



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RICARDO DE MORAIS FEITOSA**

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME ISOLADA E COMBINADA DE  
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ANTIFÚNGICOS CONTRA *Candida albicans*  
e *C. krusei***

**FORTALEZA**  
**2023**

**Ricardo de Morais Feitosa**

ATIVIDADE ANTIBIOFILME ISOLADA E COMBINADA DE PEPTÍDEOS  
SINTÉTICOS E ANTIFÚNGICOS CONTRA *Candida albicans* e *C. krusei*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F336a Feitosa, Ricardo de Moraes.

Atividade antibiofilme isolada e combinada de peptídeos sintéticos e antifúngicos contra *Candida albicans* e *C. krusei* / Ricardo de Moraes Feitosa. – 2023.  
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.

1. Atividade antifúngica. 2. Biofilme. 3. Peptídeos antimicrobianos. 4. Sinergismo . 5. *Cândida*. I. Título.  
CDD 661

---

À minha família, amigos e orientador pelo  
suporte incondicional que me deram.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Francisco e Francisca pelo carinho, amor e apoio ao longo de todos os momentos difíceis, problemas de saúde e demais desafios enfrentados além todos os ensinamentos que vou levar para minha vida. Vocês são o grande amor da minha vida.

Aos meus irmãos Eduardo e Sisnando por estarem sempre por perto me dando apoio atenção e carinho.

Ao Machado, que tenho como irmão de outra mãe, meu grande companheiro que acompanhou toda a minha trajetória desde os 13 anos até hoje e que vai se manter por perto pro resto da minha vida.

Aos meus demais amigos, Caio, Daniel, Rafael, Benevides, Thales, Lima, Teixeira, Eric e Felipe por estarem sempre comigo.

Ao meu professor e orientador Cleverson Diniz por todas as orientações e por ser sempre solícito e por sua paciência e atenção.

Aos meus colegas de Laboratório, Nilton, Tawanny, Rayara, João Neto, Italo, Viviane e Thayná por terem me ajudado ao longo dessa trajetória

Aos meus colegas de faculdade Leonardo, João Pedro, Nilton, Victor Lucas, Clarissa, Gabriela, Lewi e Caio por todas as conversas e perrengues divididos ao longo das disciplinas

Ao CNPq, pelo fomento à pesquisa, incentivo e suporte financeiro para realização desta pesquisa. Aos demais órgãos de fomento pelo apoio concedido a este trabalho.

“Deus te proteja, lhe leve e lhe traga em paz”

(Francisca Feitosa)

## RESUMO

O gênero *Candida* é amplamente estudado e reconhecido pela organização mundial da saúde como de alto risco para humanidade. Devido ao crescente problema da resistência microbiana, geralmente causada pelo maluso de medicamentos e desenvolvimento de mecanismos de defesa microbianos, faz-se necessário a busca por alternativas de tratamento para doenças causadas por esses microorganismos. No presente trabalho, foi testado o potencial antibiofilme de 4 peptídeos antimicrobianos sintéticos isoladamente e em combinação com os antifúngicos comerciais Nistatina e Itraconazol. Os ensaios foram realizados em placas de polistireno de 96 poços nas quais tanto *Candida albicans* quanto *Candida krusei* foram inoculadas junto aos tratamentos e incubados por 48 horas a fim de verificar o potencial de inibição da formação do biofilme, bem como o de redução da biomassa do biofilme. Após o período de incubação, o biofilme foi isolado corado e quantificado com o auxílio de um leitor de microplacas a 590nm. Neste trabalho, Por fim, foi observado alta atividade (60% a 80%) de potencial de inibição de formação e redução de biomassa nos peptídeos isolados. Na combinação com antifúngicos foi observado uma pequena melhora de atividade ou não interatividade com o itraconazol. Já na combinação com a Nistatina foi observado um efeito antagônico, em que houve perda da atividade na combinação dos peptídeos com esse antifúngico.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica; Biofilme; Peptídeos antimicrobianos; Sinergismo  
Cândida

## ABSTRACT

The *Candida* genus is widely studied and was recently recognized by the World Health Organization as a high-risk pathogen for humans. Due to the rising problem of microbial resistance, which is generally caused by drug misuse and the development of defense mechanisms in the microbial cells, a search for new treatment alternatives for diseases caused by these microorganisms. In the present issue, the antibiofilm potential of 4 synthetic antimicrobial peptides was tested, both alone and combined with the commercial drugs Nystatin and Itraconazole. The essays were conducted in 96 well polystyrene plates in which *Candida albicans* and *Candida krusei* were inoculated with the treatments and incubated for 48 hours to verify the inhibition of biofilm formation and the reduction of biofilm biomass. After the incubation phase, the biofilm was isolated, dyed and quantified using a microplate reader at 590nm. In this issue, was found a high activity (60% to 80%) both in inhibition of biofilm formation and reduction of biofilm biomass alongside all peptides. The combination with itraconazole showed a non interaction or minor increase in activity while the combination with Nystatin showed an antagonist effect, in which was observed a loss in activity when combining the peptides with this antifungal.

**Keywords:** Antimicrobial Peptides; biofilm; *Candida*; synergism; Synergism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fungos patogênicos classificados por fator de risco	11
Figura 2 - Processo de formação do biofilme	14
Figura 3 - Modos de ação dos PAMs	18
Figura 4 - Atividade isolada dos peptídeos contra a formação de biofilme em <i>C. albicans</i>	23
Figura 5 - Atividade isolada de Nistatina e Itraconazol contra a formação de biofilme em <i>C albicans</i>	24
Figura 6 - Atividade combinada inibitória de Nistatina e os peptídeos contra biofilme de <i>C. albicans</i>	24
Figura 7 - Atividade inibitória combinada de Nistatina e os peptídeos contra biofilme de <i>C. albicans</i>	25
Figura 8 - Atividade isolada dos peptídeos para redução da biomassa do biofilme de <i>C. albican.</i>	26
Figura 9 - Atividade redutora isolada de Nistatina e Itraconazol contra biofilme de <i>C. Albicans.</i>	27
Figura 10 - Atividade redutora combinada de Nistatina com os peptídeos contra biofilme de <i>C albicans.</i>	28
Figura 11 - Atividade redutora combinada de Nistatina com os peptídeos contra biofilme de <i>C albicans.</i>	28
Figura 12 - Atividade inibitória isolada dos peptídeos contra <i>C. krusei.</i>	29
Figura 13 - Atividade inibitória isolada de Nistatina e Itraconazol contra <i>C. krusei.</i>	29
Figura 14 - Atividade inibitória combinada dos peptídeos e Itraconazol contra <i>C. krusei</i>	30
Figura 15 - atividade inibitória combinada dos peptídeos e Nistatina contra <i>C. krusei</i>	31
Figura 16 - Atividade redutora isolada dos peptídeos contra biofilmede <i>C. krusei.</i>	31
Figura 17 - Atividade redutora isolada dos antifúngicos contra biofilme de <i>C.krusei.</i>	32
Figura 18 - Atividade redutora combinada de peptídeos e Nistatina contra biofilme de <i>C.krusei.</i>	32
Figura 19 - Atividade redutora combinada do Pep 4 e itraconazol contra biofilme de <i>C.krusei.</i>	33

# SUMÁRIO




















<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 Fungos patogênicos	11
1.2 Agentes antifúngicos e resistência	12
1.3 Biofilme	14
1.4 Peptídeos antimicrobianos ( PAMs)	16
1.5 PAMs sintéticos	18
1.6 Sinergismo	19
<b>2 OBJETIVO GERAL</b>	20
2.1 Objetivos específicos	20
<b>3 METODOLOGIA</b>	21
3.1 Obtenção do material biológico	21
3.2 Síntese dos peptídeos	21
3.3 Ensaio antibiofilme do sinergismo peptídeo/antibiótico	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	23
4.1 Atividade de inibição de crescimento de biofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina contra <i>C. albicans</i>	23
4.2 Atividade de redução de biomassa de biofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina contra <i>C. albicans</i>	26
4.3 Atividade de inibição da formação de biofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina contra <i>C. krusei</i>	28
4.4 Atividade de redução de biomassa de biofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina contra <i>C. krusei</i>	31
<b>5. CONCLUSÃO</b>	33
<b>REFERÊNCIAS</b>	34

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Fungos patogênicos

Os fungos causam grande preocupação a saúde humana, podendo causar desde leves infecções superficiais a condições mais graves e que necessitam de tratamento medicamentoso intensivo (RAUTEMAA-RICHARDSON; RICHARDSON, 2021). Por conta disso, esses microrganismos vem chamando a atenção de órgãos internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS), que em 2022 lançou uma lista com 19 espécies de fungos a serem combatidos, classificando-os de acordo com seu grau de risco, levando em consideração fatores como incidência anual, disponibilidade de diagnóstico, resistência e número de mortes causados (Figura 1).

Figura 1 - Fungos patogênicos classificados por fator de risco pela OMS.

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> ( <i>Candida glabrata</i> )	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Candida krusei</i> )
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Fonte: (OMS - 2022)

Dentre os fungos citados na lista, vemos que 6 dos 19 presentes são pertencentes ao

gênero *Candida*, gênero esse que pertence a classe Saccharomycetes, da divisão Ascomycota, apresentando aproximadamente 200 espécies distintas de fungos. As leveduras, classificadas neste gênero, são fungos que habitam de forma natural as mucosas, pele, vagina e trato gastrointestinal do ser humano (BAKHSHI et al, 2021) e são responsáveis por causar candidíase oral, vaginal, orofaríngea, onicomicose e podem invadir tecidos e órgãos, provocando candidíase sistêmica (KHODADADI et al., 2021). Dentre os pacientes afetados, os mais sensíveis a infecções graves são aqueles com a saúde já comprometida, como pacientes submetidos a longos tratamentos intensivos ou imunossuprimidos (PARSLOW, THORNTON, 2022).

Dos pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é a levedura com maior número de infecções em seres humanos (BUTLER et al., 2009), pois ela consegue se diferenciar para o formato de hifas através de morfogênese, podendo penetrar os epitélios e endotélios atingindo o indivíduo de forma sistêmica aumentando sua mortalidade e justificando sua classificação como patógeno de alto risco (JOSHI et al., 2022; SUDBERY, 2011). Além de *C.albicans* outros microrganismos pertencentes desse gênero como *C. tropicalis*, *C.parapsilosis* e *C.krusei* também atuam como patógenos oportunistas, já presentes naturalmente em humanos, mas podendo causar infecções e agravar quadros de pacientes já fragilizados.

Diante desses fatores, o gênero *Candida* é de extrema relevância quando se diz respeito a saúde humana. Portanto, faz-se pertinente o estudo e desenvolvimento de tratamentos eficazes e seguros para tratar infecções causadas por esses organismos, principalmente para pacientes imunossuprimidos que são os mais afetados por esse tipo de doença.

## **1.2 Agentes antifúngicos e resistência**

O tratamento tradicional para doenças causadas por fungos consiste no uso de agentes antifúngicos de quatro classes diferentes: os polienos, azólicos, equinocandinas e flucitosinas (FISHER et al., 2022). Dentre esses, os mais utilizados são os polienos, como a Nistatina, que tem como mecanismo de ação uma interação com o ergosterol presente na membrana desses microrganismos, levando a formação de complexos que induzem mudanças físicas na membrana (CHANG et al., 2019). Além deles, outra classe que merece atenção são os azóis, como Itraconazol, sendo o tratamento preferencial para infecções causadas pelo gênero *Candida*, especialmente *C.albicans* (WHO - 2022) e tem por seu mecanismo de ação a desestabilização da membrana por meio da inibição da biossíntese do ergosterol

(MARICHAL et al., 1999; BALASHOV et al., 2005; REVIE et al., 2018).

Mesmo com diferentes classes de possíveis novos medicamentos, o desenvolvimento de novas drogas têm sido relativamente lento, isso se dá por conta da grande diversidade de vias moleculares relacionadas à resistência antimicrobiana (LEE et al., 2020). Além disso, o mau uso de medicamentos caracterizado pelo seu uso sem prescrição médica, uso de doses menores que o necessário, abandono do tratamento ao primeiro sinal de melhora do quadro, são fatores que contribuem para o aumento da resistência microbiana adquirida, que é caracterizada quando um microorganismo que antes era suscetível a um fármaco perde a sua suscetibilidade. Isso acontece pois as células têm a capacidade de alterar seu metabolismo em resposta a condições variáveis, fazendo com que elas possam crescer e se dividir em um ambiente não ideal, como no caso da exposição a antifúngicos, esse processo é chamado de plasticidade fenotípica adaptativa (HOKKEN et al., 2019).

Dentre as adaptações nas células causadas pela exposição a antifúngicos e que levam ao um aumento da resistência microbiana podemos destacar a resistência pela alteração da composição lipídica (ergosterol) da membrana citoplasmática, o que diminui a afinidade do antifúngico pela membrana fúngica, fator esse que é o principal alvo no tocante a resistência de polienos como a Nistatina. Também se destacam a superexpressão de bombas de efluxo, que tem por função expelir as moléculas do tratamento para fora da célula, superexpressão do gene ERG11 que compromete os sítios de ligação de azóis como o Itraconazol e aneuploidia dos gene ERG3 e ERG2 que levam a uma redução na quantidade de ergosterol na membrana, reduzindo o impacto da ação de antifúngicos que visam desestabilizar essa molécula (REALES-CALDERÓN et al. 2016.)

Além destes mecanismos de resistência, a própria formação natural de biofilme é conhecida por ser um mecanismo que contribui para a resistência antimicrobiana, atrasando a penetração dos antifúngicos na célula. Esse biofilme é conhecido por ser composto de diversas células sobrepostas umas nas outras, que por sua vez, formam uma matriz extracelular polissacarídica. A matriz produzida oferece proteção contra terapia antimicrobiana e outros estressores externos (ZARNOWSKI et al., 2021).

Também vale ressaltar a existência de problemas relacionados às próprias drogas utilizadas. Os antifúngicos apresentam diversas limitações no que diz respeito a perfis de segurança de medicamentos, propriedades farmacocinéticas, espectro de atividade, um pequeno número de alvos e efeitos colaterais diversos (BASTOS et al., 2021). Um grande obstáculo na descoberta de antifúngicos é a identificação de alvos essenciais que podem ser especificamente alcançados por moléculas que não possuem toxicidade para o hospedeiro

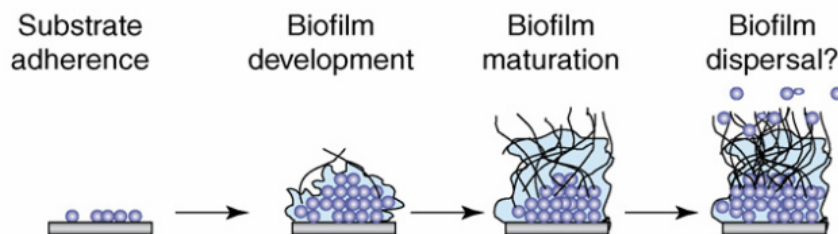
(HUANG et al., 2016).

Diante dos vários mecanismos de resistência, mau uso de drogas, dos problemas dos tratamentos existentes e da dificuldade do desenvolvimento de novas drogas e aos limitados alvos de ação das classes de antifúngico existentes, a busca por novas moléculas com atividade antifúngica com diferentes alvos e sua possível combinação com drogas existentes se torna um campo emergente e promissor na ciência para estudo.

### 1.3 Biofilme

Um biofilme é composto, principalmente, por um consórcio estruturado de células envolvidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Além dos mecanismos de resistência já apresentados, a maioria das leveduras, se não todas, são capazes de formar biofilme (FANNING, MITCHEL 2012). O biofilme é responsável por promover a sobrevivência das leveduras na natureza. Atrelada à questão da sobrevivência em ambientes, o biofilme também confere resistência a antifúngicos, desinfetantes químicos e à fagocitose e outros componentes do sistema imunológico, (RAMAGE, 2012). A produção do biofilme, desde seu início até a completa maturação passa pelas seguintes etapas, como mostrado na Figura 2. Primeiro ocorre um acoplamento parcial das células sobre a superfície, então, essas células se proliferam secretando polissacarídeos e se aderindo a superfície de maneira mais resistente. Depois ocorre a maturação e fixação do biofilme que a partir desse momento pode se desacoplar da matriz principal e se acoplar em uma nova superfície, contribuindo para a proliferação do biofilme.

Figura 2 - Processo de formação do biofilme



Fonte: BLANKERSHIP, MITCHEL 2006

O biofilme é potencializador de diversas doenças de interesse médico. Essas doenças são classificadas de acordo com o local de acoplação do biofilme, podendo ser

divididas em infecções associadas a dispositivos, que são aquelas em que ocorre a colonização do biofilme em objetos não nativos ao corpo humano, como cateteres, próteses dentárias, e dispositivos intra uterinos, em que as células pertencentes ao biofilme podem se desacoplar dessas superfícies e atingir tecidos próximos e até mesmo a corrente sanguínea, causando infecções graves. Outro modelo são as infecções não associadas a dispositivos, que são caracterizadas pela infecções que atingem diretamente os tecidos do hospedeiro, podendo causar infecções em órgãos como bexiga coração e ouvidos (SEGEV-ZARKO et al., 2015). Como o biofilme atua como uma barreira física para as células, ele dificulta a ação de antifúngicos, pois diminui o acesso dos fármacos a membrana das células, que é o alvo da maioria dos mecanismos de ação das drogas conhecidas conferindo um aumento da resistência microbiana (BLANKERSHIP, MITCHEL 2006). Portanto, para combatermos doenças causadas por fungos, também temos que conseguir formas de inibir a formação de biofilme ou promover redução da biomassa formada.

#### **1.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)**

Para conter o problema do crescente aumento da resistência microbiana, a prospecção por novas moléculas com novos alvos é de extrema importância e um tipo de molécula que vem sendo bastante estudada e utilizada como alternativas de tratamento para infecções causadas tanto por fungos quanto por bactérias são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Dentre as vantagens do uso dos PAMs estão o seu mecanismo de ação, que tem por alvo a membrana celular, aumentando a dificuldade do desenvolvimento de resistência. Outra vantagem é a vasta quantidade de PAMs existentes, visto que eles são amplamente produzidos naturalmente por os organismos vivos como formas de defesa a infecções, fazendo com que haja uma quantidade quase infinita de PAMs a serem descobertos (GHOSH; HALDAR, 2015; ZHANG; GALLO, 2016).

Apesar da grande quantidade de PAMs conhecidos, algumas características são comuns a todos eles, como o tamanho de cadeia, que varia entre 5 e 50 aminoácidos, e sua capacidade de interagir com membranas de microrganismos, conferindo o seu potencial antimicrobiano. Isso se dá por conta da presença de aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos de carga positiva, lisinas e argininas. A presença dessas classes de aminoácidos confere aos PAMs anfipaticidade, que é a presença de propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas.

Por serem moléculas anfipáticas, os PAMs interagem muito bem com membranas celulares. No entanto, a alta presença de aminoácidos com carga positiva também confere um efeito indesejado, que é a baixa seletividade desses peptídeos, ou seja, não há uma diferenciação entre as células de microorganismo e as células do hospedeiro, conferindo aos PAMs uma alta toxicidade (BAHAR; REN, 2013; KANG et al., 2017; LIMA et al., 2021c; ZHANG; GALLO, 2016)

Como citado, grande parte dos PAMs tem como alvo a membrana celular, causando a formação de poros na membrana e levando a morte celular. Os PAMs podem causar poros na membrana de acordo com quatro modelos sendo eles o modo toroidal, carpete, barril e o detergente BEZERRA, Leandro P. *et al.* Synergistic Antifungal Activity of Synthetic Peptides and Antifungal Drugs against *Candida albicans* and *C. parapsilosis* Biofilms. **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9138075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39138075/). Acesso em: 17 dez. 2023.

LI, Shuqin *et al.* The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 109, p. 103–115, 2021.

(Li *et al.*, 2021).

No modo “Carpete”, peptídeos se acumulam como folhas externas na bicamada celular, perturbam a tensão superficial e formam poros ou defeitos na membrana. As moléculas estão localizadas na superfície e orientadas quase em paralelo ao plano da membrana. A inserção do peptídeo na membrana perturbaria a ordenação lipídica, diminuiria o parâmetro de ordem e facilitaria a penetração de moléculas de água através da membrana, seguida por distorção da membrana e morte celular (Li *et al.*, 2021).

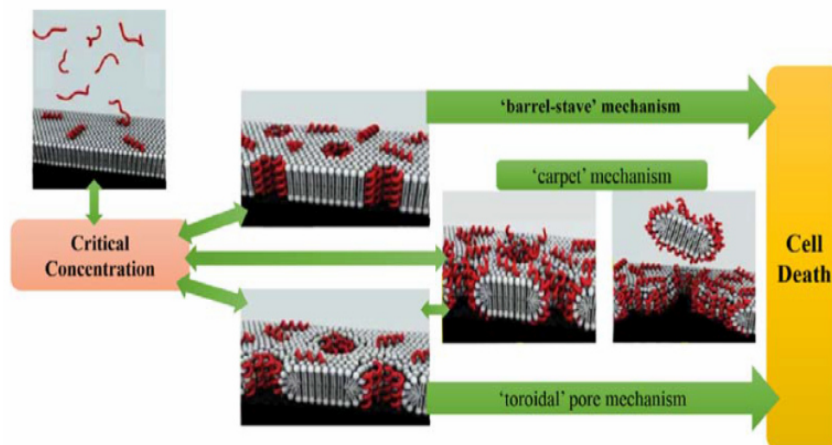
O modo barril é um estado em que os PAMs se agregam verticalmente à bicamada, causando lise celular. Os peptídeos transmembranares se organizam como um barril, com suas superfícies hidrofílicas alinhadas em direção ao centro de um poro preenchido com água. O poro funciona como um canal de íons que conduz uma corrente de retificação interna com um campo elétrico externo. O tamanho do poro depende da relação molar entre peptídeo e lipídio. Neste modelo os peptídeos transmembranares são firmemente montados uns nos outros e formam um poro circular rígido (Li *et al.*, 2021).

No modo toroidal os peptídeos e grupos de cabeça lipídica estão alinhados com a curvatura contínua de uma monocamada lipídica de cima para baixo. Para considerar a diferença entre o modo “toroidal” e o modo “carpete”, espera-se que o modelo de poro toroidal

forme multímeros transmembranares bem definidos, enquanto uma disposição mais frouxa e menos definida de peptídeos é formada na superfície da membrana. Ao contrário do modelo barril onde não ocorre uma reorientação significativa das moléculas de lipídio, o modelo "toroidal" pode causar uma mudança na orientação da molécula de lipídio (Li *et al.*, 2021).

Também há o modelo “detergente” ou de formação de agregados, onde os peptídeos se acumulam na superfície da membrana celular, sem nenhuma conformação específica. Após chegarem em uma determinada concentração, os PAMs embutidos na membrana, formam um complexo com as moléculas de fosfolipídios e cruzam a membrana na forma de (Li *et al.*, 2021). A figura 3 mostra os quatro modelos, sendo eles o modo toroidal, carpete, barril e o detergente (Li *et al.*, 2021).

Figura 3 - Modos de ação dos PAMs.



Fonte:(Li *et al.*, 2021)

### 1.5 PAMs sintéticos

Como vimos, os PAMs tem um alto potencial para se consolidarem como moléculas indicadas para o tratamento de doenças microbianas. No entanto, existem alguns empecilhos em relação a sua utilização. Devido às suas características estruturais, os PAMs apresentam baixa seletividade, além disso, alguns deles já foi constatado atividade hemolítica, toxicidade ao hospedeiro, suscetibilidade a digestão por proteases em vivo, levando a perda de atividade. Além dessas características, seu baixo rendimento de extração comprometeria a

capacidade de larga escala e seu potencial como um novo medicamento (BOTELHO,2020). Para contornar esses desafios, pesquisadores têm apostado na produção de peptídeos sintéticos inspirados nos PAMs, que se dá pelo desenho racional através de programas de bioinformática, onde é possível, com certo *softwares*, desenhar novos PAMs ou otimizar sequências já existentes, melhorando diversos parâmetros do peptídeo desenhado, como carga líquida, hidrofobicidade, estrutura secundária, e índice de Boman, além de prever uma possível atividade antimicrobiana, a qual pode ser melhorada com adições e remoções pontuais (KUNDU, 2020; SOUZA et al., 2020a).

### **1.6 Sinergismo**

Sinergismo, quando se trata de agentes antimicrobianos, acontece quando a combinação de pelo menos dois deles resulta em uma atividade antimicrobiana maior do que a soma das atividades dos agentes separados, ou seja, quando a junção dos mecanismos de ação de dois compostos diferentes potencializam o efeito um do outro, promovendo uma atividade maior que a esperada. A utilização de PAMs em combinação com drogas antimicrobianas é conhecida e promissora (SWEDAN; SHUBAIR; ALMAAYTAH, 2019; SHANG et al., 2019; DODOU LIMA; DE PAULA CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020). Isso se dá por conta da já citada capacidade de formar poros na membrana permitindo a passagem do antimicrobiano para o interior da célula, facilitando o contato com o alvo da droga, por isso, essa combinação de PAMs e drogas convencionais pode disponibilizar mais opções de tratamento para infecções invasivas difíceis de controlar (CASSONE, OTVOS JR, 2010). Além disso, o uso combinado de dois fármacos em sinergismo pode reduzir a quantidade da dose necessária de cada um, o que pode trazer vantagens como a redução do custo e da toxicidade dos tratamentos.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de diferentes péptidos sintéticos, contra os fungos patogênicos *C. albicans* e *C.krusei*, em sinergismo com antifúngicos comerciais.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade inibitória e redutora isolada dos peptídeos para biofilme de *Candida albicans* e *Candida krusei*
- Avaliar a atividade inibitória e redutora combinada dos peptídeos em conjunto com Nistatina e Itraconazol para biofilme de *Candida albicans* e *Candida krusei*

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Material biológico

As cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* e ATCC 6258 de *C. krusei* utilizadas neste trabalho foram obtidas do laboratório de proteínas vegetais de defesa do departamento de bioquímica e biologia molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 3.2 Metodologia de desenho, obtenção e síntese dos peptídeos

Os 4 peptídeos sintéticos foram obtidos a partir das sequências dos PAMs naturais Rs-AFP2, Dm-AMP1 e Mc-AMP1. O desenho dos peptídeos sintéticos foi realizado utilizando a ferramenta online C-PAmP (NIARCHOU *et al.*, 2013) . A escolha dos PAMs sintéticos foi realizada com base nas propriedades dos peptídeos, levando em consideração os parâmetros físico-químicos, que foram obtidos utilizando o Antimicrobial Peptide Database (WANG; LI; WANG, 2016). Após a obtenção de peptídeos com características desejáveis, o preditor de peptídeos antimicrobianos iAMPpred (MEHER *et al.*, 2017) foi utilizado para avaliar a probabilidade de ação antimicrobiana predita, variando de 0 a 1, quanto mais próximo a 1, maior a probabilidade de o peptídeo possuir atividade antimicrobiana, sendo considerados peptídeos antimicrobianos aqueles com um índice superior a 0,9. A capacidade de penetração de membranas dos peptídeos desenhados foi analisada utilizando a ferramenta CellPPD (GAUTAM *et al.*, 2015) . O potencial antigênico dos peptídeos foi avaliado utilizando o preditor Predicting Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>). O potencial tóxico dos PAMs sintéticos foi predito através da plataforma ToxinPred (GUPTA *et al.*, 2013) . O tempo de meia-vida do peptídeo e sua estabilidade em ambiente intestinal foram analisadas utilizando o preditor HLP (SHARMA *et al.*, 2014), bem como análises de mutações pontuais para incrementar a estabilidade dos peptídeos. Para analisar a estabilidade dos peptídeos em diferentes pH e com a presença de diferentes proteases foi utilizado o preditor Peptide Cutter (GASTEIGER *et al.*, 2005). Após todas as análises de bioinformática, obteve-se 4 peptídeos: Pep1 (CYRQVGWACGYCK), Pep2 (VFPAHKCICGFPC), Pep3 (GACHVKNGKLMCFY) e Pep4 (CSGFCCRQVGWARGYCK) derivados dos PAM naturais Mc-AMP1, Rs-AFP2, Dm-AMP1, Mc-AMP1, respectivamente. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa Synpeptide® com um grau de pureza maior que 95% determinada por cromatografia de fase reversa em HPLC e por espectrometria de massas.

### 3.3 Ensaio antibiofilme – inibição da formação de biofilme

O ensaio foi feito em microplacas de poliestireno de 96 poços. A suspensão de células foi preparada a partir do cultivo celular que ocorreu em meio de cultura Sabouraud, a 37 °C por 24 h. Após esse período, a suspensão de células foi padronizada para uma concentração de  $10^6$  células/mL. Tanto os antifúngicos( Nistatina e Itraconazol) quanto os peptídeos foram diluídos em uma solução de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em NaCl 0,15M. A partir da concentração inicial de 1000 µg/mL foi feita uma diluição seriada decrescente até a concentração de 0,4 µg/mL, totalizando 12 concentrações diferentes de cada peptídeo e de cada antifúngico. Então, 25µl da solução padronizada de células foi posta em contato com 25µl de tratamento, seja os agentes isolados, seja os agentes combinados (tabela 1). Após isso, as placas foram então incubadas por 48 ha 37 °C. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi retirado e os poços lavados uma vez com NaCl 0,15 M estéril. Após isso, o biofilme no fundo dos poços foi fixado com 100 µL de uma solução de metanol 99%, deixando agir por 15 minutos. Após a total secagem dos poços, o biofilme foi corado com 200 µL de uma solução aquosa de cristal violeta 0,1%, deixando o cristal agir por 20 minutos. Os poços foram lavados três vezes com água destilada, para retirar o excesso de cristal violeta, e então o cristal ligado ao biofilme foi solubilizado em 200 µL de uma solução aquosa de ácido acético 33%. A absorbância dos poços foi obtida via leitor de microplacas (BioTek™ Epoch, BioTek Instruments, Inc., USA) usando um comprimento de onda de 590 nm.

### 3.4 Ensaios antibiofilme – Redução da biomassa

O ensaio foi feito em microplacas de poliestireno de 96 poços. A suspensão de células foi preparada a partir do cultivo celular que ocorreu em meio de cultura Sabouraud, a 37 °C por 24 h. Após esse período, a suspensão de células foi padronizada para uma concentração de 10<sup>6</sup> células/mL. Tanto os antifúngicos( Nistatina e Itraconazol) quanto os peptídeos foram diluídos em uma solução de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em NaCl 0,15M. A partir da concentração inicial de 1000 µg/mL foi feita uma diluição seriada decrescente até a concentração de 0,4 µg/mL, totalizando 12 concentrações diferentes de cada peptídeo e de cada antifúngico. Então, 25µl da solução padronizada de células foi incubada por 24 horas a 37°C para uma formação inicial do biofilme. Após isso, as placas foram então abertas e foi adicionado cada um dos tratamentos, seja dos agentes isolados, seja dos agentes combinados ( tabela 1) então, as placas voltaram a incubação por mais 24h a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi retirado e os poços lavados uma vez com NaCl 0,15 M estéril. Após isso, o biofilme no fundo dos poços foi fixado com 100 µL de uma solução de metanol 99%, deixando agir por 15 minutos. Após a total secagem dos poços, o biofilme foi corado com 200 µL de uma solução aquosa de cristal violeta 0,1%, deixando o cristal agir por 20 minutos. Os poços foram lavados três vezes com água destilada, para retirar o excesso de cristal violeta, e então o cristal ligado ao biofilme foi solubilizado em 200 µL de uma solução aquosa de ácido acético 33%. A absorbância dos poços foi obtida via leitor de microplacas (BioTek™ Epoch, BioTek Instruments, Inc., USA) usando um comprimento de onda de 590 nm.

Tabela 1 - Tratamentos usados nos ensaios antibiofilme.

Tratamentos		
Tratamentos	Concentração de farmaco	Concentração de peptídeo
1	50 µg/mL	0,02 µg/mL
2	25 µg/mL	0,04 µg/mL
3	12,5 µg/mL	0,09 µg/mL
4	6,25 µg/mL	0,19 µg/mL
5	3,12 µg/mL	0,39 µg/mL
6	1,56 µg/mL	0,78 µg/mL
7	0,78 µg/mL	1,56 µg/mL
8	0,39 µg/mL	3,12 µg/mL
9	0,19 µg/mL	6,25 µg/mL
10	0,09 µg/mL	12,5 µg/mL
11	0,04 µg/mL	25 µg/mL
12	0,02 µg/mL	50 µg/mL

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Características os peptídeos:

Figura 4: Predição das características dos peptídeos sintéticos

	PEP1 (CYRQVGWACGYCK)	PEP2 (VFPAHCICGFPC)	PEP3 (GACHVKNGKLMCFY)	PEP4 (CSGFCCRQVGWARGYCK)
Whimley-White	-1.81	-0.98	-0.75	-1.29
Boman	0.95	-0.86	-0.04	1.49
índice de hidrofobicidade	46	61	53	47
Carga	2	1	2	3
Potencial antibacteriano	94	99	100	99
Potencial antifúngico	97	96	99	99
Alergenicidade	Não	Não	Não	Não
Meia vida	1.646	1.349	2.4	2.804
Estabilidade	Alta	Alta	Alta	Alta
Pepsina (ph 1.3)	Não	Sim	Sim	Sim
Pepsina (ph >2)	Sim	Sim	Sim	Sim
Tripsina	Sim	Sim	Sim	Sim
CPP	Sim	Sim	Sim	Sim

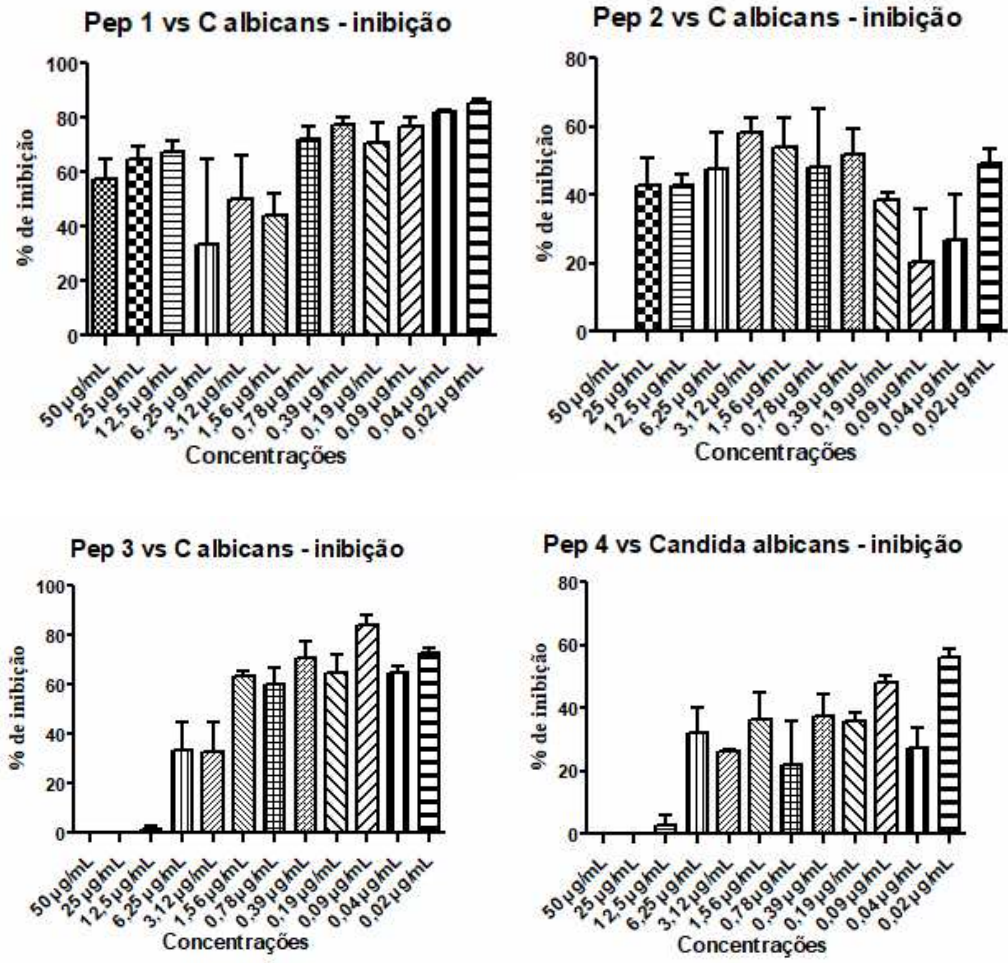
Fonte: Elaborado pelo autor

A figura 4 nos mostra algumas das características previstas para os nossos peptídeos. O índice de Boman estima o potencial de uma proteína para se ligar a outras proteínas um valor alto no índice de Boman indica que um peptídeo será multifuncional ou desempenhará uma variedade de funções diferentes dentro da célula devido à sua capacidade de interagir com uma ampla gama de proteínas. Whimley-White analisa a hidrofobicidade relativa, considerando ligações peptídicas, bem como das cadeias laterais. Outra característica importante detectada é o alto potencial antimicrobiano previsto, tanto para bactérias quanto para fungos, que são o alvo de nosso trabalho, além disso, a alta estabilidade e ausência de alergenidade tornam esses peptídeos candidatos promissores a uma nova alternativa de tratamento contra infecções causadas por microrganismos.

### 4.2 Atividade de inibição da formação de biofilme de *C. albicans* dos peptídeos isolados e em combinação com Nistatina e Itraconazol

Os quatro peptídeos apresentaram comportamentos diferentes em relação à inibição da formação do biofilme de *C. albicans*. O pep 1 isoladamente foi o que apresentou maior atividade de inibição da formação do biofilme, chegando a 80% de inibição na concentração de 0,02 µg/mL. Os demais apresentaram, em sua concentração mais eficaz, por volta de 60% de inibição da formação do biofilme. É interessante observar também que, no caso do Pep 3 e do Pep 4 as menores concentrações foram mais eficazes que as maiores concentrações no que diz respeito à atividade inibitória.

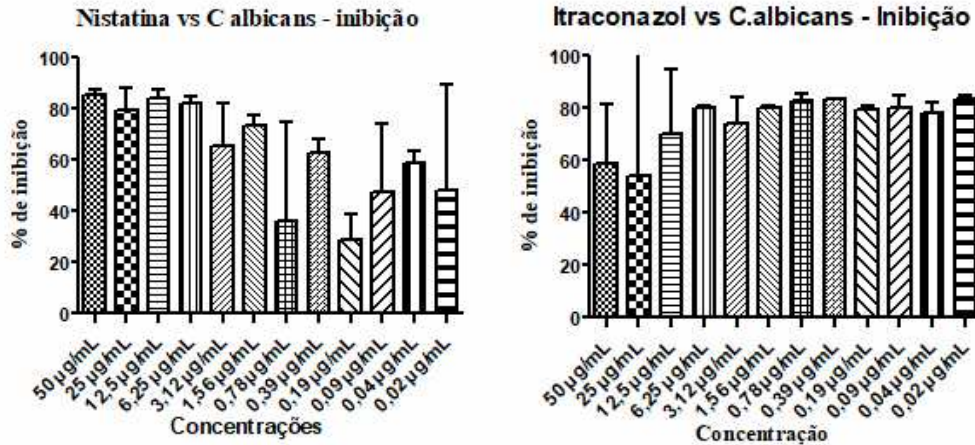
Figura 6: Atividade isolada dos peptídeos contra a formação de biofilme em *C. albicans*



Fonte: elaborado pelo autor

Já os antifúngicos Nistatina e Itraconazol apresentaram isoladamente altas taxas de inibição para a formação do biofilme, ambos chegaram aos 80% de inibição de formação do biofilme (Figura 6).

Figura 7: Atividade isolada de Nistatina e Itraconazol contra a formação de biofilme de *C. albicans*.

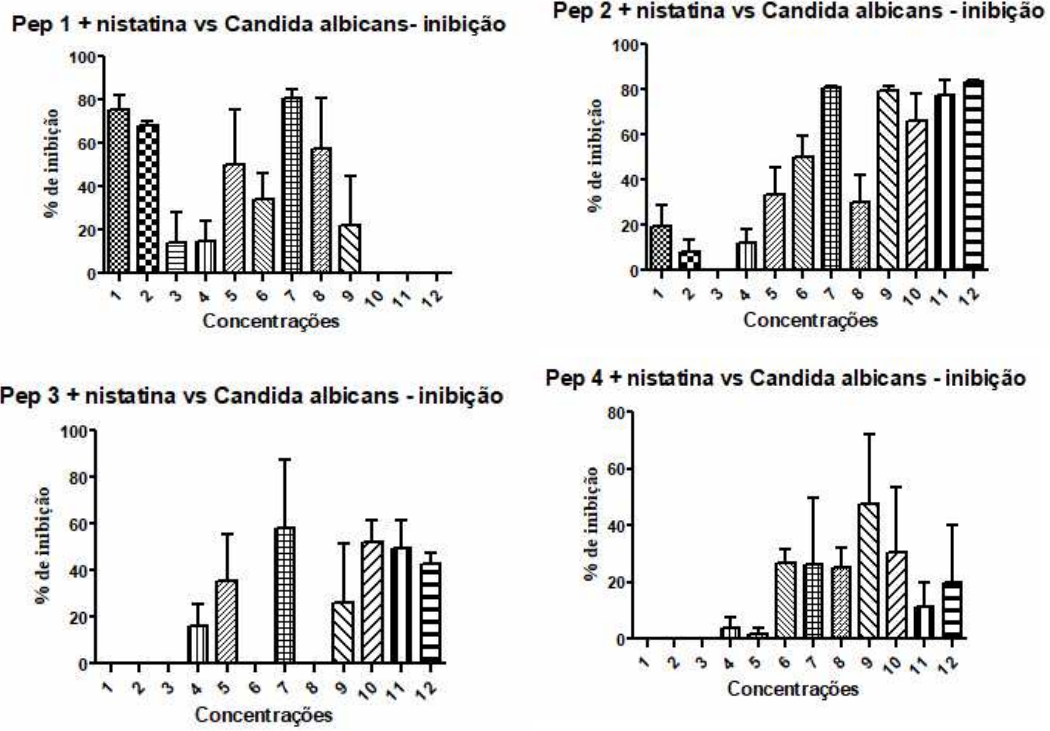


Fonte: elaborado pelo autor

Novos ensaios foram realizados para avaliar o sinergismo entre os peptídeos e os fármacos Nistatina e Itraconazol. Os resultados mostram que a combinação de Nistatina com os peptídeos estudados não foi interessante, pois a inibição da formação dos biofilmes foi altamente alterada, pois houve uma perda da atividade na maioria das combinações testadas (Figura 7).

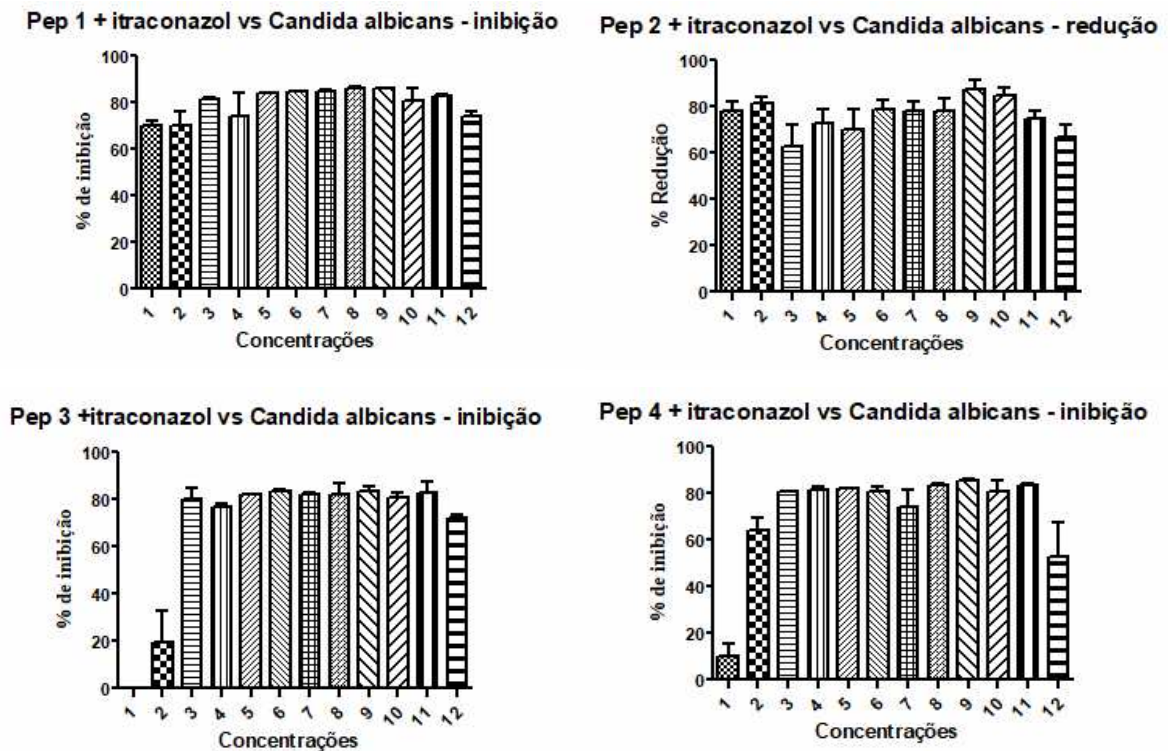
Ao contrário da Nistatina, houve pouca interferência negativa na atividade antibiofilme da combinação do Itraconazol com os quatro peptídeos. De modo geral, não houve sinergismo significativo entre os peptídeos o Itraconazol (Figura 8).

Figura 7: Efeito da combinação da Nistatina e dos peptídeos sintéticos contra biofilme de *C. albicans*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8 - Atividade inibitória combinada de Itraconazol e os peptídeos contra biofilme de *C. albicans*.

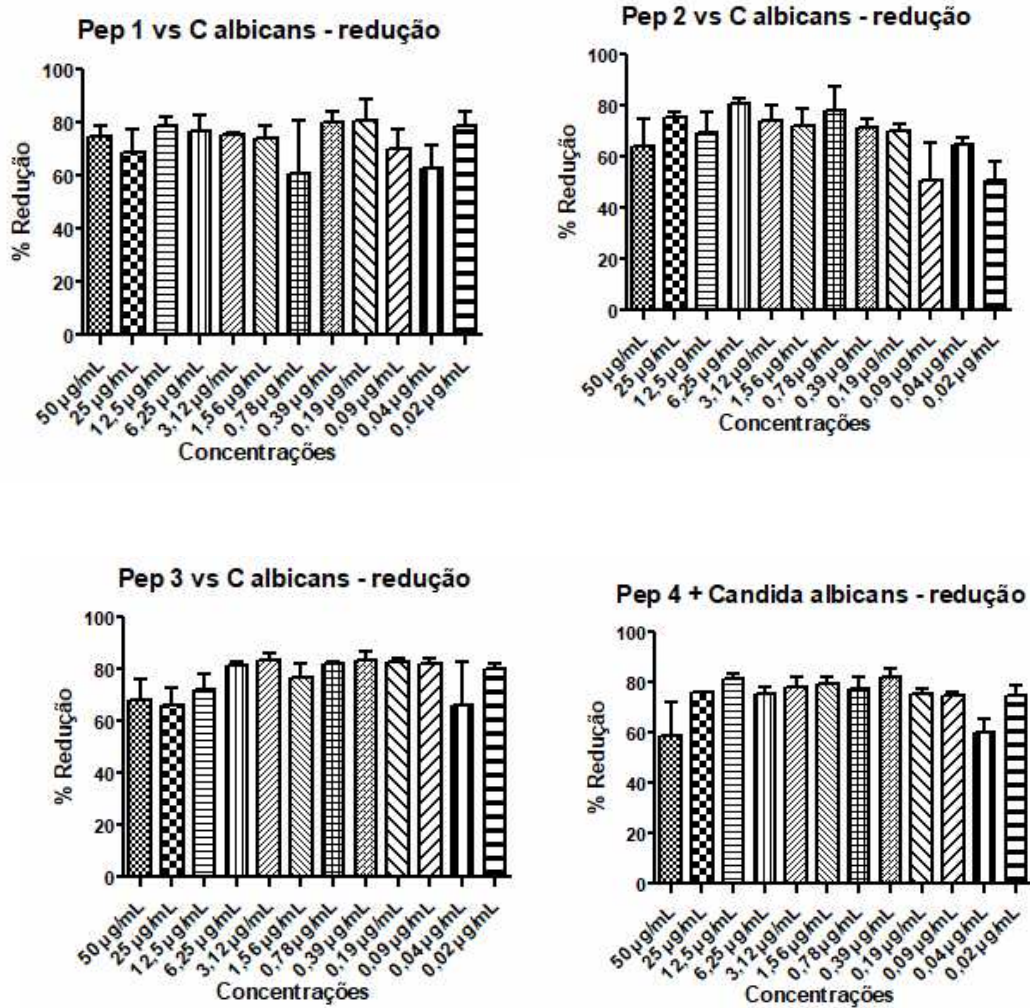


Fonte: elaborado pelo autor

### 4.2 Redução da biomassa de biofilme de *C. albicans* dos peptídeos isolados e efeito combinado com Itraconazol e Nistatina

Para a redução da biomassa do biofilme, todos os peptídeos apresentaram alta atividade. Todos conseguiram chegar próximo de 80% de redução. Diferente dos ensaios de inibição da formação dos biofilmes, os percentuais de redução se mantiveram parecidos ao longo de todas as concentrações, o que propõe que poderíamos encontrar resultados usando concentrações ainda menores dos peptídeos (Figura 9).

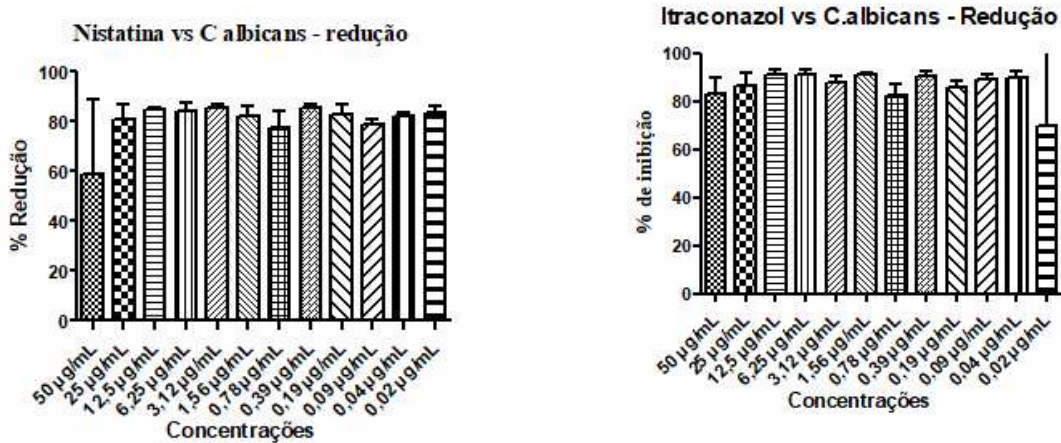
Figura 9: Atividade isolada dos peptídeos para redução da biomassa do biofilme de *C. albicans*



fonte: elaborado pelo autor

Os antifúngicos também apresentaram altas taxas de redução da biomassa em todas as concentrações testadas, com destaque para o Itraconazol, que em algumas concentrações a inibição chegou a 90% de redução da biomassa. Por outro lado, a Nistatina chegou a, no máximo 80% de redução nas concentrações testadas (Figura 10).

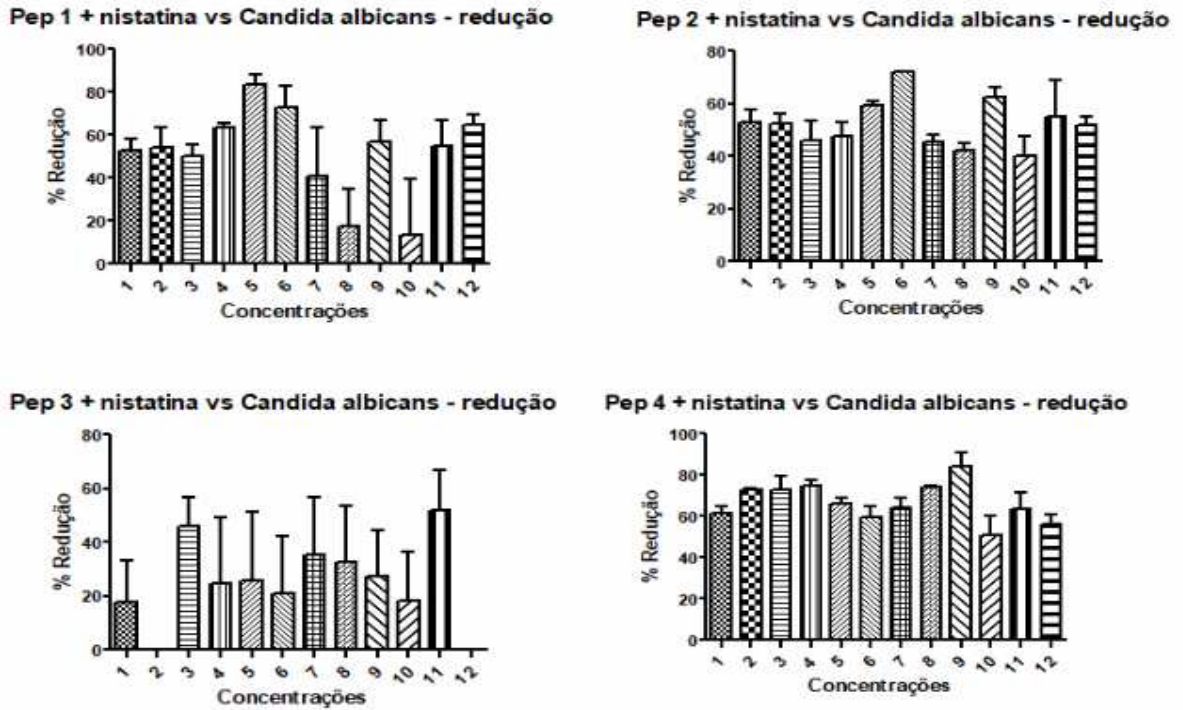
Figura 10: atividade redutora isolada de Nistatina e Itraconazol contra biofilme de *C. albicans*.



Fonte: elaborado pelo autor

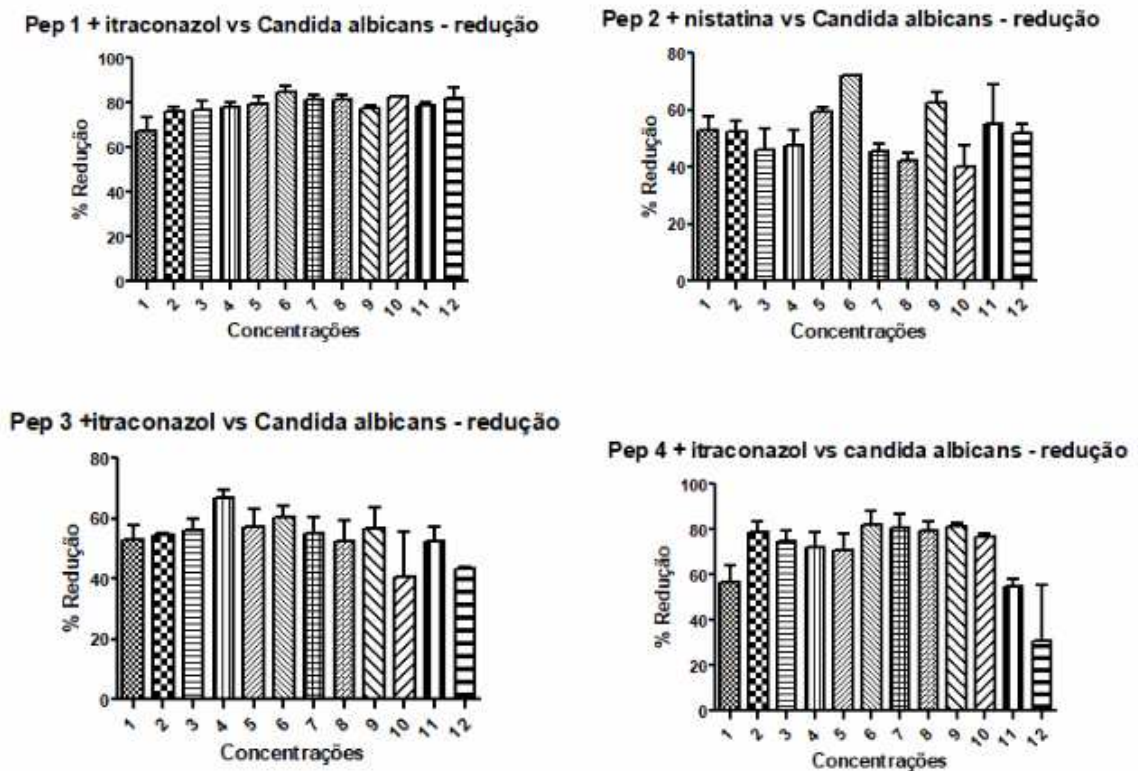
Mais uma vez, tanto os peptídeos quanto os antifúngicos apresentaram altas taxas de redução da biomassa de biofilme. Interessantemente, ao combinar os peptídeos com os dois fármacos houve uma perda de atividade antibiofilme (Figuras 11 e 12).

Figura 11: Atividade combinada de Nistatina com os peptídeos contra biofilme de *C albicans*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12: Atividade combinada de Nistatina com os peptídeos contra biofilme de *C. albicans*.

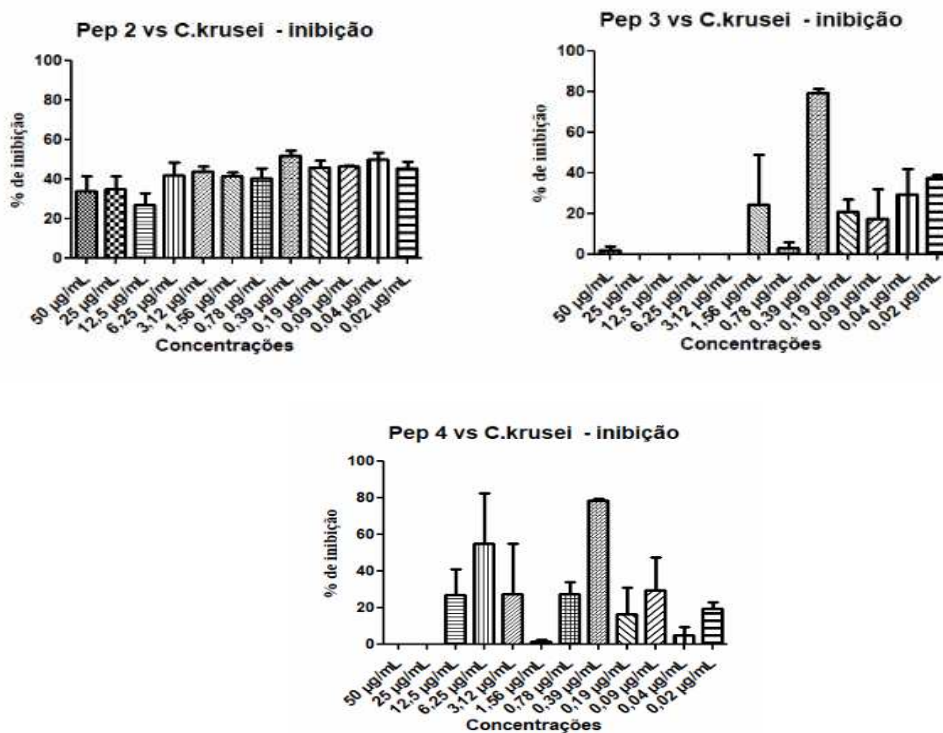


Fonte: Elaborado pelo autor

### 4.3 Atividade de inibição da formação de biofilme de *C. krusei* dos peptídeos isolados e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina

A levedura *C. krusei* se mostrou bem mais resistente aos tratamentos do que a *C. albicans*. Dentre os peptídeos, os que tiveram melhor atividade inibitória foram o Pep 3 e o Pep 4, que chegaram a 80% de inibição ambos na concentração de 0,39 $\mu$ g/mL, porém nas demais concentrações a atividade foi bem reduzida, ou até mesmo ausente. O Pep 1 não apresentou nenhuma atividade inibitória, enquanto o Pep 2 chegou a, no máximo 50% de inibição na concentração 0,19  $\mu$ g/mL, mas manteve um atividade inibitória regular ao longo das concentrações (Figura 14).

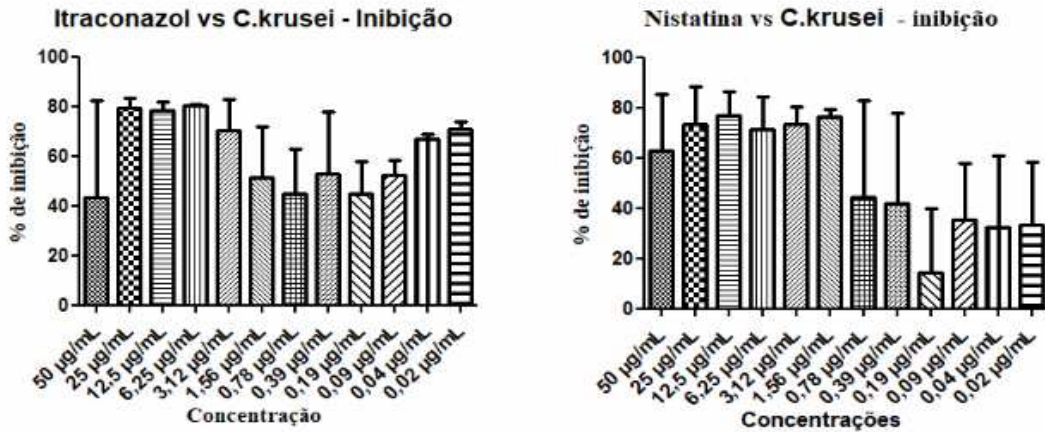
Figura 13: Atividade inibitória isolada dos peptídeos contra o biofilme de *C. krusei*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os antifúngicos Nistatina e Itraconazol também sofreram uma redução de atividade inibitória, em *C. krusei* quando comparado a *C.albicans* ao longo das concentrações, mas ainda assim, o Itraconazol chegou a 80% de inibição na concentração 25  $\mu$ g/mL, enquanto a Nistatina teve seu máximo em 75% na concentração 1,56  $\mu$ g/mL (Figura 15).

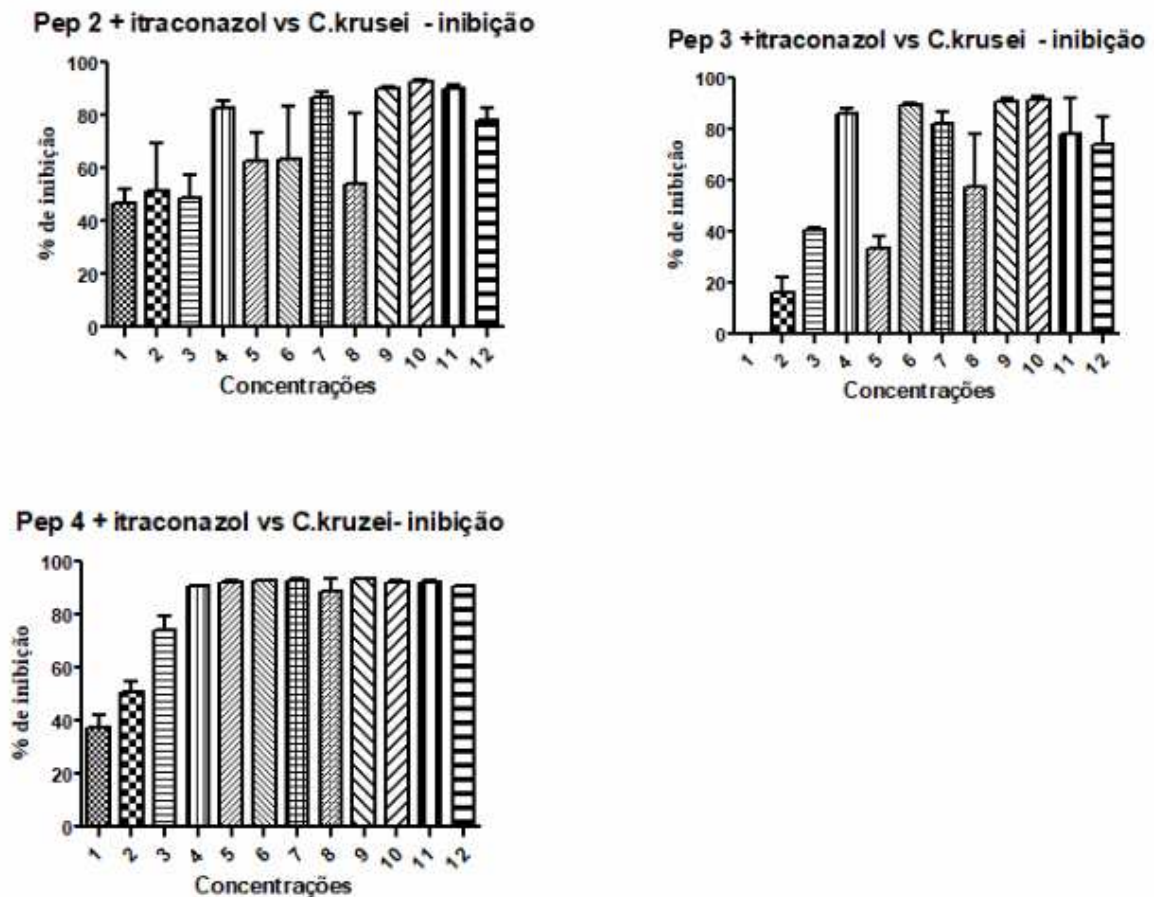
Figura 14: Atividade inibitória isolada de Nistatina e Itraconazol contra biofilme de *C. krusei*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como houve uma menor atividade por parte dos peptídeos, conseguimos evidenciar sinergismo ao combiná-los com os antifúngicos. Para o Itraconazol, podemos evidenciar melhorias da atividade principalmente nos tratamentos em que há menor quantidade de antifúngico e maior quantidade de peptídeo, como os tratamentos 10 (0,09µg/mL de antifúngico + 12,5 µg/mL de peptídeo), 11 (0,04µg/mL de antifúngico +25 µg/mL de peptídeo) e 12 (0,02µg/mL de antifúngico +50 µg/mL de peptídeo) do Pep 2, que conseguimos observar um aumento de 10% de potencial inibitório. O mesmo pode ser observado para o Pep 3 e Pep 4 em que há um ganho substancial de atividade ao longo de todos os tratamentos, chegando a 90% de potencial inibitório nos tratamentos 5 a 12 da combinação de Pep 4 com Itraconazol (Figura 16).

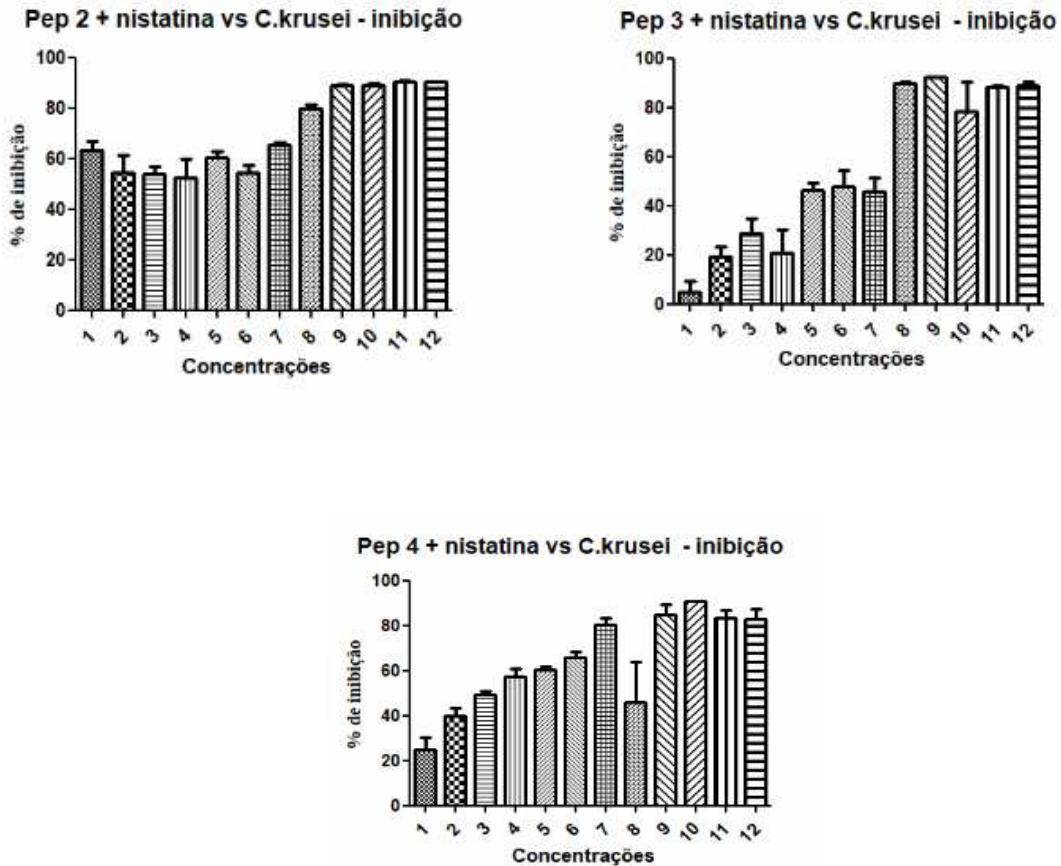
Figura 15: Atividade inibitória combinada dos peptídeos combinado com Itraconazol contra biofilme de *C. krusei*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao contrário do que ocorreu em *C. albicans*, em *C. krusei* não parece haver efeitos antagônicos entre a Nistatina e os peptídeos. Conseguimos observar o mesmo padrão observado com o Itraconazol, em que o ganho de atividade é maior nas combinações onde há maior quantidade de peptídeo e menor quantidade de antifúngico. Assim como com o Itraconazol, o Pep 4 foi o que apresentou maiores ganhos de atividade quando combinado com a Nistatina, chegando a 85% de inibição no tratamento 10 (Figura 16).

Figura 16: Atividade inibitória combinada dos peptídeos e Nistatina contra biofilme de *C. krusei*.



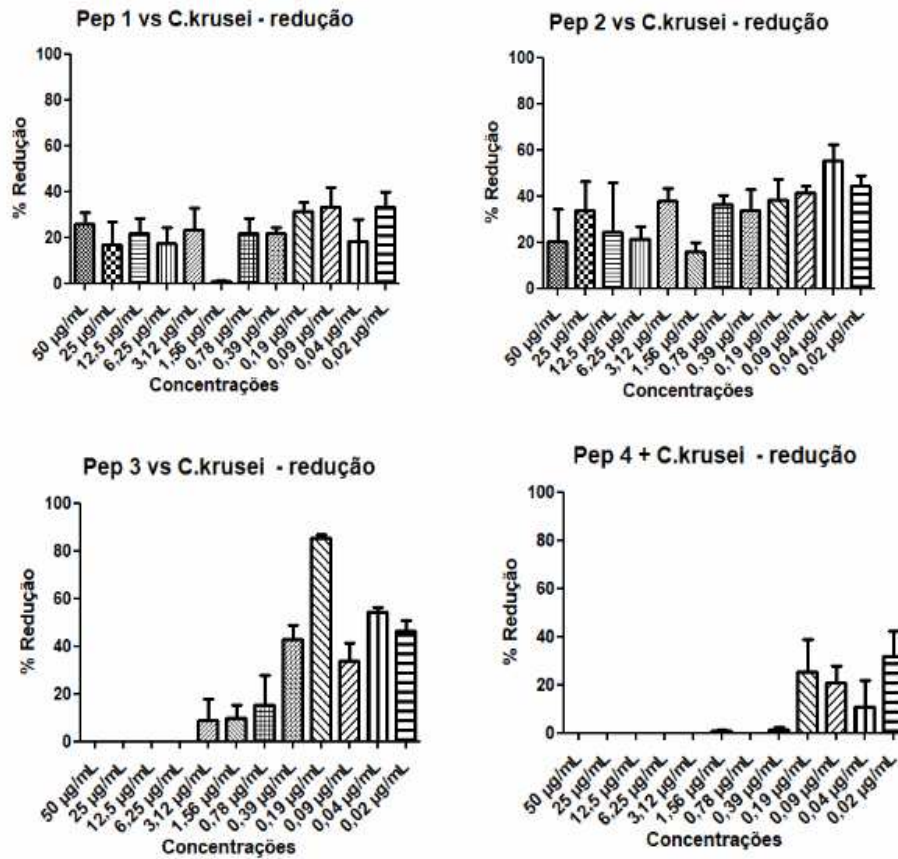
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4 Atividade de redução da biomassa de biofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com Itraconazol e Nistatina contra *C. krusei*.

Também houve uma maior resistência à redução da biomassa do biofilme em *C. krusei*. Entre os peptídeos, apenas o Pep 1 e o Pep 2 apresentaram uma atividade consistente ao longo das diferentes concentrações, mais uma vez, foi observado maior potencial redutor nas menores concentrações dos peptídeos. O Pep 1 chegou a atingir 35% de redução na concentração de 0,09 $\mu$ g/mL e o Pep 2 chegando a 45% de redução de biofilme na concentração de 0,04 $\mu$ g/mL. Pep 3 e Pep 4 não apresentaram nenhuma atividade nas

concentrações mais elevadas, mas na concentração 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Pep 3 chegou a 80% de redução e Pep 4 chegou a 35% de redução na concentração 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 17).

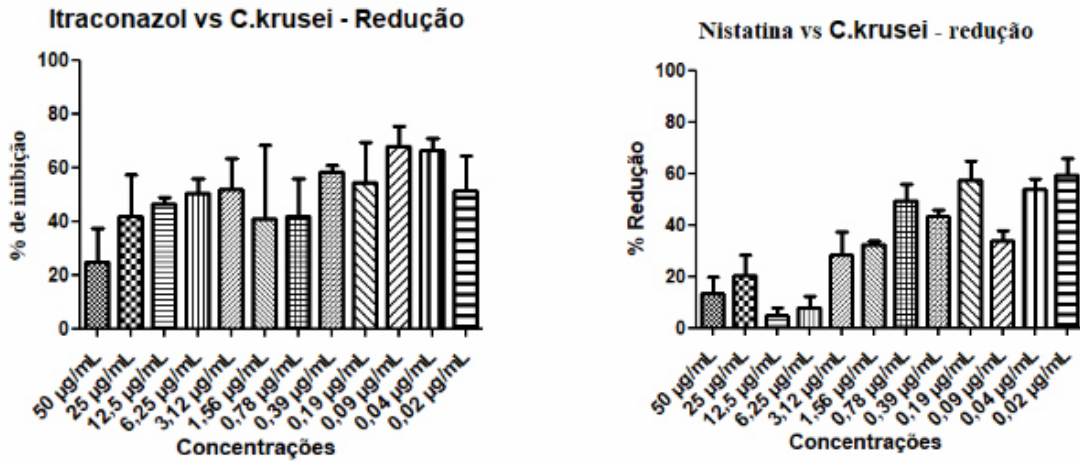
Figura 17: Atividade de redução da biomassa de biofilme de *C. krusei* dos peptídeos isolados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os antifúngicos também tiveram uma menor atividade de redução da biomassa do biofilme em *C. krusei*. A Nistatina apresentou uma queda de 20% de atividade, quando comparado a *C. albicans* tendo seu melhor desempenho na concentração 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em que apresentou 60% redução da biomassa. O mesmo aconteceu com o Itraconazol que teve como melhor desempenho 65% na concentração 0,09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 18).

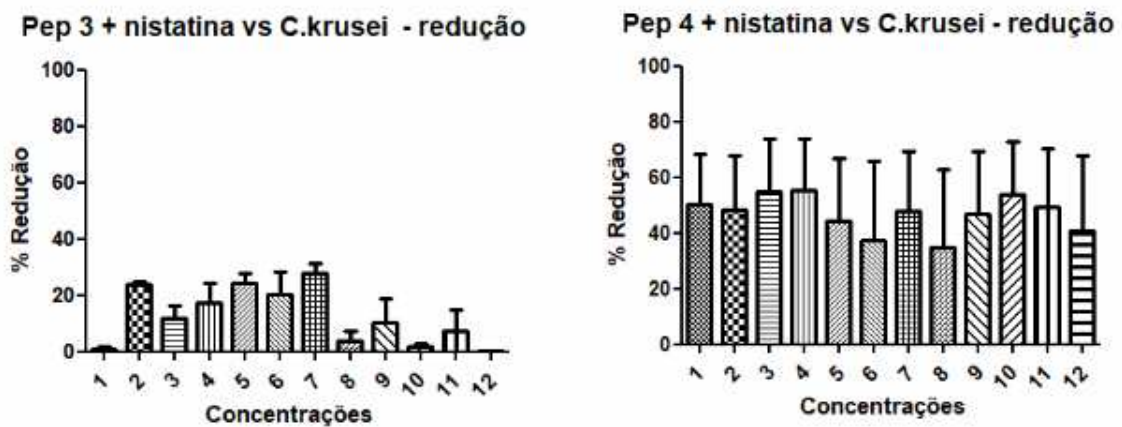
Figura 18: Atividade de redução da biomassa de biofilme de *C. krusei* dos fármacos isolados Itraconazol e Nistatina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao combinar os peptídeos com a Nistatina para análise da redução da biomassa de biofilme de *C. krusei*, percebemos mais uma vez um efeito antagônico entre os agentes. Os tratamentos combinando Nistatina com os Peps 1 e 2 não apresentaram nenhuma redução do biofilme, já os que a combinaram com os Peps 3 e 4 apresentaram uma atividade redutora menor do que os tratamentos isolados (Figura 19).

Figura 19: Atividade redutora combinada dos Pep 3 e 4 e Nistatina contra biofilme de *C.krusei*.

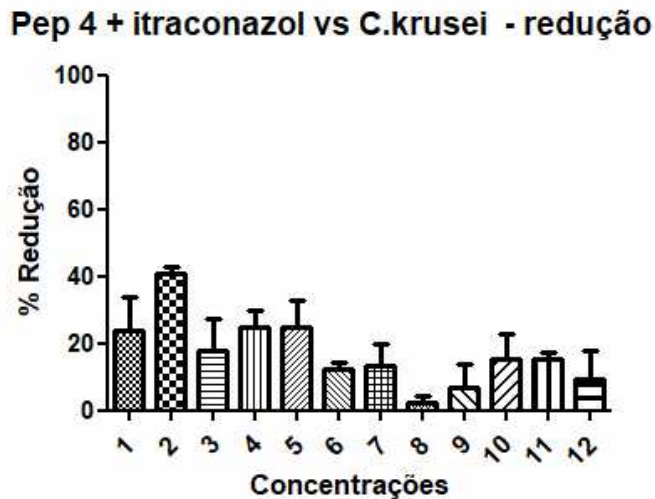


Fonte: Elaborada pelo autor.

A combinação com o Itraconazol para redução da biomassa de biofilme também

não foi favorável. Dos quatro peptídeos, apenas o Pep 4 apresentou alguma atividade, mas ainda menor do que a atividade dos dois agentes isolados, o que inviabiliza a possibilidade de algum sinergismo e evidencia um possível efeito antagônico entre os agentes usados (Figura 20).

Figura 20: Atividade redutora combinada do Pep 4 e Itraconazol contra biofilme de *C.krusei*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados apresentados mostram que há sinergismo entre os peptídeos e os antifúngicos testados apenas para a inibição do crescimento do biofilme em *C.krusei*. No entanto, podemos observar que há uma boa atividade isolada dos Peptídeos, que não haviam sido testados ainda, contra ambos os microrganismos analisados, o que os colocam como moléculas a serem estudadas mais a fundo como alternativas ao combate à resistência microbiana.

Outra descoberta pertinente é manutenção da atividade esperada mesmo quando diminuimos as concentrações dos tratamentos, o que pode ajudar a reduzir o problema dos efeitos colaterais ao hospedeiro tanto dos antifúngicos quanto dos peptídeos. Outro ponto a ser considerado é o efeito antagônico apresentado entre os peptídeos e a Nistatina em que houve uma redução do potencial anti-biofilme quando esses dois agentes foram combinados.

Além disso, quando comparamos a atividade isolada dos peptídeos testados podemos ver um alto potencial de inibição e redução, principalmente quando comparamos com outros peptídeos que vem sendo testados em outros trabalho, por exemplo o Mo-CBP3PEP I e o Mo-CBP3PEP III, ambos apresentaram, respectivamente, 60% e 40%, de atividade para redução de biomassa de biofilme de *Candida albicans* enquanto todos os nossos Peps

apresentaram 80% de redução ( Tabela 2). Para inibição da formação, nossos peps também tiveram maior atividade quando comparados a Pep-GATT e Pep- KAA(Tabela 2)

Tabela 2 – Comparação dos Peptídeos testados com outros peptídeos de interesse e drogas comerciais

<b>Atividade antibiofilme - <i>Candida albicans</i></b>		
Peptídeos	Inibição da formação	Redução da formação
PepGAT	10%	0%
PepKAA	20%	0%
Mo-CBP3PEPI	0%	60%
Mo-CBP3PEPIII	0%	40%
Pep 1	80%	80%
Pep 2	60%	80%
Pep 3	80%	80%
Pep 4	60%	80%
Itraconazol	80%	80%
Nistatina	80%	80%

Fonte: elaborado pelo autor, dados retirados de (Bezerra *et al.*, 2022)

## 5. Conclusão

O presente trabalho revelou o efeito de quatro peptídeos antimicrobianos sintéticos contra os biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*, em combinação com os antifúngicos Nistatina e Itraconazol, para observar um possível efeito sinérgico entre as moléculas. Os resultados obtidos corroboram o sinergismo entre as duas moléculas em certas combinações para a inibição do crescimento de *C. krusei*, o que veio a reduzir a quantidade necessária de antibiótico e de peptídeo necessárias para a obtenção da atividade antibiofilme. O ensaio antibiofilme revelou que todos peptídeos testados apresentam efeito isolado na inibição da formação e na redução da biomassa de biofilme tanto de *C. krusei* quanto de *C. albicans*. Também foi observado um efeito antagônico entre os peptídeos e a Nistatina, levando a redução do potencial anti-biofilme. No entanto, não foi observada grandes interferências com

o Itraconazol, o que pode indicar uma possibilidade de tratamento combinado, mesmo que sem ganho adicional de atividade, mas com o fim de reduzir a quantidade de cada um dos agentes utilizados.

## REFERÊNCIAS

- BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.
- BAKHSI, Maryam et al. Evaluation of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* against *Candida* species. *Gene Reports*, v. 25, p. 101369, 2021.
- BALASHOV, Sergey V. et al. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 1, p. 214-222, 2005.
- BALKIS, M.M., Leidich, S.D., Mukherjee, P.K. et al. Mechanisms of Fungal Resistance. *Drugs* 62, 1025–1040 (2002).
- BASTOS, Rafael W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: Crossresistance to medical drugs and beyond. *PLoS pathogens*, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021.
- BOTELHO, Kamila O Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential, *Expert Review of Clinical Pharmacology* Volume 13, issue 4 2020 -
- BLANKENSHIP, Aaron P Mitchell How to build a biofilm: a fungal perspective, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 9, Issue 6, 2006.
- BUTLER, Geraldine et al Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.
- CASSONE, Marco; OTVOS JR, Laszlo. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 8, n. 6, p. 703-716, 2010.
- CHANG, Zanetta et al. Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 132, p. 103253, 2019.
- DODOU LIMA, Hílania Valéria; DE PAULA CAVALCANTE, Carolina Sidrim; RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi. Antifungal in vitro activity of pilosulin-and ponerisin-like peptides

from the giant ant *Dinoponera quadriceps* and synergistic effects with antimycotic drugs. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 354, 2020.

FANNINGS, Mitchell AP (2012) Fungal Biofilms. *PLoS Pathog* 8(4): e1002585.

FISHER, Matthew C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*, p. 1-15, 2022.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*, p. 571–607, 2005.

GAUTAM, A.; CHAUDHARY, K.; KUMAR, R.; RAGHAVA, G. P. Computer-Aided Virtual Screening and Designing of Cell-Penetrating Peptides. *Methods Mol Biol.* v.1324, p. 59-69, 2015.

GUPTA, S. et al. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013.

GHOSH, C.; HALDAR, J. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. *ChemMedChem*, v. 10, n. 10, p. 1606–1624, out. 2015.

HOKKEN, Margriet WJ et al. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal genetics and Biology*, v. 132, p. 103254, 2019.

Huang, P., Yu, T. & Yoon, Y. Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 289–302 (2007).

JOSHI, Kanchan M. et al. Biofilm inhibition in *Candida albicans* with biogenic hierarchical zinc-oxide nanoparticles. *Biomaterials Advances*, v. 134, p. 112592, 2022.

KUNDU, R. Cationic Amphiphilic Peptides: Synthetic Antimicrobial Agents Inspired by Nature. *ChemMedChem*, v. 15, n. 20, p. 1887–1896, 19 out. 2020.

LEE, Yunjin et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical reviews*, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

MARICHAL, Patrick et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*, v. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999.

MEHER, P. K. et al. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42362, 2017.

NIARCHOU, A. et al. C-PAmP: Large Scale Analysis and Database Construction Containing High Scoring Computationally Predicted Antimicrobial Peptides for All the Available Plant Species. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e79728, 2013.

PARSLOW, Ben Y.; THORNTON, Christopher R. Mudanças contínuas na epidemiologia e na suscetibilidade aos antifúngicos destacam a necessidade de um melhor controle da candidíase invasiva. *Microorganismos*, v. 10, n. 6, pág. 1208, 2022.

RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; RICHARDSON, Malcolm D. Systemic fungal infections. *Medicine*, v. 49, n. 12, p. 760-765, 2021.

R. Pereira, R.O. dos Santos Fontenelle, E.H.S. de Brito, S.M. de Moraes. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 131, Issue 1, 1 July 2021, Pages 11–22.

REVIE, Nicole M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current opinion in microbiology*, v. 45, p. 70-76, 2018.

Reales-Calderón, J.A.; et al. The fungal resistome: a risk and an opportunity for the development of novel antifungal therapies. *Future Med Chem*. 2016, 8(12):1503-20.

RAMAGE, Gordon , fungal biofilm resistance, *international Journal of Microbiology*  
Volume 2012,

SHARMA, A. et al. Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. *BMC Bioinformatics*, v. 15, n. 1, p. 282, 2014.

SEGEV-ZARKO, L. et al. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, v. 468, n. 2, p. 259–270, 1 jun. 2015.

SHANG, Dejing et al. Synergistic antibacterial activity of designed Trp-containing antibacterial peptides in combination with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2719, 2019.

- SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.
- SWEDAN, Samer; SHUBAIR, Zaina; ALMAAYTAH, Ammar. Synergism of cationic antimicrobial peptide WLBU2 with antibacterial agents against biofilms of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, v. 12, 2019.
- WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 1, p. D1087–D1093, 2016.
- ZARNOWSKI, Robert et al. Coordination of fungal biofilm development by extracellular vesicle cargo. *Nature communications*, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2021.