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 7–13, 2016.
- SUBBALAKSHMI, C.; SITARAN, N. Mechanism of Antimicrobial Action of Indolicin. **Microbiology letters.**, v. 160, n. 1, p. 91–96, 1998.
- SUN, E.; BELANGER, C. R.; HANEY, E. F.; HANCOCK, R. E. W. Host defense (antimicrobial) peptides. In: KOUTSOPOULOS, S. **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. 1. ed. Duxford, UK: Elsevier Ltd, 2017. p. 253–285.
- SUN, Y.; SUN, T. L.; HUANG, H. W. Mode of Action of Antimicrobial Peptides on *E. coli* Spheroplasts. **Biophys. J**, v. 111, n. 1, p. 132–139, 2016.
- SUNG, W. S.; PARK, S. H.; LEE, D. G. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of Urechistachykinins, neuropeptides derived from *Urechis unicinctus*. **FEBS Letters**, v. 582, n. 16, p. 2463–2466, 2008.
- SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A.; IVANOVA, A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–579, 2014.
- SWIDERGALL, M.; ERNST, J. F. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 8, p. 950–957, 2014.
- SZENT-GYÖRGYI, A. G. Calcium regulation of muscle contraction. **Biophys. J**, v. 15, n. 7, p. 707–723, 1975.
- TANAKA, D.; MIYASAKI, K. T.; LEHRER, R. I. Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: A cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, n. 4, p. 226–231, 2000.
- TER-AVETISYAN, G.; TU, G.; NOWAK, D.; NITSCHKE, M.; HERRMANN, A.; DRAB, M.; CARDOSO, M. C. Cell Entry of Arginine-rich Peptides Is Independent. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 6, p. 3370–3378, 2009.
- THÉVENET, P.; SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; GUYON, F.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. PEP-FOLD: An updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 288–293, 2012.
- TOKUDA, E.; FURUKAWA, Y. Copper homeostasis as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 1–14, 2016.
- TONICK, S.; MUNEYYIRCI-DELALE, O. Magnesium in Women's Health and Gynecology. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 5, p. 325–333, 2016.
- TORCATO, I. M.; CASTANHO, M. A. R. B.; HENRIQUES, S. T. The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. **Spectroscopy: An International Journal**, v. 27, n. 5, p. 541–549, 2012.
- TORCHILIN, V. P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, n. 4–5, p. 548–558, 2008.
- TRABULO, S.; CARDOSO, A. L.; MANO, M.; DE LIMA, M. C. P. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 4, p. 961–993, 2010.
- TRAVIS, S. M.; ANDERSON, N. N.; FORSYTH, W. R.; ESPIRITU, C.; CONWAY, B. D.; GREENBERG, E. P.; PAUL, B.; JR, M.; LEHRER, R. I.; WELSH, M. J.; BRIAN, F.; TRAVIS, S. U. E. M.; CRAY, P. B. M. C. Bactericidal

- Activity of Mammalian Cathelicidin-Derived Peptides. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2748–2755, 2000.
- TREWILLIGER, T. C.; EISENBERG, D. The structure of melittin. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 11, p. 6016–6022, 1981.
- TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. Candida parapsilosis: An emerging fungal pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.
- TSENG, Y.-L.; LIU, J.-J.; HONG, R.-L. Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. **Molecular pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 864–72, 2002.
- TURNER, J. J.; IVANOVA, G. D.; VERBEURE, B.; WILLIAMS, D.; ARZUMANOV, A. A.; ABES, S.; LEBLEU, B.; GAIT, M. J. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 21, p. 6837–6849, 2005.
- TURNER, J. J.; JONES, S.; FABANI, M. M.; IVANOVA, G.; ARZUMANOV, A. A.; GAIT, M. J. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 38, n. 1, p. 1–7, 2007.
- UPPULURI, P.; KHAN, A.; EDWARDS, J. E. Candida albicans: Cellular and Molecular Biology. In: PRASAD, R. **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology**. 2. ed. Berlin: Springer International Publishing, 2017. p. 5–23.
- URBÁN, E.; NAGY, E.; PÁL, T.; SONNEVEND, Á.; CONLON, J. M. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 3, p. 317–321, 2007.
- VALERIA, A. R. G. The importance of magnesium in cardiovascular disease. **International Journal of Nutrology**, v. 9, n. 4, p. 242–253, 2016.
- VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Microbiology**, v. 2012, p. 1–26, 2012.
- VARANDA, L. M.; MIRANDA, M. T. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for and optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. **The Journal of Peptide Research**, v. 50, n. 2, p. 102–108, 1997.
- VELDHOEN, S.; LAUFER, S. D.; RESTLE, T. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1276–1320, 2008.
- VERDON, J.; COUTOS-THEVENOT, P.; RODIER, M. H.; LANDON, C.; DEPAYRAS, S.; NOEL, C.; LA CAMERA, S.; MOUMEN, B.; GREVE, P.; BOUCHON, D.; BERJEAUD, J. M.; BRAQUART-VARNIER, C. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean Armadillidium vulgare, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–15, 2016.
- WALKENHORST, W. F.; KLEIN, J. W.; VO, P.; WIMLEY, W. C. PH dependence of microbe sterilization by cationic antimicrobial peptides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 57, n. 7, p. 3312–3320, 2013.
- WALKENHORST, W. F.; SUNDRUD, J. N.; LAVIOLETTE, J. M. Additivity and synergy between an antimicrobial peptide and inhibitory ions. **BBA**, v. 1838, n. 9, p. 2234–2242, 2014.
- WANG, G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. **Pharmaceuticals**, v. 7, p. 545–594, 2014.
- WANG, G.; MISHRA, B.; LAU, K.; LUSHNIKOVA, T.; GOLLA, R.; WANG, X. Antimicrobial Peptides in 2014. **Pharmaceuticals**, v. 8, p. 123–150, 2015a.
- WANG, K.; DANG, W.; XIE, J.; ZHU, R.; SUN, M.; JIA, F.; ZHAO, Y.; AN, X.; QIU, S.; LI, X.; MA, Z.; YAN, W.; WANG, R. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. **BBA**, v. 1848, n. 10, p. 2365–2373, 2015b.
- WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infect Dis Clin N Am**, v. 30, p. 313–322, 2016.
- WEHBE, M.; LEUNG, A. W. Y.; ABRAMS, M. J.; ORVIG, C. A Perspective – can copper complexes be developed as a novel class of therapeutics ? **Dalton Trans.**, v. 46, n. 33, p. 10758–73, 2017.
- WEI, G.-X.; CAMPAGNA, A. N.; BOBEK, L. A. Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, p. 1–3, 2007.
- WHEELER, D. S.; DUNSMORE, K. E.; WONG, H. R. Intracellular delivery of HSP70 using HIV-1 Tat protein

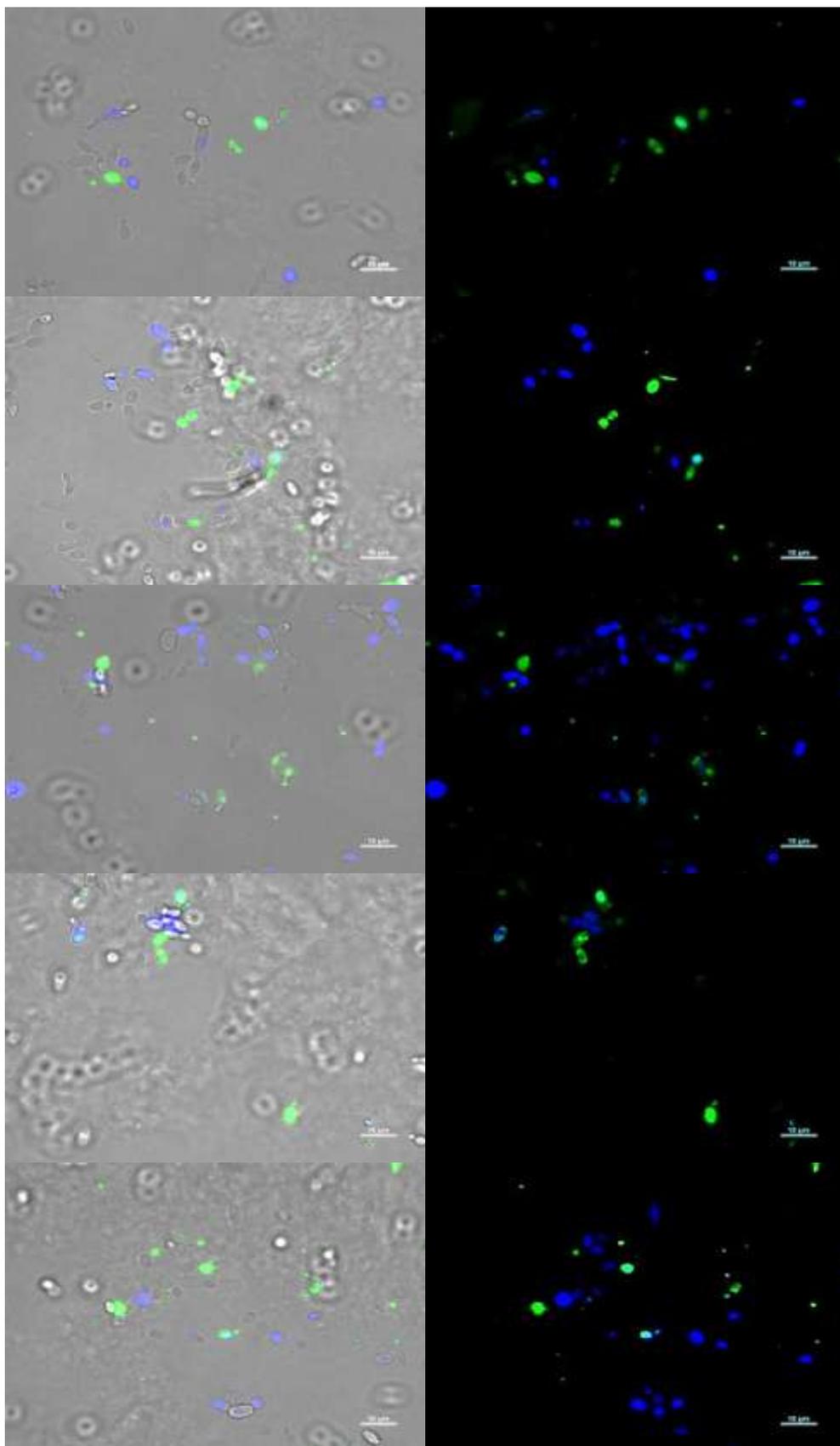
- transduction domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 301, n. 1, p. 54–59, 2003.
- WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–553, 2007.
- WILLE, M. P.; GUIMARÃES, T.; HENRIQUE, G.; FURTADO, C.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia : analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. v. 108, n. 3, p. 288–292, 2013.
- WHO. **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance**. Geneva: Who Press, 2014.
- WU, M.; MAIER, E.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7235–7242, 1999.
- XU, Y.; LIANG, W.; QIU, Y.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F.; MASON, A. J.; LAM, J. K. W. Incorporation of a nuclear localization signal in pH responsive LAH4-L1 peptide enhances transfection and nuclear uptake of plasmid DNA. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 3141–52, 2016.
- YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. **Biophys. J**, v. 81, n. 3, p. 1475–1485, 2001.
- YANG, M.; BIERBACH, U. Metal-Containing Pharmacophores in Molecularly Targeted Anticancer Therapies and Diagnostics. **Eur J Inorg Chem.**, v. 2017, n. 12, p. 1561–1572, 2017.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014.
- YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.
- YU, Z.; COWAN, J. A. Catalytic Metallodrugs : Substrate-Selective Metal Catalysts as Therapeutics. **Chem Eur.**, v. 23, n. 57, p. 14113–14127, 2017.
- ZARO, J. L.; SHEN, W. C. Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 307, n. 2, p. 241–247, 2003.
- ZENG, Y. Procambarin: A glycine-rich peptide found in the haemocytes of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and its response to white spot syndrome virus challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 407–412, 2013.
- ZHANG, C.; TANG, N.; LIU, X. J.; LIANG, W.; XU, W.; TORCHILIN, V. P. siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. **J. Control. Release**, v. 112, n. 2, p. 229–239, 2006.
- ZHANG, D.; WANG, J.; XU, D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. **J. Control. Release**, v. 229, n. 2016, p. 130–139, 2016.
- ZHANG, M.; ZHAO, J.; ZHENG, J. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. **Soft Matter**, v. 10, p. 7425–7451, 2014.

## 7. Apêndices

Apêndice A - Células fixadas com 0,5 MIC na ausência de íons  $Zn^{2+}$

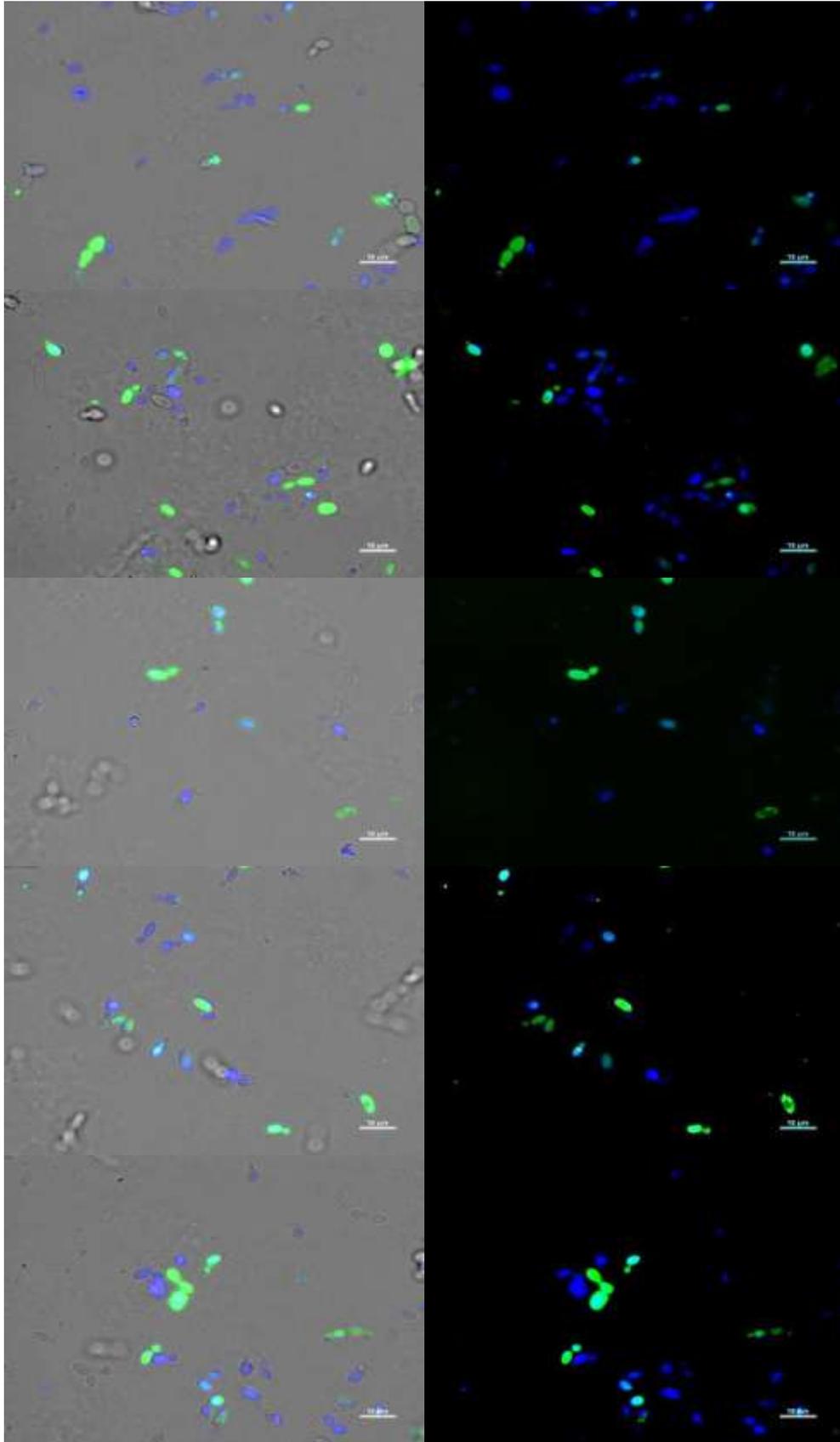


*Continua...*

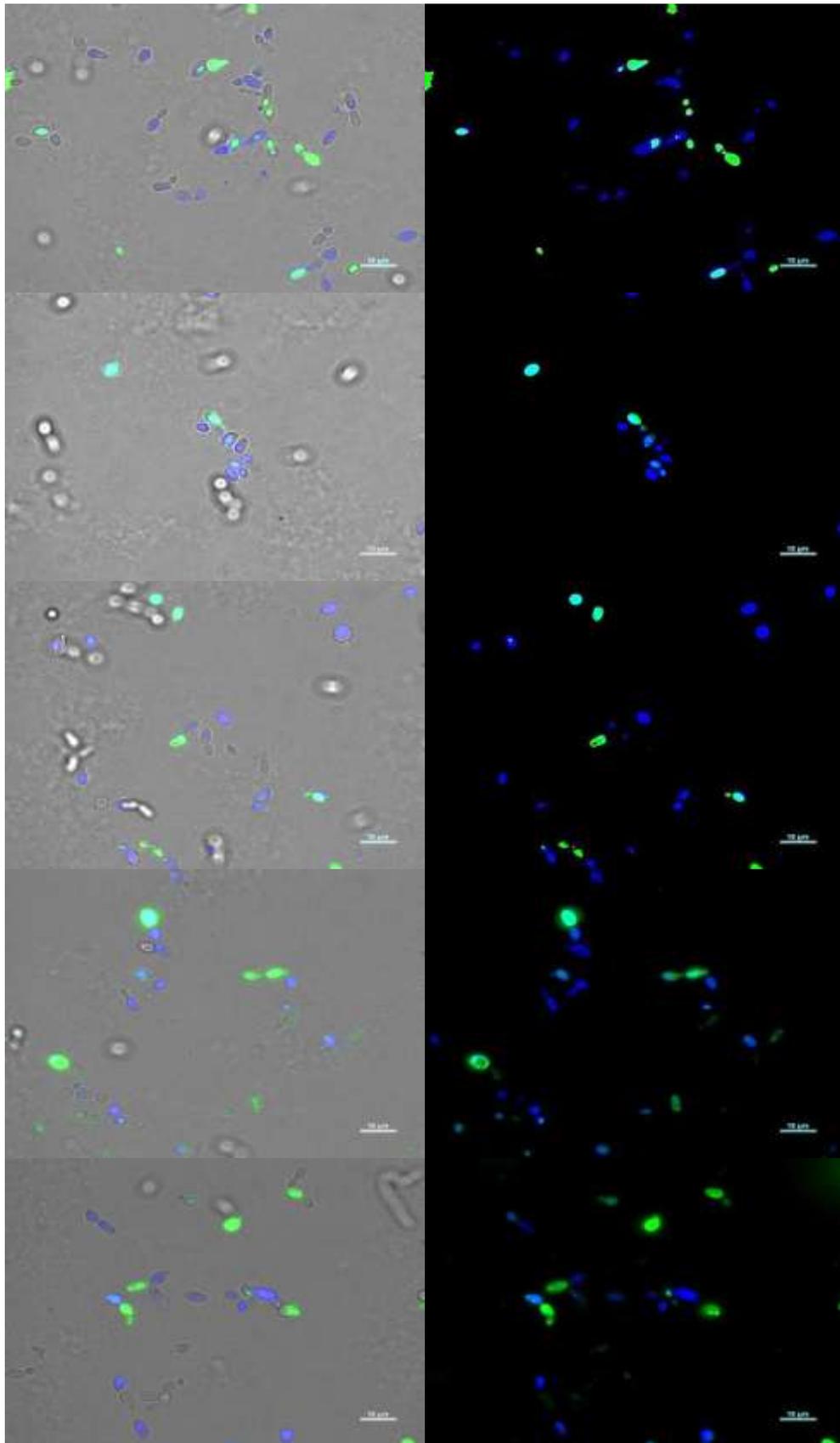


**Apêndice A.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef Ia* (verde/ $0,5 \text{MIC}: 6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **à esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à dir.** sobreposição dos canais azul e verde. *Barra inferior direita:*  $10\mu\text{m}$ . *Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J®.*

Apêndice B - Células fixadas com 1 MIC na ausência de íons  $Zn^{2+}$

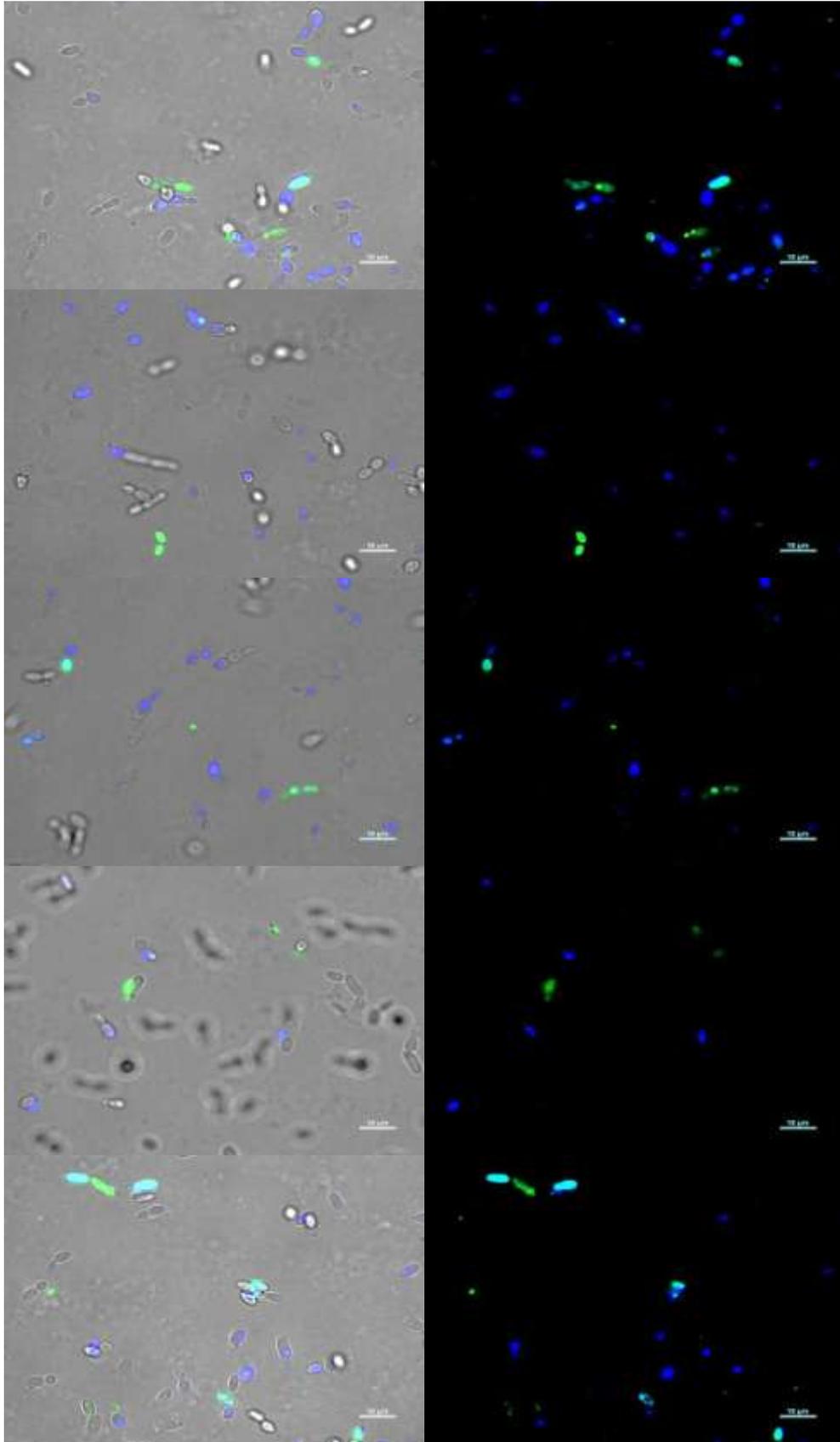


*Continua...*

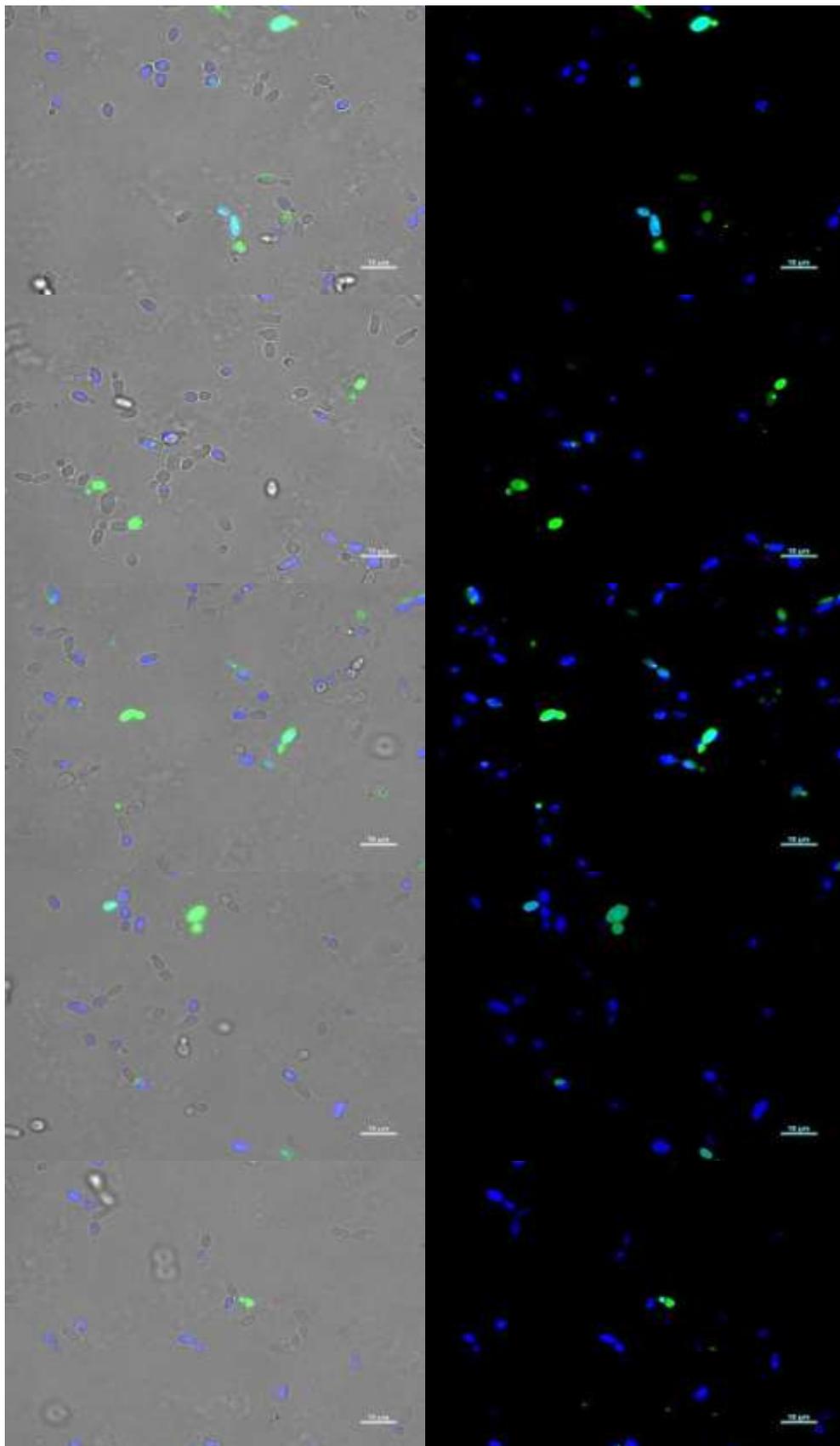


**Apêndice B.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef 1a* (verde/ $1 \text{ MIC}: 12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **à esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à dir.** sobreposição dos canais azul e verde. *Barra inferior direita:*  $10\mu\text{m}$ . *Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J®.*

Apêndice C - Células fixadas com 0,5 MIC na presença de íons  $Zn^{2+}$

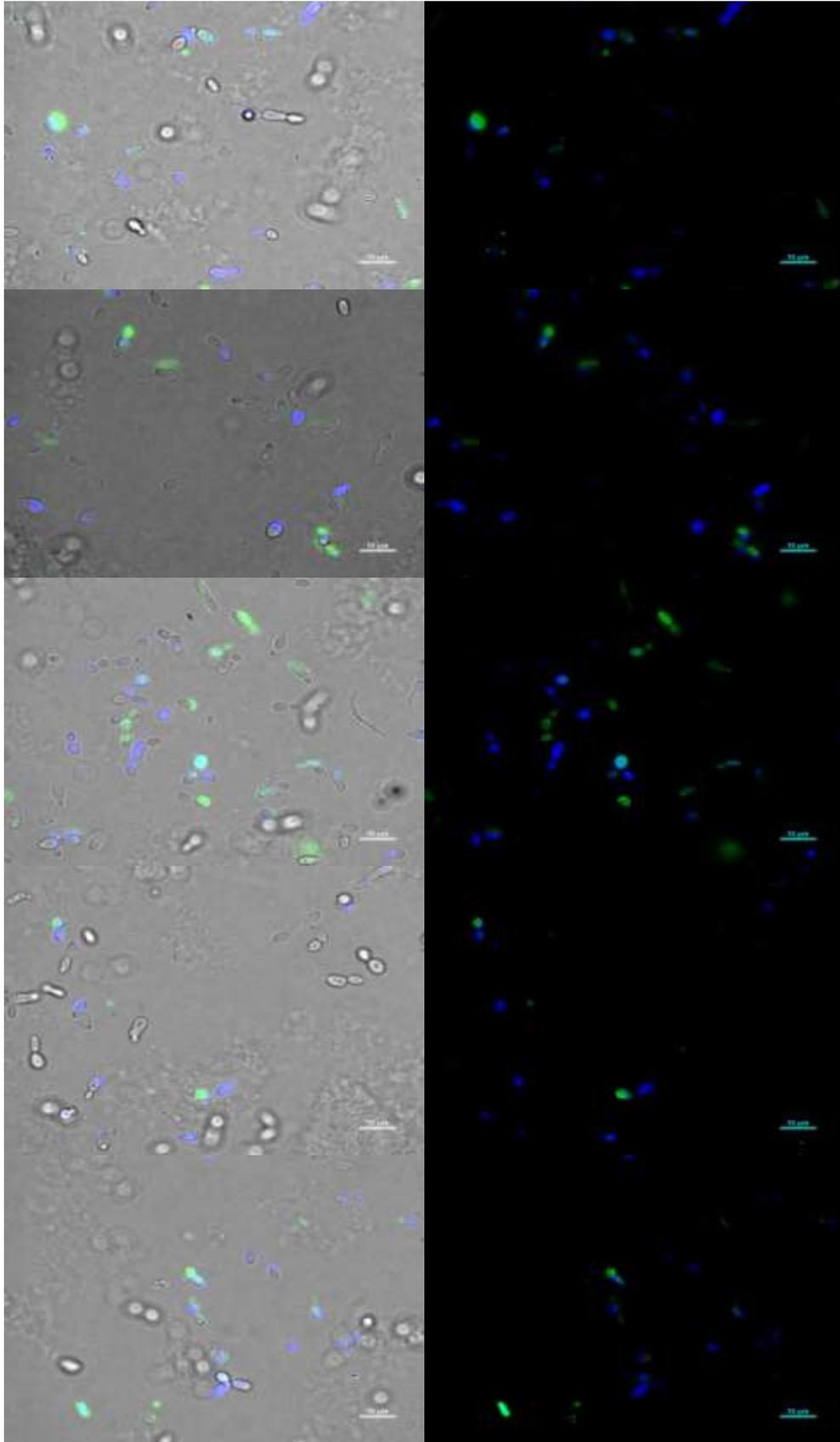


*Continua...*

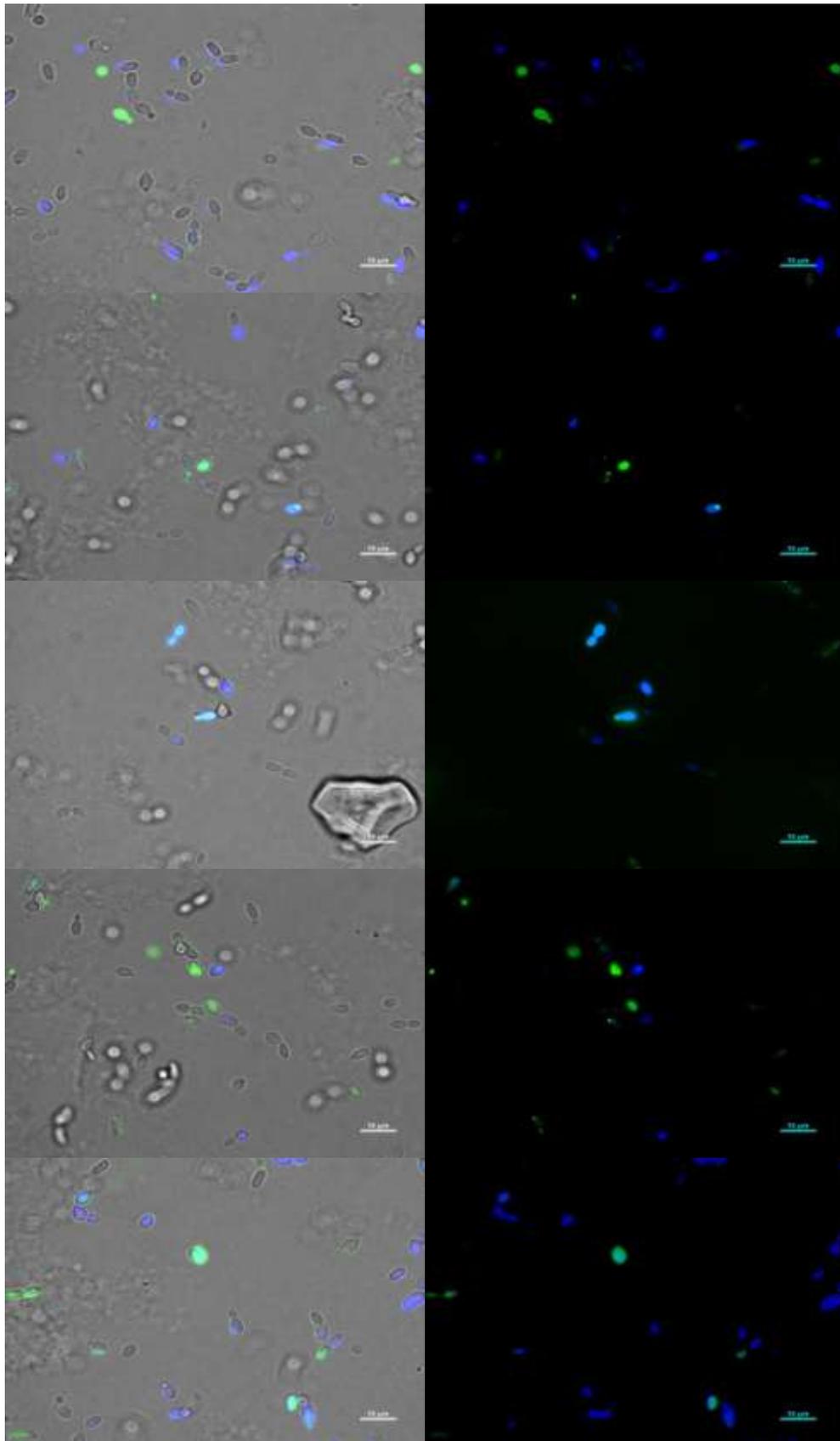


**Apêndice C.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef Ia* (verde/ $0,5 \text{ MIC}: 6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **na presença de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$**  à **esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; à **dir.** sobreposição dos canais azul e verde. Barra inferior direita:  $10\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J®.

Apêndice D - Células fixadas com 1 MIC na presença de íons  $Zn^{2+}$

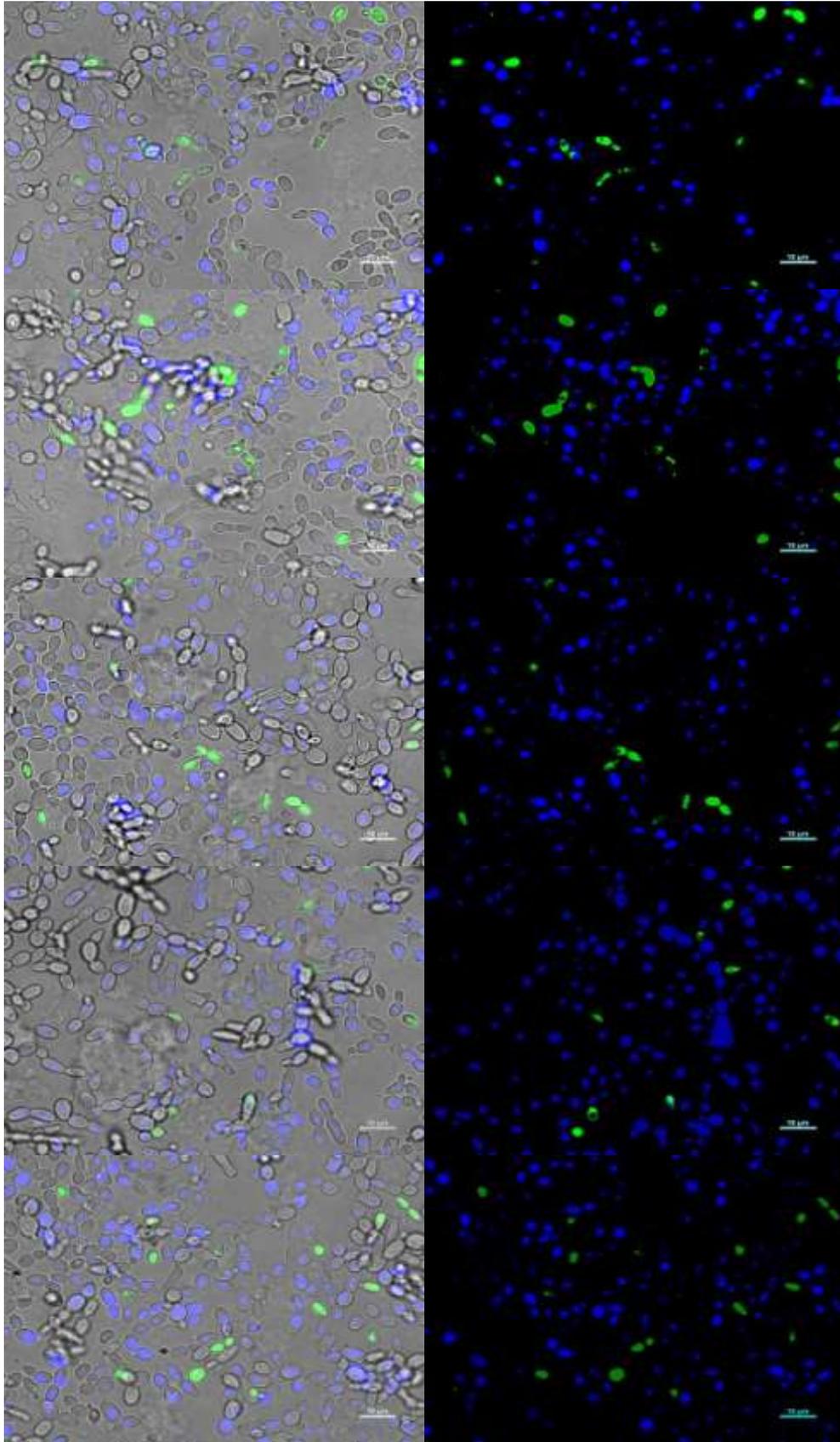


*Continua...*

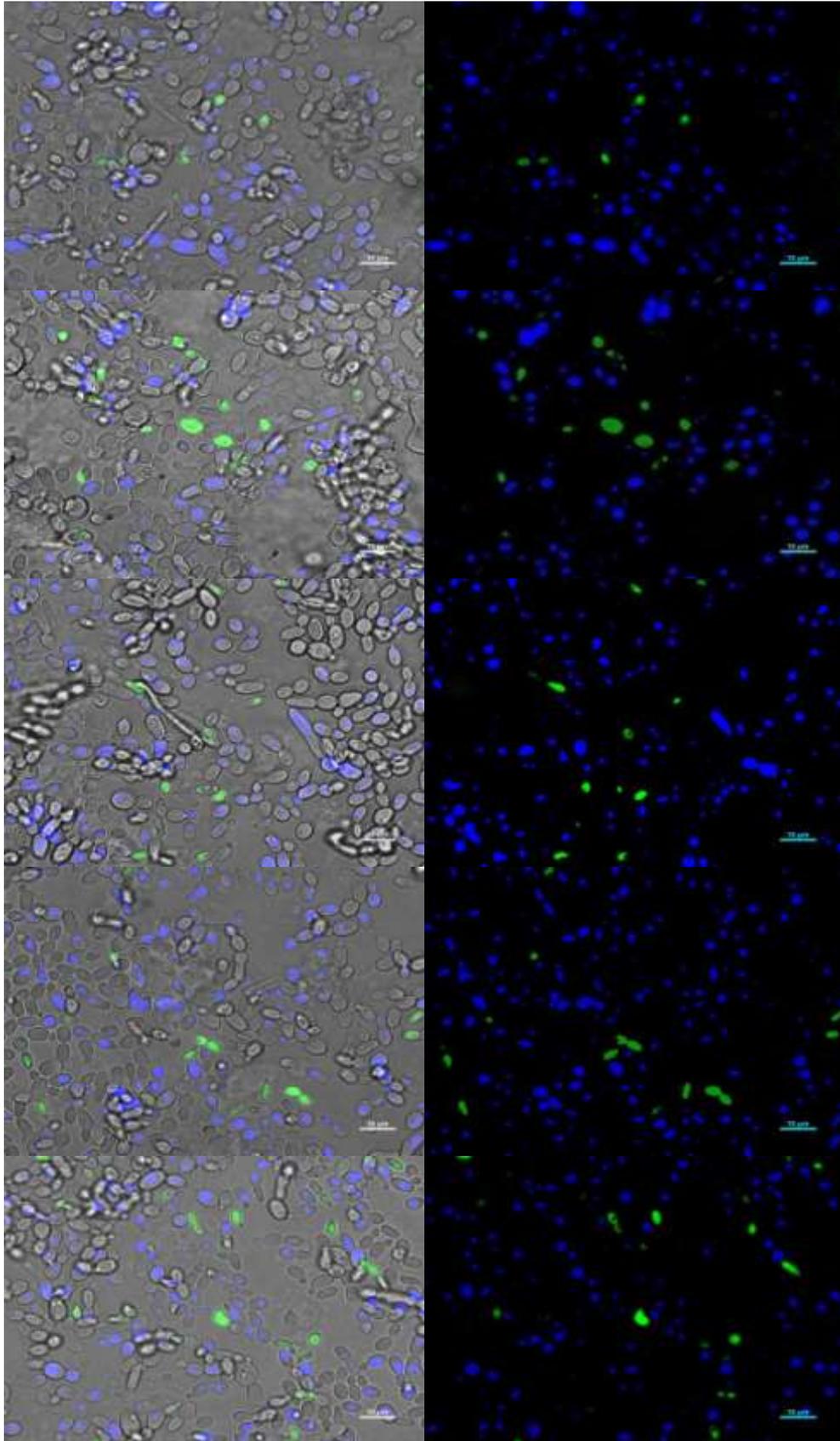


**Apêndice D.** Células fixadas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef Ia* (verde/ $1 \text{ MIC}: 12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **na presença de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$**  à **esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; à **dir.** sobreposição dos canais azul e verde. Barra inferior direita:  $10\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J®.

Apêndice E - Células vivas com 1 MIC na ausência de íons  $Zn^{2+}$

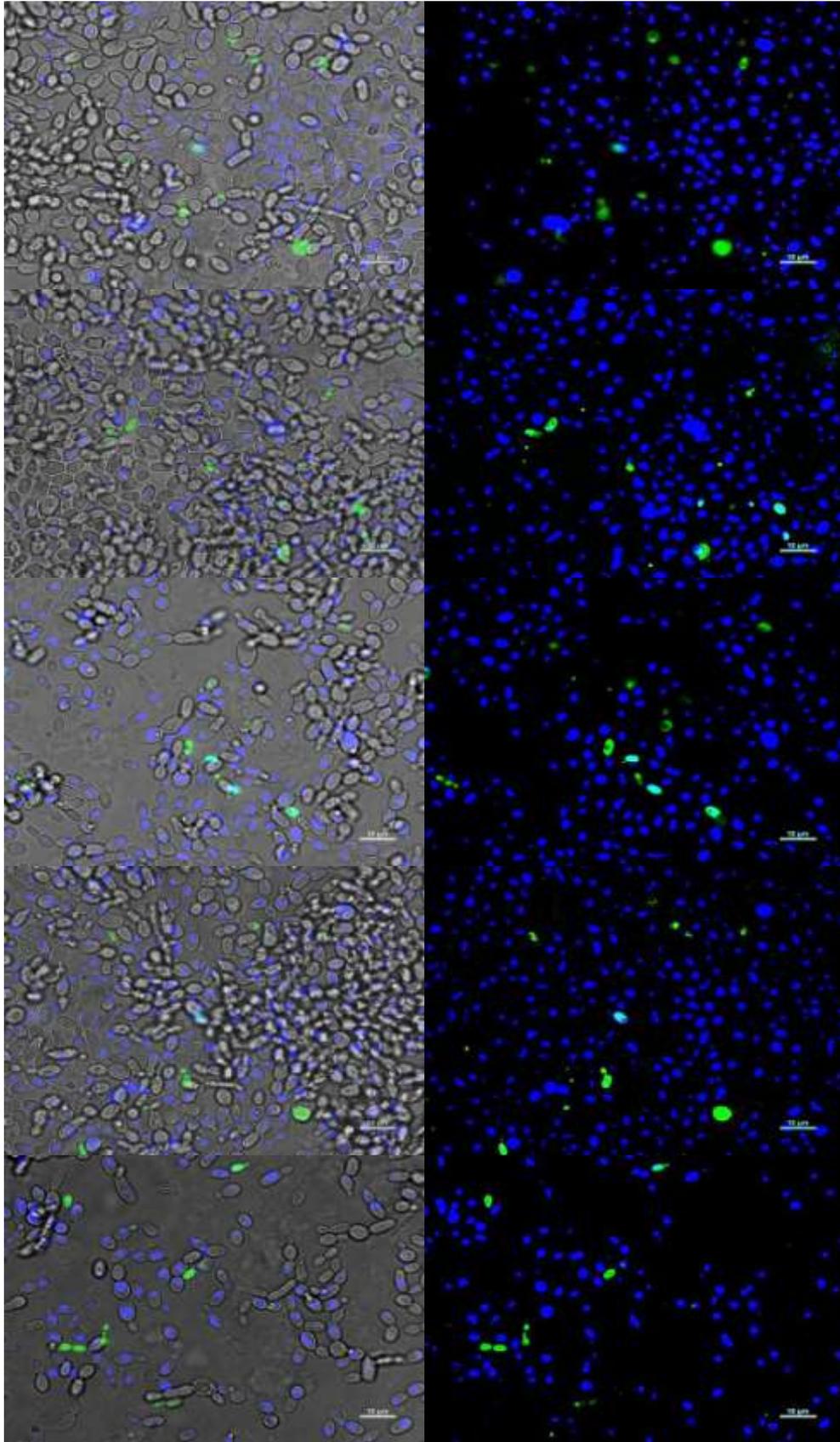


*Continua...*

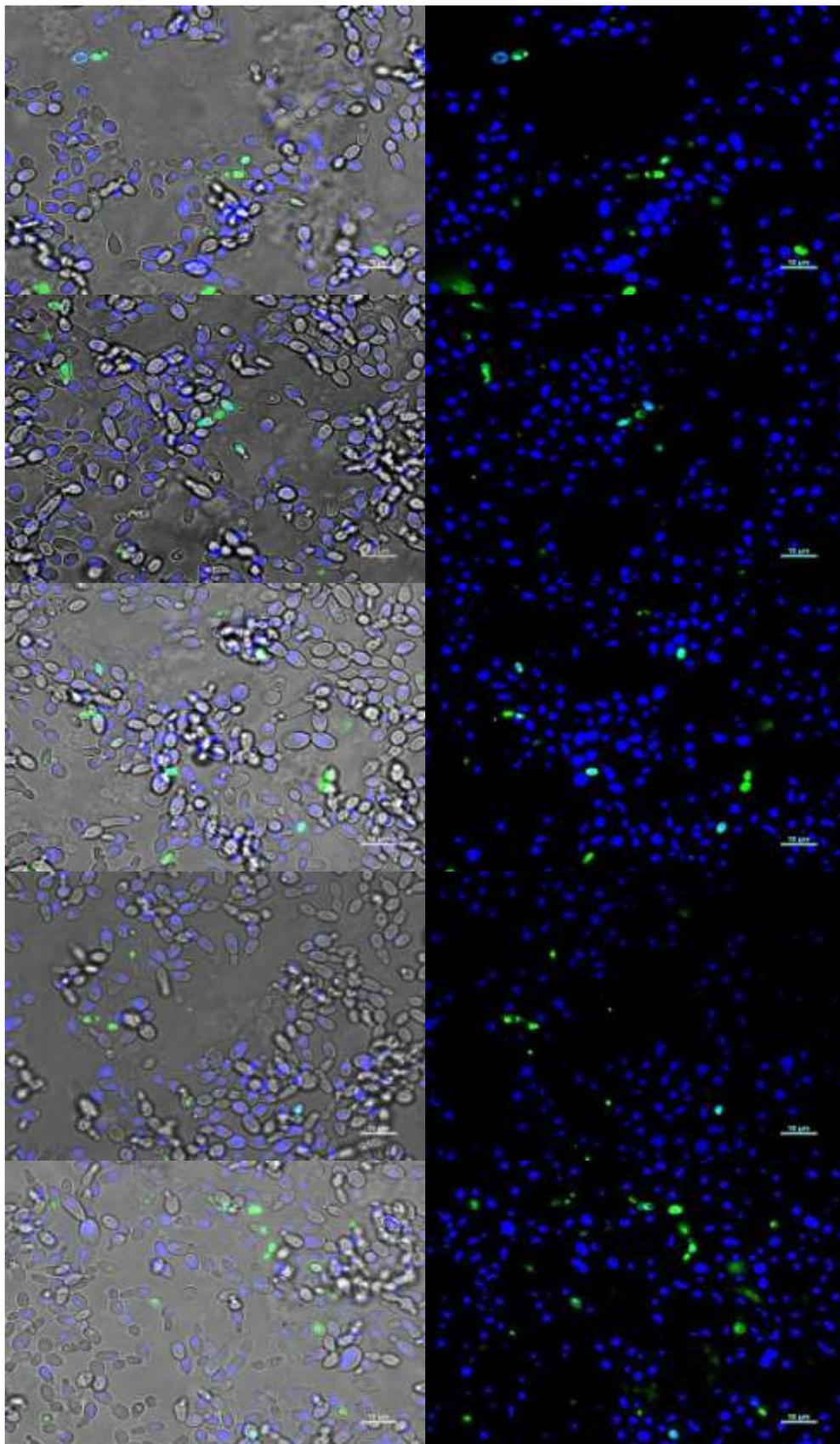


**Apêndice E.** Células vivas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado *FAM-Chef 1a* (verde/ $1 \text{ MIC}: 12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **à esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; **à dir.** sobreposição dos canais azul e verde. *Barra inferior direita:  $10 \mu\text{m}$ .* *Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J<sup>®</sup>.*

Apêndice F - Células vivas com 1 MIC na presença de íons  $Zn^{2+}$



*Continua...*



**Apêndice F.** Células vivas de *C. parapsilosis* após incubação de marcador de vacúolo celular CMAC-Blue (azul/ $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com o peptídeo marcado FAM-Chef 1a (verde/ $1 \text{ MIC}: 12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) **na presença de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$**  à **esq.** sobreposição dos canais cinza, azul e verde; à **dir.** sobreposição dos canais azul e verde. Barra inferior direita:  $10\mu\text{m}$ . Imagens obtidas através do programa Fiji - Image J<sup>®</sup>.

**Apêndice G** - Relação dos valores de células azuis (A), verdes (V), não coradas (S), azuis pertencentes a verde/colocalização azul e verde (AeV) e seus totais.

<b>Células fixadas</b>					
<b>Sem Zn<sup>2+</sup></b>					
<b>0,5 MIC</b>					
<b>Campos</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>AeV</b>	<b>Total</b>
I	32	11	28	1	<b>72</b>
II	24	9	37	4	<b>74</b>
III	10	4	10	2	<b>26</b>
IV	14	5	5	2	<b>26</b>
V	10	9	31	1	<b>51</b>
VI	11	7	17	2	<b>37</b>
VII	9	7	22	3	<b>41</b>
VIII	17	10	24	1	<b>52</b>
IX	5	7	19	1	<b>32</b>
X	4	9	9	1	<b>23</b>
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>78</b>	<b>202</b>	<b>18</b>	<b>434</b>
<b>1 MIC</b>					
<b>Campos</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>AeV</b>	<b>Total</b>
I	8	16	2	4	<b>30</b>
II	11	9	9	5	<b>34</b>
III	29	11	27	6	<b>73</b>
IV	25	7	10	5	<b>47</b>
V	22	11	15	6	<b>54</b>
VI	19	7	11	5	<b>42</b>
VII	15	10	9	5	<b>39</b>
VIII	10	6	0	5	<b>21</b>
IX	22	13	15	6	<b>56</b>
X	12	11	10	1	<b>34</b>
<b>Total</b>	<b>173</b>	<b>101</b>	<b>108</b>	<b>48</b>	<b>430</b>
<b>Com 10 µmol.L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup></b>					
<b>0,5 MIC</b>					
<b>Campos</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>AeV</b>	<b>Total</b>
I	5	4	11	0	<b>20</b>
II	11	4	12	2	<b>29</b>
III	12	3	31	1	<b>47</b>
IV	18	8	19	7	<b>52</b>
V	11	7	19	5	<b>42</b>
VI	17	5	19	5	<b>46</b>
VII	31	10	20	6	<b>67</b>
VIII	13	6	29	0	<b>48</b>
IX	14	9	17	4	<b>44</b>
X	16	1	16	1	<b>34</b>
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>57</b>	<b>193</b>	<b>31</b>	<b>429</b>
<b>1 MIC</b>					
<b>Campos</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>AeV</b>	<b>Total</b>
					<i>Continua...</i>

I	10	3	15	2	<b>30</b>
II	15	16	19	3	<b>53</b>
III	18	7	11	6	<b>42</b>
IV	14	4	6	3	<b>27</b>
V	13	5	4	3	<b>25</b>
VI	5	8	13	1	<b>27</b>
VII	8	8	13	5	<b>34</b>
VIII	5	4	9	1	<b>19</b>
IX	16	5	16	0	<b>37</b>
X	23	4	10	3	<b>40</b>
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>64</b>	<b>116</b>	<b>27</b>	<b>334</b>

**Células vivas**

**Sem Zn<sup>2+</sup>**

**1 MIC**

Campos	A	V	S	AeV	Total
I	82	15	44	0	<b>141</b>
II	86	11	51	0	<b>148</b>
III	59	9	65	0	<b>133</b>
IV	102	19	42	0	<b>163</b>
V	55	17	58	0	<b>130</b>
VI	66	19	63	0	<b>148</b>
VII	80	19	54	0	<b>153</b>
VIII	81	25	69	0	<b>175</b>
IX	73	6	42	1	<b>122</b>
X	76	15	61	0	<b>152</b>
<b>Total</b>	<b>760</b>	<b>155</b>	<b>549</b>	<b>1</b>	<b>1465</b>

**Com 10 µmol.L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup>**

**1 MIC**

Campos	A	V	S	AeV	Total
I	110	9	34	4	<b>157</b>
II	80	7	10	2	<b>99</b>
III	79	11	26	1	<b>117</b>
IV	93	10	55	3	<b>161</b>
V	154	12	61	3	<b>230</b>
VI	85	13	116	1	<b>215</b>
VII	131	9	72	3	<b>215</b>
VIII	77	10	33	5	<b>125</b>
IX	56	16	34	3	<b>109</b>
X	73	6	30	1	<b>110</b>
<b>Total</b>	<b>938</b>	<b>103</b>	<b>471</b>	<b>26</b>	<b>1538</b>

## SÚMULA CURRICULAR

### • DADOS PESSOAIS

Nome: Thaís Reichert

Local e data de nascimento: São Paulo, 13 de maio de 1992.

E-mail: [thais.reichert@hotmail.com](mailto:thais.reichert@hotmail.com); [thais.reichert@usp.br](mailto:thais.reichert@usp.br)

### • EDUCAÇÃO

**1º e 2º grau:** Colégio Visconde de Porto Seguro, Unid. I, São Paulo, 1996-2009.

**Graduação:** Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) *Campus Diadema*, Diadema, 2011-2014.

### • ESTÁGIOS REALIZADOS

De 05/2013 -08/2013 e 10/2013 a 02/2014 como monitora de Bioestatística na UNIFESP *Campus Diadema*, sob orientação da Dra. Gleice Margarete de Souza Conceição.

De 08/2013-09/2014 no laboratório de Ecofisiologia e Monitoramento Ambiental da UNIFESP *Campus Diadema*, sob orientação da Dra. Cristina Souza Freire Nordi.

### • BOLSAS RECEBIDAS

– CNPq, 08/2013 a 07/2014 (Bolsa de Iniciação Científica)

– CNPq, 08/2015 a 09/2017 (Bolsa de Mestrado)

### • PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

– REICHERT, T.; REMUZGO, C.M.; MACHINI, M.T. *Cheferina Ia*: estudo da ação candidacida e da interação com íons metálicos divalentes. 2016. XI Congresso do Departamento de Bioquímica, São Paulo, SP, 20-21/10/16.

– REICHERT, T. *Cheferina Ia*: um peptídeo antifúngico atípico e a influência dos íons metálicos divalentes nas suas propriedades. 2017. Ciclo de Seminários de Pós Graduandos e Pós Doutores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. São Paulo, 24/05/17.

– REICHERT, T.; REMUZGO, C.M.; ESPÓSITO, B.P.; MACHINI, M.T. *Shepherin Ia, an Atypical Antimicrobial Peptide and a Zinc/Copper Chelator*. 2017. XL Reunião Anual da SBQ, XLVI World Chemistry Congress e XLIX IUPAC General Assembly, São Paulo, SP, 7-14/07/17.

– REICHERT, T.; REMUZGO, C.M.; ESPÓSITO, B.P.; MACHINI, M.T. *Anticandidal peptides zinc/copper chelators*. 2018. XLVII Reunião Anual SBBq, Joinville, SC, 26-29/05/18.