UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular

MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2021

MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

“Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

ARARAQUARA- SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Brasil, Maria Carolina Oliveira de Arruda
B823p Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular / Maria Carolina Oliveira de Arruda Brasil. – Araraquara : [s.n.], 2021
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Farmacorresistência bacteriana. 2. Antibióticos peptídicos. 3. Dímeros. 4. Mecanismo de ação (Bioquímica). 5. Agentes antibacterianos. I. Título.

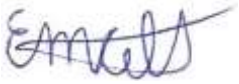
Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

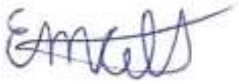
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys11/Lys12/Lys13-(p-BthTX-I)2K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular"

AUTORA: MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL
ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN (Participaçao Virtual)
Unidade Acadêmica Ciências da Saúde / Universidade Federal de Goiás - UFG - Jataí

Prof. Dr. GUILHERME RAMOS OLIVEIRA E FREITAS (Participaçao Virtual)
Instituto de Genética e Bioquímica / Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Patos de Minas

Araraquara, 28 de junho de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, família, amigos e aos meus colegas de trabalho...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força nos momentos difíceis, discernimento nos momentos de confusão e por ter guiado todos os meus passos até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por ter me dado a chance de integrar ao seu grupo de pesquisa desde o meu estágio na faculdade. Pelo incentivo de não desistir e fazer o mestrado, pelas broncas necessárias que só me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora, e por todo ensinamento passado.

Aos meus pais Maria Lúcia e Floriano por e terem dado força para seguir com o meu sonho de ser uma pesquisadora a vocês eu dedico todo este trabalho.

Ao meu coorientador o Prof. Dr. Norival Alves Santos-Filho por todo o suporte prestado e ensinamentos passados.

Aos meus irmãos Floriano e Pedro que sempre me deram força e alívio nos momentos de turbulência.

A todos os meus colegas de Laboratório Mariana, Paulo, Júlia, Jaff, Leticia, Sarah, Natália Costa, Natália Vitória, Marina, Augusto e Luani, por compartilharem o seu companheirismo, fazendo com que o trabalho fosse mais fácil e divertido.

Aos meus amigos Caio, Luiza, Letícia, Eduarda, Jéssica, Milayde por sua amizade e por todo o apoio.

Aos professores Dra. Cristiane Duque da Faculdade de Odontologia da Unesp Araçatuba, Dr. João Martins Pizauro Junior da Unesp campus Jaboticabal e Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo por disponibilizarem seus laboratórios para a realização dos testes biológicos.

A Unesp e ao Instituto de Química por fornecerem toda a estrutura necessária e pelo aprendizado.

A CAPES pela bolsa concedida, processo n° 88887.358023/2019-00.

“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois, o amanhã pertence as pessoas que se preparam hoje (Malcon X)”.

RESUMO

A resistência de microrganismos aos antibióticos é uma preocupação que vem crescendo à nível mundial, diversas cepas bacterianas com resistência a certas classes de quimioterápicos têm sido encontradas. A procura de alternativas para o tratamento de bactérias resistentes tem estimulado o estudo de novas classes de moléculas, como os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os peptídeos Hy-a1 e desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K são exemplos de PAMs trabalhados por nosso grupo. O Hy-a1 possui o seu mecanismo de ação que consiste na permeabilização da membrana mediante a formação de poros; enquanto o peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K (p-Bt) apresenta um mecanismo diferente, não agindo diretamente na membrana. Com o objetivo de potencializar os efeitos antimicrobianos destes peptídeos, essas sequências foram conjugadas e sintetizadas utilizando-se a metodologia da síntese de peptídeos em fase sólida, na presença ou não de espaçadores. Os peptídeos obtidos não apresentaram atividade antimicrobiana potencializada em relação aos peptídeos originais, com exceção do p-Bt[PEG]Hy-a1, peptídeo conjugado com um espaçador PEG, que contra a cepa *A. jandaei* IA1 mostrou CIM de 15,63 µg/mL. O peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K também foi conjugado com os peptídeos de penetração celular (PPC) AIP-6 (PPC$_1$), PFV (PPC$_2$) e HIV-TAT (47-57) (PPC$_3$), descritos na literatura como bons carreadores em membranas celulares. Os resultados obtidos mostraram que a conjugação potencializou a atividade contra bactérias Gram-positivas, com destaque para o peptídeo p-Bt-PPC$_1$ que apresentou CIM de 8 µM. Esse aumento na atividade antibacteriana provavelmente é propiciado pela facilidade da entrada do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K no interior da bactéria e sua ligação ao alvo. Estudos adicionais são necessários para entender o mecanismo de ação do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K, uma promissora molécula no combate às bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Peptídeos antimicrobianos; desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K; Peptídeos de penetração celular.

ABSTRACT

The resistance of microorganisms to antibiotics is a growing concern worldwide, and several bacterial strains with resistance to certain classes of drugs have been found. The search for alternatives for the treatment of resistant bacteria has stimulated the study of new classes of molecules, such as antimicrobial peptides (AMPs). The peptides Hy-a1 and desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K are examples of PAMs worked on by our group. Hy-a1 has its mechanism of action that consists in the permeabilization of the membrane through pore formation; while the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K (p-Bt) peptide presents a different mechanism, not acting directly on the membrane. In order to potentiate the antimicrobial effects of these peptides, these sequences were conjugated and synthesized using the methodology of solid phase peptide synthesis, in the presence or absence of spacers. The peptides obtained did not show enhanced antimicrobial activity compared to the original peptides, with the exception of p-Bt[PEG]Hy-a1, peptide conjugated with a PEG spacer, which against A. jandaei IA1 strain showed MIC of 15.63 µg/mL. The desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide was also conjugated with the cell-penetrating peptides (PPC) AIP-6 (PPC$_1$), PFV (PPC$_2$) and HIV-TAT (47-57) (PPC$_3$), described in the literature as good carriers in cell membranes. The results obtained showed that the conjugation potentiated the activity against Gram-positive bacteria, especially for the p-Bt-PPC$_1$ peptide, which showed an MIC of 8 µM. This increase in antibacterial activity is probably propitiated by the ease of entry of the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide into bacteria and its binding to the target. Further studies are needed to understand the mechanism of action of the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide, a promising molecule in the fight against multidrug-resistant bacteria.

Key-words: Bacterial resistance; Antimicrobial peptides; desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K; Cell penetrating peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....19
Figura 2 - Mecanismo de ação dos peptídeos de penetração celular. 22
Figura 3 - Formação da ligação peptídica. 25
Figura 4 - Desenho representando o protocolo geral da síntese peptídica utilizada nesse trabalho.....26
Figura 5 - Estratégia de síntese utilizada nesse trabalho: a) com Hilina-a1; b) com PPC.....27
Figura 6 - Espectro de massas do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 34
Figura 7 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-Hy-a1.....35
Figura 8 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 35
Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Cys-Bt-Hy-a1. 36
Figura 10 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-Hy-a1 36
Figura 11 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt[PEG]Hy-a1. 37
Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro Cys-Bt-Hy-a1. 38
Figura 13 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-Hy-a1 38
Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt[PEG]Hy-a1.....39
Figura 15 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_1 40
Figura 16 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_2.....41
Figura 17 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_3.....41
Figura 18 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_1. 42
Figura 19 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_2. 43
Figura 20 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_3. 43
Figura 21 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_1 44
Figura 22 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_2. 44
Figura 23 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_3. 45
Figura 24 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt. 47
Figura 25 - Espectros de CD do peptídeo Hy-a1. 47
Figura 26 - Espectros de CD do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1. 48
Figura 27 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-Hy-a1. 48
Figura 28 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt[PEG]-Hy-a1.....49
Figura 29 - Espectros de CD do peptídeo PPC_1.....50
Figura 30 - Espectros de CD do peptídeo PPC_3.....50

Figura 31 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC_1. 51
Figura 32 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC_2. 51
Figura 33 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC_3. 52
Figura 34 - Atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 59
Figura 35 - Atividade hemolítica em eritrócitos de peixes dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 59
Figura 36 - Atividade hemolítica dos peptídeos PPC_2 e p-Bt-PPC_2. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das cepas oriundas da piscicultura. 30
Tabela 2 - Sequências e códigos dos bioconjugados peptídicos produzidos no projeto. 33
Tabela 3 - Rendimento da etapa sintética dos peptídeos conjugados com a Hy-a1. 34
Tabela 4 - Rendimento da clivagem dos peptídeos conjugados com o peptídeo Hy-a1. 34
Tabela 5 - Condições de purificação dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 37
Tabela 6 - Rendimentos das sínteses dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 40
Tabela 7 - Rendimento da etapa de clivagem dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 40
Tabela 8 - Condições e resultados obtidos da purificação dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 42
Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 53
Tabela 10 - Atividade dos peptídeos Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 em bactérias relacionadas à piscicultura. 55
Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3 57
Tabela 12 - HC50 dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt-Hy-a1 em eritrócitos humanos e de peixes 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA 12
1.1.1 Bactérias patogênicas de humanos. 14
1.1.2 Infecções bacterianas na psicultura. 15
1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS 16
1.3 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR 20
2 OBJETIVOS 24
2.1 OBJETIVO GERAL 24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA 25
3.2 CLIVAGEM DOS PEPTÍDEOS 27
3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS 28
3.4 DICROÍSMO CIRCULAR 28
3.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA 28
3.5.1 Atividade antimicrobiana 29
3.5.2 Atividade hemolítica 30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
4.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA 32
4.2 DICROÍSMO CIRCULAR 45
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA 52
4.3.1 Atividade antimicrobiana 52
4.3.1.1 Atividade antimicrobiana dos conjugados Cys- e p-Bt/Hy-a1 52
4.3.1.2 Atividade antimicrobiana do peptídeo conjugado p-Bt com PPCs 54
4.3.2 Atividade hemolítica 57
4.3.2.1 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com Hy-a1 57
4.3.2.2 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com PPCs 60
5 CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Desde a sua descoberta, os antibióticos vêm tendo um papel essencial na prevenção de bacteremias como nos casos de transplantes, tratamento pós-cirúrgicos, pacientes com insuficiência renal em diálise e infecções microbianas (MANEGE; LIYANAGE, 2019; GONZÁLEZ-BELLO, 2017). Dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstraram que em cada grupo de 1.000 habitantes no ano de 2016; 22,75 habitantes faziam uso de antibióticos diariamente no Brasil, contabilizando 2.225 toneladas (WHO, 2018). Além de serem amplamente utilizados em humanos, os antibióticos também são empregados na prevenção e tratamento de doenças microbianas em animais (MANEGE; LIYANAGE, 2019). Estima-se que, a quantidade de antibióticos empregadas no mundo seja entre 100.000 a 200.000 toneladas ao ano (ZHU et al., 2018).

O uso de antibióticos de forma descontrolada nas indústrias de esterco e aquicultura, para a prevenção de doenças e promoção do crescimento dos animais; conjuntamente com o aumento das prescrições médicas para este tipo de medicamento, tem propiciado o surgimento de patógenos resistentes a múltiplas drogas. Isso causa infecções de difícil tratamento pelos antimicrobianos convencionais e disponíveis comercialmente, gerando uma grande ameaça à saúde humana e animal (AWASTHI et al., 2019; BEN et al., 2018; FRIERI et al., 2017). O número de patógenos bacterianos resistentes aos antimicrobianos atingiu níveis alarmantes, sendo encontrados em diversos países, independente do estágio de desenvolvimento, o que resulta em tratamentos mais complexos e procedimentos médicos mais invasivos (D' ANDREA et al., 2019; WHO, 2019). As doenças causadas por essas cepas resistentes causam globalmente mais de 700.000 mortes por ano, sendo 230.000 por tuberculose multirresistente. Estima-se que este número possa aumentar para 10 milhões de mortes ao ano até 2050 (O'NEILL, 2014; WHO, 2019).

A resistência aos antimicrobianos é a capacidade de o microrganismo ser viável e sobreviver sob a influência dos mesmos. Os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos e semissintéticos. As utilizações destas moléculas podem causar alterações em nível fisiológico e metabólico, modificações na síntese da parede celular, inibição

da síntese de proteínas, inibição de vias metabólicas e interferência na tradução e replicação do DNA bacteriano (ABUSHAHEEN et al., 2020).

Existem três formas principais pelas quais os microrganismos adquirem resistência aos antimicrobianos: intrínseca, adaptativa e adquirida. As duas últimas são descritas como formas extrínsecas de obtenção de resistência (ARZANLOU et al., 2017; TINTINO et al., 2015). A resistência intrínseca ou natural, se refere a capacidade de limitar a ação dos antimicrobianos devido às propriedades inerentes das bactérias (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020).

A resistência adaptativa ocorre quando o organismo possui uma capacidade de se adaptar e sobreviver as condições de estresse do ambiente, como pH, condições nutricionais e níveis subinibitórios de antibióticos. Isso ocorre por meio da alteração de seus transcriptomas em resposta aos estímulos ambientais (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020). Diferente da resistência intrínseca e da resistência adquirida, a resistência adaptativa é transitória. É ela que permite que os microrganismos criem um mecanismo de defesa mais rápido aos antibióticos, porém ao não ter mais a influência do agente indutor, a bactéria retorna ao seu metabolismo natural (CHRISTAKI et al., 2020).

A resistência adquirida ocorre quando um organismo que é naturalmente suscetível aos antibióticos se torna resistente por conta da aquisição de genes ou por mutações por meio de fontes exógenas (transferência horizontal de genes) (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020). A transferência horizontal de genes ocorre por meio de três mecanismos principais: 1) transformação, que é recombinação de material genético, como a incorporação de fragmentos de DNA livres de um microrganismo morto ao cromossomo; 2) transdução, a qual consiste na transferência de material genético através de um bacteriófago; 3) conjugação, que consiste no contato célula a célula através de píli sexual, usando elementos genéticos móveis como os plasmídeos e os transposons, para transpassar genes. Porém o método mais eficiente para a acumulação de genes de resistência é representado pelos “integrons”, que são sistemas de recombinação sítios-específicos que podem recrutar quadros de leituras abertos na forma de cassete de genes móveis (CHRISTAKI et al., 2020; MUNITA; ARIAS, 2016). As mutações propiciadas por essas alterações podem afetar os mecanismos de ação de antimicrobianos por meio da mudança do seu alvo molecular, diminuindo a afinidade pela droga; ativando a bomba

de efluxo que elimina da célula a molécula ativa; ou mudando as vias metabólicas essenciais por meio de modulação de redes regulatórias (MUNITA; ARIAS, 2016).

1.1.1 Bactérias patogênicas de humanos.

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva coagulase negativa, que é encontrada na microbiota nasal e cutânea. Esta é considerada um patógeno oportunista, pois está relacionada com infecções nosocominais associadas a dispositivos médicos, como cateteres, válvulas cardíacas, implantes prostéticos e enxertos vasculares, principalmente em pacientes jovens e adultos imunocomprometidos (QI et al., 2018; BOTTAGISIO et al., 2020; SÁNCHEZ et al., 2020).

O patógeno Gram-positivo *Staphylococcus aureus* é frequentemente relacionado às infecções que afetam humanos e animais, como as cutâneas, endocardite, artrite séptica, pneumonia e sepse, entre outras; agindo ao nível hospitalar e comunitário. Devido as prescrições inadequadas de antibióticos é possível encontrar cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), daptomicina (DRSA), β-lactâmicos e meticilina (MRSA) seus derivados (GONÇALVES et al., 2019; WU et al., 2019).

A bactéria oportunista Gram-positiva e anaeróbia facultativa *Enterococcus faecalis* é normalmente encontrada no trato gastrointestinal e urinário de animais e humanos. Essa bactéria é frequentemente transmitida por contaminação fecal, sendo causadora de septicemia, endocardite, infecções do trato urinário, peritonite e meningite por infecção na corrente sanguínea e feridas (NAHA et al., 2020; WEN et al, 2020). Atualmente são encontradas cepas de *E. faecalis* que apresentam resistência adquirida e intrínseca à diversos antibióticos comumente utilizados, como os macrolídeos e aminoglicosídeos, incluindo cepas resistentes a linezolida (LZD) e à vancomicina (VAN) (WEN et al. 2020).

O microrganismo Gram-negativo *Escherichia coli* é normalmente encontrado no trato digestivo de animais e humanos, no entanto algumas cepas podem causar infecções no trato gastrointestinal, urinário (ITU) e do sítio cirúrgico, síndrome hemolítica-urêmica (SHU), pneumonia e sepse (DAGA et al., 2019; SAROWSKA et al., 2019).

1.1.2 Infecções bacterianas na psicultura.

Embora o uso de antimicrobianos no tratamento contra microrganismos que afetam o ambiente aquático seja eficaz, a utilização destes compostos acaba gerando grande quantidade de resíduos, o que acarreta risco de desenvolvimento de resistência microbiana, afetando não apenas os organismos aquáticos, mas também aves e mamíferos (FERNANDES et al., 2019). Desta forma, a contribuição da aquicultura na resistência aos antimicrobianos deve ser controlada (LOZANO-MUÑOZ et al., 2021).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe comerciais mais importantes do mundo anualmente são produzidas 4,5 milhões de toneladas, com uma receita de 7,5 bilhões de dólares. Porém, as perdas econômicas geradas por cepas bacterianas na produção mundial desse peixe estão na ordem de 40 milhões de dólares anuais, o que representa uma grande ameaça a indústria da piscicultura (ETO et al., 2020).

Aeromonas hydrophilia (Ah) é uma das bactérias que afetam a piscicultura. Pertencente à família *Aeromonodaceae,* ela é Gram-negativa, anaeróbia facultativa, possui forma de bastonete, não formadora de esporo e com flagelos polares e cápsula móvel. Na tilápia do Nilo, a infecção causada pela Ah caracteriza-se por lesões hemorrágicas nas nadadeiras e úlceras na pele, e a sua disseminação nos tecidos causa, inflamação, necrose e falência de múltiplos órgãos (FERNANDES et al., 2019).

A Ewardsielose é uma doença causada pela bactéria Gram-negativa *Edwardsiella tarda*, a qual possui forma de bastonete. Ela afeta várias espécies de peixes economicamente importantes, promovendo grandes perdas econômicas. Os principais sintomas que caracterizam a infecção por este tipo de bactéria são a inflamação sistêmica, septicemia e, nos quadros graves, a morte (PHUMKHACHORN; RATTANACHAIKUNSOPON, 2018.).

Citrobacter freundii é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Sua patogenicidade tem sido associada a surtos de doenças em peixes cultivados, resultando em grandes perdas para a aquicultura devido a mortalidade e a baixa produtividade (JUNIOR et al., 2018; JIANG et al., 2020). Ela está associada as doenças encontradas na tilápia do Nilo (*O. niloticus*); no bagre (*Pseudoplatystoma reticulatum*); e na tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) (JUNIOR et al., 2018).

Na indústria da aquicultura o *Streptococcus agalactiae* é considerado um patógeno importante, que também causa graves perdas econômicas globais (DONG et al., 2020). *S. agalactiae* é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada em peixes de água doce e salgada, sendo infecciosa em peixes, anfíbios, mamíferos, répteis, pássaros e humanos. Ela pode causar sepse, pneumonia e meningite em humanos, animais terrestres e peixes (WANG et al., 2018; DONG et al., 2020).

Lactococcus garvieae é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, de cocos ovoide, não móvel e causadora de meningoencefalite e septicemia fatal em animais, peixes e humanos (BWALYA et al., 2020; SHAHI; MALLIK, 2020). Os sinais clínicos em peixes incluem natação errática, anorexia, exoftalmia, conjuntivite, peritonite, melanose, congestão dos vasos sanguíneos e hemorragia interna (SHAHI; MALLIK, 2020).

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos vêm se tornando nas últimas três décadas candidatos para aplicações na área médica (GRECO et al., 2020; MAHLAPUU, et al., 2016), na aquicultura, na agricultura e na indústria alimentícia, entre outras (SEYFI et al.,2020).

Com a crescente resistência dos microrganismos aos antibióticos tradicionais, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido avaliados como alternativa de tratamento para as infecções bacterianas (GRECO et al., 2020). Atualmente mais de 3.000 PAMs se encontram identificados no antimicrobial peptides database (ADP), e mais de 10.000 artigos foram publicados em 2019 sobre os PAMs, sendo que 36 sequências se encontram em fase pré-clínica ou clínica de estudo. Destas, sete têm aprovação para aplicação clínica pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, sendo estes oritavancina, colistina, vancomicina, gramicidina D, dalbavancina, telavancina e daptomicina (KRISHNAN et al., 2020; LI et al., 2020; WANG, 2020).

Os PAMs podem ser encontrados em diversos organismos como insetos, plantas, peixes, bactérias e mamíferos, pois são componentes importantes da imunidade natural. Estes podem ser utilizados como antibacterianos, antivirais, antiparasitários e antifúngicos, fazendo com que se tornem compostos especialmente interessantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MAHLAPUU, et al., 2016; SEYFI et al., 2020). Diferente dos antibióticos tradicionais, boa parte dos PAMs rompe a membrana celular tornando a célula inviável. Esse modo de ação torna

difícil o desenvolvimento de resistência, já que são necessárias diversas mutações para que ocorra a alteração dos componentes da membrana celular (LEI et al., 2019). Os PAMs são oligopeptídeos contendo entre 10 a 50 resíduos de aminoácidos, catiônicos (com duas ou mais cargas positivas), anfipáticos (quase 50% de seus aminoácidos são hidrofóbicos), e na grande maioria das vezes possuem estrutura helicoidal (CRUSCA et al., 2010; LEÓN-CALVIJO et al., 2015; MISHRA et al.,2018). Além dos PAMs que possuem estrutura em α-hélice, de acordo com suas características estruturais os PAMs podem ser classificados em outros 3 grupos: 1) ricos em cisteínas e folhas β estabilizadas por duas ou quatro ligações de dissulfeto; 2) PAMs contendo “loops” formados por uma única ligação de dissulfeto e; 3) PAMs com estruturas estendidas ricas em arginina, histidina, glicina, prolina e/ou triptofano (HANCOCK; SAHL, 2006; SANTOS-FILHO et al., 2017).

Os peptídeos α-helicoidais em solução se encontram estendidos ou não estruturados, mas ao terem contato com os fosfolipídeos anfipáticos da membrana se tornam helicoidais. Já os peptídeos com estrutura em folha β são normalmente muito mais ordenados em soluções aquosas e ambientes de membrana (TRAKOVA et al., 2017).

O principal mecanismo de ação dos PAMs é a permeabilização seguida pelo rompimento da membrana (CIUMAC et al., 2019). Para a interação do peptídeo com a célula temos como primeira etapa, o contato com a membrana aniônica por meio da interação eletrostática dos resíduos catiônicos dos peptídeos, com subsequente interação hidrofóbica entre as cadeias acila dos lipídeos e os resíduos apolares da sequência peptídica (LEI et al., 2021). Os mecanismos de ação na membrana são complexos, já que a sua atividade e seletividade celular dependem dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos e também das membranas alvo (KUPPUSAMY et al., 2019). Além da ação na membrana, estes peptídeos podem atuar em alvos moleculares específicos, promovendo perturbação nas vias metabólicas e agindo nos componentes citoplasmáticos essenciais dos microrganismos, como o DNA e RNA, proteínas e enzimas (CIUMAC et al., 2019).

Vários modelos foram propostos para explicar a forma que os PAMs estruturados em α-hélice anfipática rompem as membranas, sendo alguns descritos abaixo. No modelo conhecido como barril, após a interação inicial com a superfície da membrana e estruturação, a face hidrofóbica do peptídeo interage com a cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios e a sua superfície hidrofílica fica orientada para dentro do

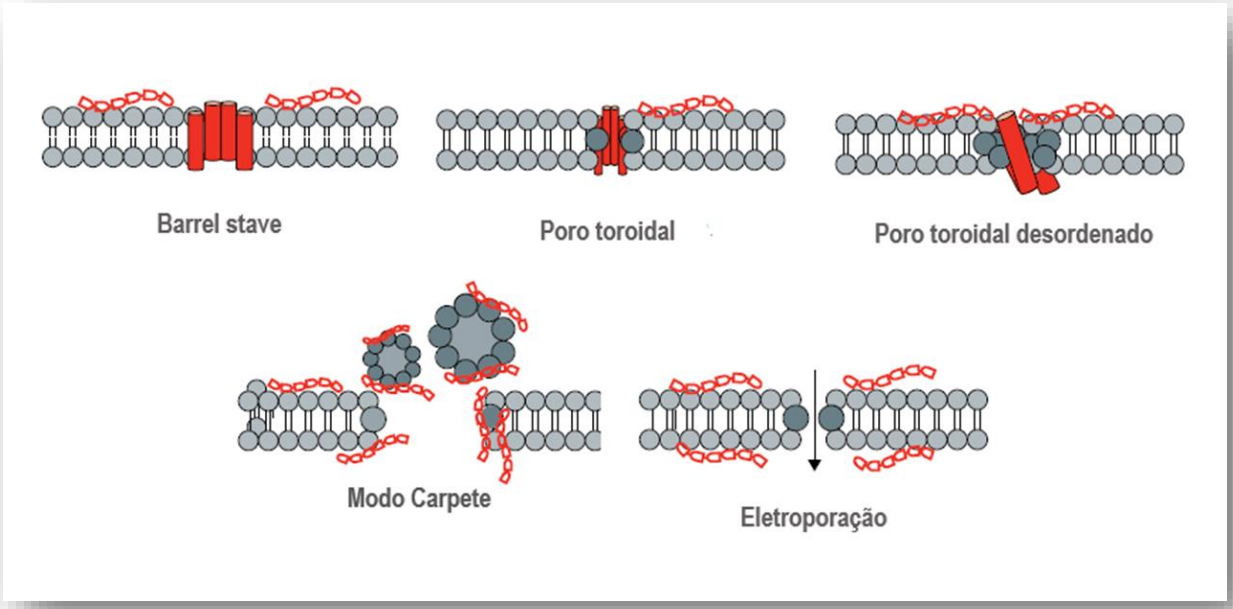
barril, formando poros (LORENZON, et al., 2019). No modelo toroidal, as moléculas dos peptídeos são adsorvidas e associadas à superfície da camada lipídica, e após mudança conformacional e forte interação com os lipídeos, poros formados de peptídeos e lipídeos são constituídos, contento em seu interior a face polar dos peptídeos e as cabeças polares dos lipídeos (KUPPUSAMY et al., 2019; CIUMAC et al., 2019). Um outro tipo de poro toroidal encontrado é o poro toroidal desordenado, o qual consiste em um poro semelhante ao anterior, mas não muito bem ordenado e com alta entropia (LORENZON, et al., 2019). O modelo de eletroporação propõe a formação de orifícios instáveis na membrana alterando a carga da mesma, o que muda o potencial da membrana e leva a lise celular (SEYFI et al., 2020). Outro mecanismo bem aceito é o modelo “tipo carpete” ou “tipo detergente”, onde os peptídeos se acumulam na superfície da bicamada lipídica, e quando se atinge uma “concentração limiar” ocorre a formação de agregados micelares, que exercem uma ação detergente e um processo de solubilização da membrana (figura 1) (LORENZON, et al., 2019; KUPPUSAMY et al, 2019; CIUMAC et al, 2019). De uma forma geral, cinco passos podem ser descritos na interação dos PAMs: 1) contato primário com as células alvos por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas; 2) ajuste estrutural na membrana alvo; 3) acúmulo até um nível estequiométrico ativo; 4) perturbação da membrana alvo por despolarização ou permeabilização, ou ainda por meio de qualquer outro mecanismo de ação, que pode ser transitório ou estável; e 5) acesso aos alvos finais e/ou a morte celular (MORAVEJ, 2018).

Além destes mecanismos, os PAMs também possuem ação contra biofilmes bacterianos (GALDIERO et al., 2019). Vários mecanismos são relatados dentre eles cinco são datados como principais: (1) degradação do polissacarídeo e da matriz do biofilme; (2) regulação negativa de genes responsáveis pelo transporte de proteínas de ligação e de genes responsáveis por biofilmes; (3) ruptura ou degradação do potencial de membrana de células incorporadas aos biofilmes principais; (4) inibição do sistema alarme para evitar a resposta bacteriana estringente; (5) interrupção dos sistemas de sinalização de células bacterianas (YASIR; WILLCOX; DUTTA, 2018).

Por mais que os PAMs apresentem diversos mecanismos de ação nos patógenos, incluindo a membrana celular, já são encontrados mecanismos de resistência (BECHINGER; GORR, 2017; CARDOSO et al., 2021). Esses envolvem a alteração de seu alvo (se específico) ou principalmente a hidrólise dos peptídeos e/ou remoção de seu local de ação. Estes mecanismos envolvem a secreção de proteases,

exportação dos peptídeos por bombas de efluxo, alteração da membrana citoplasmática e modificação de superfície, entre outros (CARDOSO et al., 2021). Entre as modificações nas membranas das células bacterianas temos como exemplo a acilação do grupo amino na cabeça do fosfatidil glicerol (CARDOSO et al., 2021). Um melhor entendimento destes mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novos PAMs com atividades terapêuticas (BECHINGER; GORR, 2017). Mesmo com a sua ação contra biofilmes eles também dificultam a ação dos PAMs, pois muitos não são capazes de adentrar nesta matriz, uma vez que os polissacarídeos capsulares e os exopolissacarídeos podem impedir a permeabilização por esta estrutura.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos



Adaptado de: MAGANA et al., 2020

Inúmeros PAMs vem mostrando resultados promissores como antimicrobianos. Um deles é o peptídeo dimérico ligado por ponte de dissulfeto $(p\text{-}BthTX\text{-}I)_2$ (sequência $[KKYRYHLKPFCKK]_2$) isolado da toxina BthTX-I, da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, que apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SANTOS-FILHO et al., 2015). O seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, no entanto, esse peptídeo aparentemente não age diretamente na

membrana bacteriana, não possuindo capacidade de permeabilizar vesículas, e atua diferentemente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SANTOS-FILHO et al., 2021). Adicionalmente, o nosso grupo mostrou que a retirada das duas lisinas situadas na região C-terminal desse peptídeo não promove perda de sua atividade antimicrobiana, sendo esse peptídeo foi obtido da degradação enzimática do peptídeo inicial (p-BthTX-I)$_2$ (SANTOS-FILHO et al., 2017). Outro experimento mostrou que o peptídeo dimerizado com um resíduo de lisina na extremidade C-terminal, em lugar dos resíduos de cisteína, peptídeo (desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K), apresenta atividade similar ou aumentada em relação ao dímero inicial (SANTOS-FILHO et al., 2018), sendo esse escolhido para ser avaliado nesse projeto.

Outro peptídeo utilizado nesse trabalho foi o Hilina a1 (Hy-a1) isolado de um sapo arborícola encontrado no Brasil chamado *Hypsiboas albopunctatus*, cuja sequência é IFGAILPLALGALKNLIK-NH$_2$. Essa molécula apresenta atividade contra bactérias e fungos. O seu modo de ação foi atribuído a formação de poros na membrana do microrganismo, causando assim a destruição do mesmo (CASTRO et al., 2009; CRUSCA et al., 2010). Desta forma, temos dois peptídeos com mecanismo de ação diferentes, e a conjugação entre eles poderia proporcionar a obtenção de moléculas mais ativas.

1.3 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR

A lipofilicidade da biomembrana celular é um obstáculo no processo de penetração de fármacos que agem no interior da célula, sendo que muitas drogas não conseguem atingir completamente o seu alvo. Para contornar esse problema, muitos métodos vêm sendo desenvolvidos, como a perturbação da membrana, a utilização de nanocarreadores e utilização de peptídeos de penetração celular (PPCs), entre outros (GUI et al., 2020).

Os PPCs são uma família de peptídeos naturais ou sinteticamente obtidos e que são capazes de atravessar a membrana biológica por meio de processos dependentes ou independentes de energia (NEUNDORF, 2019; BÖHMOVÁ et al., 2018). Comparados com outras técnicas de translocação, os PPCs adentram as células de forma não invasiva e sem destruir a integridade das membranas, sendo considerados seguros e eficientes (RUSESKA; ZIMMER, 2020). A eficiência dos PPCs varia de acordo com sua estrutura, do tipo da célula alvo, da temperatura, da

concentração e tempo de exposição (BÖHMOVÁ et al., 2020). Os PPCs possuem uma sequência relativamente pequena, de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, e sua conformação e estrutura química são altamente variáveis (BÖHMOVÁ et al., 2018; NEUNDORF, 2019; WATKINS et al., 2019). A aplicação desses peptídeos envolve o carreamento para o interior da célula de diversos tipos de moléculas, como outros peptídeos, proteínas, DNA, RNA, lipossomas, nanopartículas ou pequenas drogas orgânicas (NEUNDORF, 2019).

A taxonomia unificada destes peptídeos não existe, mesmo que vários critérios diferentes foram propostos com base na origem, sequência, função ou mecanismo de ação dos PPCs (GUIDOTTI et al., 2017; DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). No entanto, eles podem ser categorizados em três subclasses: catiônicos, hidrofóbicos e anfipáticos (DASALE et al., 2020).

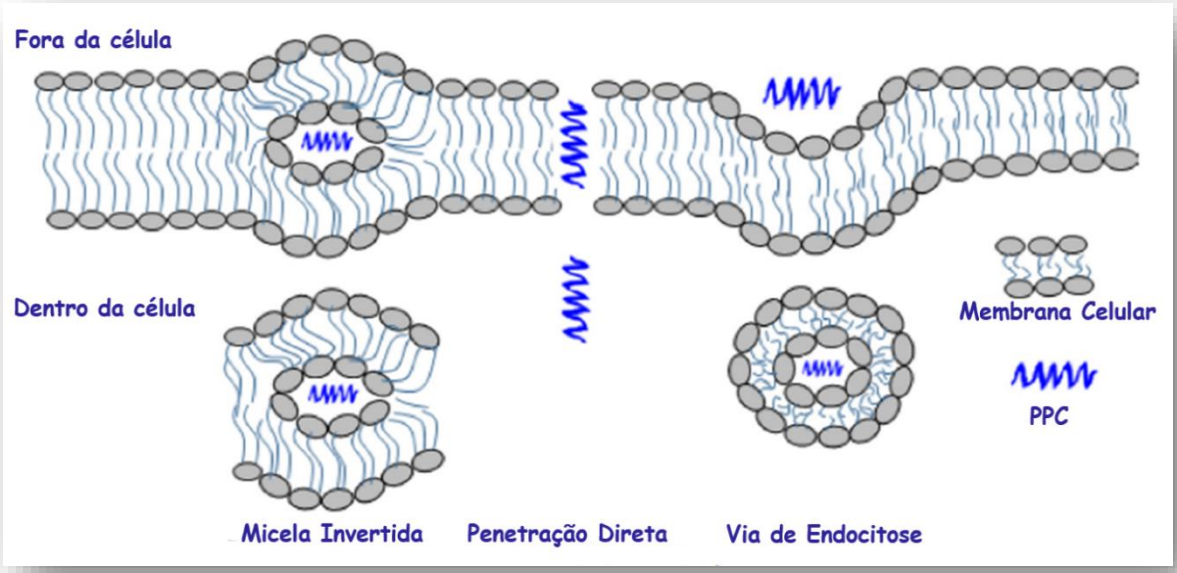
Os PPCs de classe catiônica consistem em peptídeos que contém grande quantidade de cargas positivas em pH fisiológico, possuindo em sua sequência múltiplos resíduos de lisinas e argininas (BÖHMOVÁ et al, 2018; DASALE et al., 2020; GUIDOTTI et al., 2017). A classe anfipática possui em sua sequência regiões polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas) (BÖHMOVÁ et al., 2018; DASALE et al., 2020). Já os PPCs de classe hidrofóbica possuem aminoácidos hidrofóbicos em grande quantidade, como a leucina, alanina, isoleucina, triptofano, metionina e fenilalanina (BÖHMOVÁ et al., 2018). A alta hidrofobicidade de sua sequência possui alta afinidade com a parte hidrofóbica das membranas celulares, permitindo a interação e o carreamento (GUIDOTTI et al., 2017).

Com base em sua origem os PPCs podem ser divididos em sintéticos, derivados de proteínas e quiméricos. O PPC da família da poliarginina possui a arginina como um único componente estrutural sendo assim, um representante dos peptídeos sintéticos. Como exemplo de PPCs derivados de proteínas naturais, encontramos a penetratina e o HIV-TAT (47-57). OS PPCs quiméricos são compostos por dois ou mais motivos de peptídeos diferentes, tendo como um exemplo o “transportan” que é um peptídeo quimérico derivado da galanina e do mastoparan (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018).

Embora cada PPC possua mecanismos diferentes de internalização, a literatura descreve três como principais, sendo estes, a endocitose, a penetração direta e a translocação por meio da formação de uma estrutura transitória (micela invertida) (figura 2) (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). No processo de endocitose, os

PPCs são transportados para dentro da membrana em mecanismo dependente de energia. Nesse processo a membrana se dobra para dentro, afim de transportar componentes externos para o interior da célula (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). Já na penetração direta, o processo acontece independente de energia, podendo ocorrer mesmo em temperaturas baixas e na presença de inibidores endocitóticos. Os mecanismos aceitos nesse caso, são os mesmos dos peptídeos antimicrobianos que agem na membrana, mas os poros formados são transitórios (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018; GUIDOTTI et al, 2017).

Figura 2 - Mecanismo de ação dos peptídeos de penetração celular.



Adaptada de: DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018

Na translocação por meio da formação de uma estrutura transitória, ocorre o modelo de micela invertida, onde a interação do PPC com a membrana pode causar ruptura da bicamada lipídica, após a formação da estrutura invertida. Neste processo várias etapas ocorrem, entre elas, a captura dos PPCs do ambiente hidrofílico para o núcleo da micela, a interação da micela invertida com os componentes da membrana, a desestabilização das micelas e, por último, a liberação dos PPCs no citoplasma (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018).

O PPC hidrofóbico “PFV” de sequência PFVYLI é um peptídeo derivado do peptídeo C105Y de sequência CSIPPEVKFNKPFVYLI que corresponde aos resíduos 359-374 da α1-antripsina (RHEE; DAVIES, 2005). O PFV já foi utilizado para carrear siRNA, peptídeos pró-apoptóticos e sondas fluorescentes em diversas linhas celulares diferentes (CAI et al., 2013). O peptídeo catiônico HIV-TAT (47 a 57) de sequência YGRKKRRQRR é um peptídeo derivado da proteína de ligação e transativação do RNA (TAT) do vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV-1). Ele é capaz de mediar a entrada de muitas macromoléculas biológicas exógenas nas células através de sua membrana (ZOU et al., 2017; GUI et al., 2020). Outro peptídeo com capacidade de penetração celular é o anti-inflamatório 6 (AIP-6) que é catiônico de sequência KRLRWR. Além de sua capacidade intrínseca de penetração celular o peptídeo já demonstrou em estudos *in vitro* e *in vivo* efeitos anti-inflamatórios significativos (WANG et al., 2011).

O desenvolvimento de novas moléculas visando o sistema de distribuição de drogas pode ser uma abordagem a ser utilizada para permitir a administração de PAMs, mantendo a sua atividade contra alvos específicos, aumentando o seu tempo de meia-vida e diminuindo efeitos tóxicos (SANTOS-FILHO et al., 2021). Por isso conjugamos o peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K, que aparentemente é específico a um alvo intracelular, com os PPCs citados acima para auxiliar a entrada do peptídeo na célula e otimizar a sua atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar, e avaliar as atividades antimicrobianas dos peptídeos conjugados desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(Hy-a1), na presença ou não de espaçadores, e desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-PPCs.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

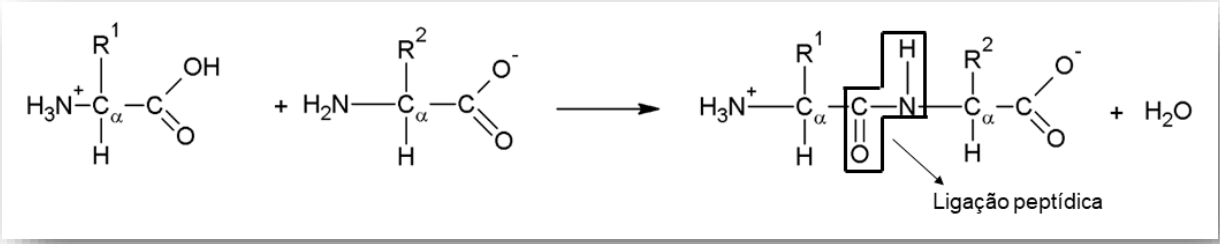
- Síntese e purificação dos peptídeos
  - (p-BthTX-I)$_2$K-(Hy-a1) - Cys-Bt-Hy-a1,
  - desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(Hy-a1) - p-Bt-Hy-a1,
  - desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-[PEG]-(Hy-a1) - p-Bt-[PEG]-Hy-a1,
  - desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(AIP-6) - p-Bt-PPC$_1$,
  - desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)-(PFV) - p-Bt-PPC$_2$,
  - desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(HIV-TAT(47-57)) - p-Bt-PPC$_3$.
- Caracterização dos peptídeos por meio de:
  - Cromatografia Líquida de Alta eficiência
  - Análise por espectrometria de massas
  - Dicroísmo Circular
- Avaliação biológica dos peptídeos por meio da:
  - Determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima em microrganismos patogênicos em humanos e peixes.
  - Atividade hemolítica em eritrócitos humanos e de peixes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Os peptídeos foram sintetizados utilizando a metodologia da síntese em fase sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963), a qual consiste no crescimento da cadeia peptídica, aminoácido por aminoácido, a partir da região C-terminal ligada covalentemente a um suporte polimérico inerte nas condições da síntese. Este suporte polimérico formado principalmente de estireno e divinilbenzeno solvata em solventes orgânicos e se expande conforme o peptídeo cresce (HANSEN; ODDO, 2015). A formação da ligação peptídica está apresentada na figura 3. Na síntese dos peptídeos desse projeto foram utilizados como suportes as resinas Rink Amida e Wang.

Figura 3 - Formação da ligação peptídica.

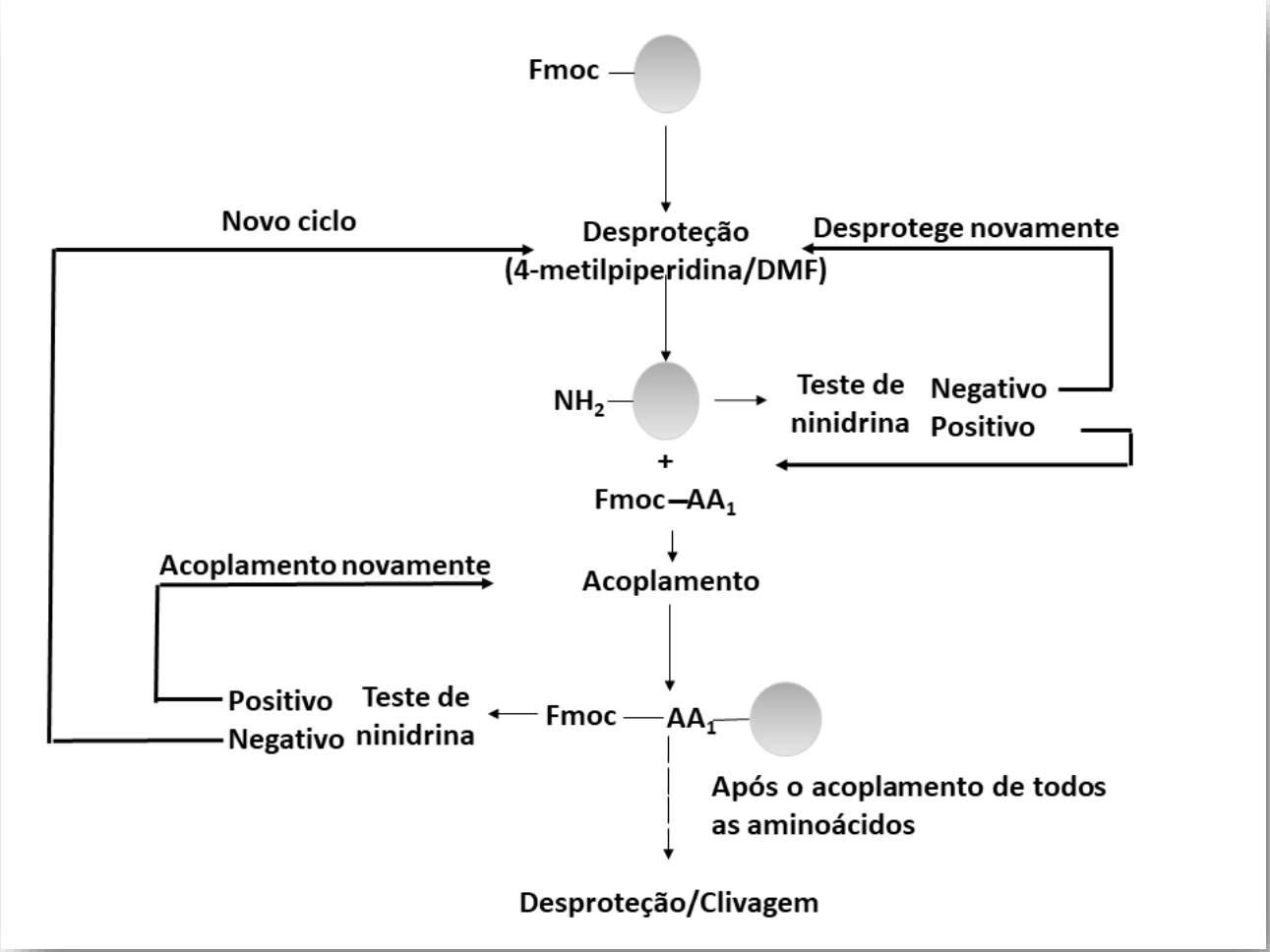


Fonte: Próprio autor.

A síntese começou com os peptídeos Hy-a1 ou PPCs. Os Fmoc-aminoácidos foram acoplados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação de diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-hidroxibenzotriazoil (HOBt). Todos os reagentes e os aminoácidos foram usados com três vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. O grupo Fmoc possui como característica ser base-lábil, sendo removido utilizando-se uma solução de 20% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) durante 1 e 20 minutos. O esquema de síntese utilizado está demonstrado na figura 4. Entre cada etapa foram realizadas 6 lavagens da resina para a retirada dos subprodutos da reação e excessos dos reagentes. Os solventes DMF e diclorometano (DCM) foram utilizados. Após cada etapa de acoplamento e desproteção foi realizado o teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). Esta solução quando em temperatura elevada, reage com os

grupamentos amino livres, gerando um composto de cor azul, fazendo com que a reação seja apropriada para indicar a eficiência de cada etapa da síntese.

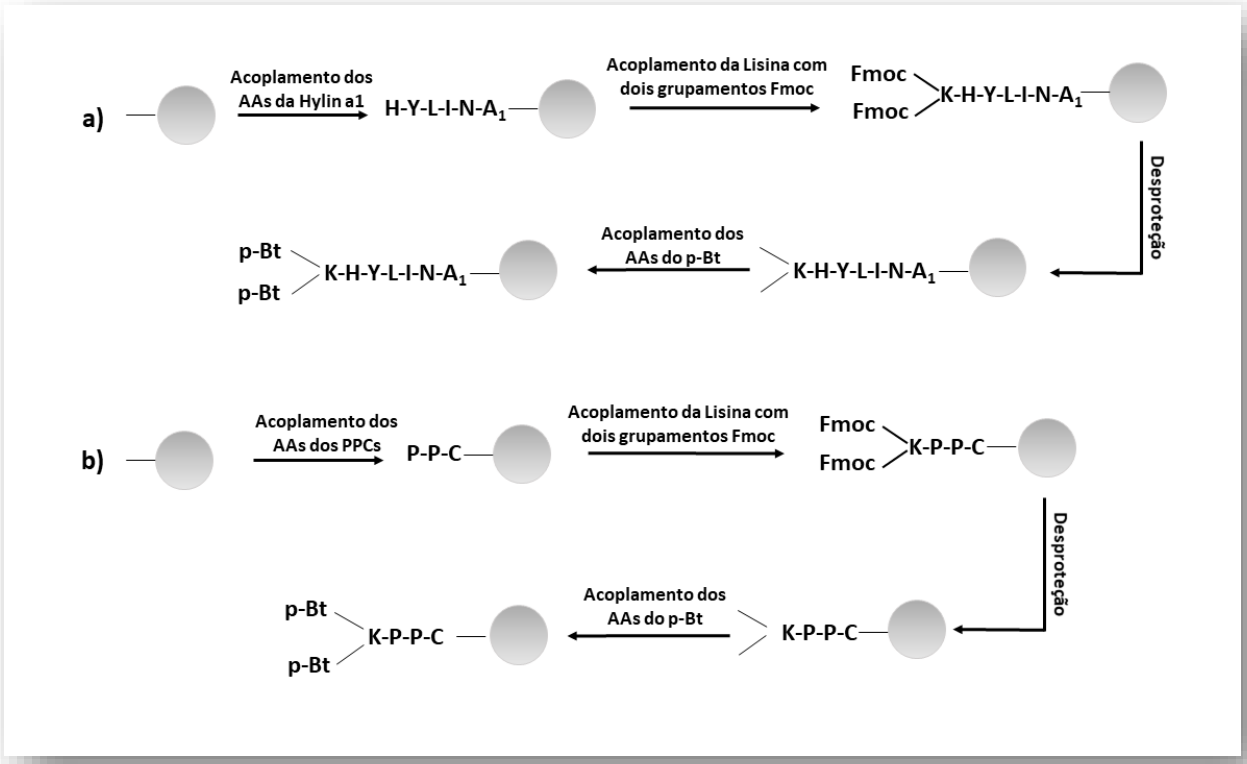
Figura 4 - Desenho representando o protocolo geral da síntese peptídica utilizada nesse trabalho.



Fonte: Próprio autor.

Ao fim da sequência de aminoácidos da Hy-a1 ou dos PPCs foi acoplado o resíduo de lisina protegido com dois grupos Fmoc em seus grupos amino. Esses grupos foram retirados com 20% de 4-metil-piperidina em DMF e o restante da síntese ocorreu concomitantemente nos dois grupos aminos para a obtenção da parte do peptídeo correspondente a sequência desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K (p-Bt). A estratégia de síntese dos peptídeos sintetizados Hy-a1 ou PPCs com o peptídeo dimérico p-Bt está representada na figura 5.

Figura 5 - Estratégia de síntese utilizada nesse trabalho: a) com Hilina-a1; b) com PPC.



Fonte: Próprio autor

3.2 CLIVAGEM DOS PEPTÍDEOS

Ao final da síntese foi feita a clivagem dos peptídeos da resina por meio da utilização de TFA contendo supressores de reações colaterais (*scavengers*). A proporção usada para o peptídeo desLys^{13}(p-Bth TX-I)$_2$K-Hy-a1 foi 94% de ácido trifluoracético (TFA); 2,5% de isopropilsilano (TIS); 2,5 % de H_2O e 1% de 1,2-etanoditiol (EDT); para os demais peptídeos foi usada a proporção 95% TFA; 2,5% de TIS e 2,5 % de H_2O. As reações foram conduzidas sob agitação moderada durante duas horas à temperatura ambiente. Ao término os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e lavados 3 vezes com esse solvente para eliminação de parte dos reagentes presentes na solução de clivagem. O precipitado obtido foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 50% de 0,045% de TFA em água e 0,036% de TFA em acetonitrila. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto.

3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A purificação dos produtos da síntese foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo utilizando uma coluna C18 AAPPTEC (25 cm x 1 mm e partícula de 5 µm). Durante as purificações foram recolhidas frações de aproximadamente 5 mL, e a pureza dessa determinada por CLAE analítica em uma coluna Ultraspehere Phenomnex C18 (tamanho 4,6 x 250 mm, tamanho da partícula de 5 µm). Os tubos que continham o material puro foram juntados e liofilizados.

As análises dos peptídeos foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. Realizou-se a infusão direta das soluções de amostra a uma concentração de aproximadamente 10 ppm em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5,0 µL/min e a fonte de eletrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de eletrospray.

3.4 DICROÍSMO CIRCULAR

Para o estudo estrutural dos peptídeos foi utilizada a espectroscopia de dicroísmo circular. Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 5 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. As soluções estoques dos peptídeos foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS), para posterior diluição. As soluções de peptídeos também foram preparadas em LPC (lisofosfatidilcolina) 1 mM e TFE (trifluoretanol) 60% em tampão.

O cálculo da elipticidade molar [θ] foi realizada utilizando a equação 1 (CASALLANOVO et al., 2006).

$$[\theta] = \frac{valor(em\ milidegree)}{(10.\ \ell.\ [\text{peptídeo}].n°\ de\ aa)} \quad \textbf{Equação 1}$$

O numerador é o valor obtido em milidegree pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico da cubeta utilizada (0,1 cm), [peptídeo] é a concentração em mol/L usada no experimento e o “n° de aa” é a quantidade de resíduos de aminoácidos presente na molécula.

3.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

3.5.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos peptídeos foi avaliada a partir dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM). Nesses ensaios foram utilizadas cepas bacterianas de importância clínica: *S. epidermidis* (ATCC 35984) resistente a meticilina, *S. aureus* (ATCC 25923) sensível a meticilina, *S. aureus* (ATCC 14458) portador da enterotoxina b, *E. coli* (ATCC 10536) e *E. faecalis* (ATCC 29212), e cepas encontradas na piscicultura: *A. hydrophila, A. jandaei*, *C. freundi*, *E. tarda*, *S. agalactiae*, *L. garvieai*. A identidade, o código de acesso às sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank, o hospedeiro e o local de isolamento das cepas oriundas da psicultura estão descritas na tabela 1.

Cada composto foi diluído em água e uma solução estoque concentrada foi preparada. Posteriormente a solução estoque foi diluída 1:10 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD) segundo o CLSI (WAYNE, 2011). Nas análises feitas com os peptídeos da conjugação p-Bt com a Hy-a1, em cepas que afetam os humanos, as concentrações utilizadas foram de 512 µg/mL até 0,06 µg/mL. Nas cepas que afetam a psicultura as concentrações utilizadas foram de 250 µg/mL até 0,488 µg/mL. Na análise dos peptídeos da conjugação p-Bt contendo os PPCs, a concentração inicial utilizada foi de 512 µM e a final de 0,125 µM. Em todos os estudos foram realizadas diluições seriadas (1:2), até a obtenção da concentração mínima. A incubação foi feita a 37°C e a leitura visual dos resultados após 24 h, na qual foi observada a concentração mínima em que o composto consegue inibir o crescimento do microrganismo. Para os controles de esterilidade e de crescimento foram adicionados caldo MHCA. No controle de crescimento foi adicionado bactéria sem o composto para se observar o crescimento da mesma em caldo MHCA. No controle de esterilidade, há apenas o meio de cultura caldo MHCA, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação do mesmo. Os testes foram realizados em duplicata e em dois eventos diferentes.

Após a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), foram inoculados 100 µL do conteúdo do poço equivalente a CIM, uma diluição acima e duas abaixo, em placa de MHCA-Ágar por técnica de microgota, sem estriar. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 h, quando foi feita a leitura visual para observar qual concentração não houve o crescimento bacteriano.

Nas análises dos conjugados p-Bt-PPCs após o tempo de incubação das placas a 37°C durante 24 h, foi adicionado aos poços 15 µL de coloração com resazurina a 0,01% e

incubadas novamente protegidos da luz por duas horas. Em seguida, os poços que corresponderam ao CIM e pelo menos aos três poços anteriores foram homogeneizados, diluídos em série e semeados em ágar Mueller-Hinton para a determinação do MBC. As placas foram incubadas em estufas a 37°C por 24 h em 5% de CO_2. Foi determinado o número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC mL^{-1}) de bactérias. O MBC foi considerado quando os peptídeos mataram 99,9% da cultura bacteriana testada.

Tabela 1 - Dados das cepas oriundas da piscicultura.

ID	Código GenBank	Espécie	Hospedeiro	Isolamento	
				Ano	Local
Bactérias Gram-positivas					
ATCC 7966	-	*A. hydrophila*	-	-	-
T3R	MH591949.1	*A. hydrophila*	*Oreochromis niloticus*	2016	A
A124	KJ561033.1	*A. jandaei*	*O. niloticus*	2011	B
IA1	MH155229.1	*A. jandaei*	*O. niloticus*	2017	A
LP15/3	MH155228.1	*C.freundii*	*Pteropyllum scalare*	2015	A
Bactérias Gram-negativas					
I3	-	*E. tarda*	*O. niloticus*	2016	A
D115C	KU605571.1	*S. agalactiae*	*O. niloticus*	2014	C
D151C	KX385295.1	*S. agalactiae*	*O. niloticus*	2016	D
A74	KJ560984.1	*L. garvieae*	*O. niloticus*	2011	B
14MS	KJ560992.1	*L. garvieae*	*Pseudoplatystoma fasciatum*	2012	E

(A = Caunesp, B = Arealva, C = Nova Avanhandava, D = Reservatório de Chavantes- Rio Paraná e E = Dourados)

3.5.2 Atividade hemolítica

A avaliação da toxicidade dos peptídeos foi realizada em eritrócitos. O protocolo utilizado para teste foi o de Onuma et al. 1999 com modificações. Para a preparação das hemácias foi colhido o sangue de uma pessoa sem o uso de medicamento em tubo para coleta contendo EDTA. Deste tubo foram retirados 2 mL de sangue e transferidos para um tubo de centrífuga com mais 2 mL de tampão PBS. O tubo foi centrifugado a uma rotação de 800 xg, por 15 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi

descartado. Este processo foi repetido mais duas vezes, completando um total de 3 lavagens do sangue. Após as lavagens foi feita uma solução de hemácias à 1% em PBS. Foram feitas diluições seriadas dos peptídeos para determinação da concentração que lisa 50% das hemácias (HC50). Os tubos então foram encubados por 1 h a 37 °C, após este processo os mesmos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e 100 µL do sobrenadante foram pipetados em microplacas de 96 poços. A absorbância foi lida no aparelho SpectraMax em 540 nm. O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 100 µL da suspensão celular misturada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), enquanto que o valor de 0% de hemólise foi obtido utilizando 100 µL da suspensão celular com 100 µL de tampão. O ensaio foi realizado em duplicata, sob aprovação do projeto “Síntese, caracterização e estudos de diferentes peptídeos bioativos” no conselho de ética, parecer n° 4.253.480.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Os peptídeos obtidos e os códigos utilizados em sua descrição estão colocados na Tabela 2.

Para a síntese dos peptídeos conjugados com a sequência Hy-a1, inicialmente foi sintetizado a Hy-a1, posteriormente foi acoplado o resíduo de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH e por fim os aminoácidos das sequências correspondentes aos peptídeos Cys-Bt ou p-Bt. Na síntese do primeiro peptídeo, partiu-se de uma massa inicial de resina Rink amida de 645,2 mg e obteve massa final de 1,4055 g, com um ganho de massa de 760,3 mg e rendimento de 90%. Na síntese do p-Bt-Hy-a1 a massa inicial de resina foi de 526,5 mg, obtendo no final 990,5 mg, com ganho de massa de 464 mg (rendimento de 97%). Para avaliar se a distância entre os peptídeos poderia afetar a atividade do bioconjugado, um o grupamento ácido {2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi}acético foi adicionado entre as sequências, obtendo-se o peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1. Essa síntese iniciou-se com uma massa de resina de 526,3 mg e terminou com uma massa de 933,5 mg, com um ganho de massa de 407,2 mg e rendimento 90%. Os rendimentos e os ganhos de massa obtidos e teóricos podem ser encontrados na Tabela 3.

Após a síntese, os peptídeos passaram pelo processo de clivagem. Para o peptídeo Cys-Bt-(Hy-a1) a solução utilizada foi de 94% de TFA, 2,5% de H_2O, 2,5% de EDT e 1% de TIS. Já na clivagem dos peptídeos p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]-Hy-a1 foi utilizada uma solução contendo 95%de TFA, 2,5% de H_2O e 2,5% de TIS. As massas obtidas dos peptídeos brutos estão apresentadas na Tabela 4.

Os peptídeos brutos obtidos foram avaliados por meio da espectroscopia de massas para a confirmação da obtenção materiais desejados. As massas molares dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1 p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]-Hy-a1 foram respectivamente 5178,4 g/mol, 4716,8 g/mol e 4861,8 g/mol (Figuras 6, 7 e 8) e iguais as teóricas esperadas: 5178,4; 4715,8 e 4860,7 g/mol, respectivamente.

Tabela 2 - Sequências e códigos dos bioconjugados peptídicos produzidos no projeto.

Peptídeo	Código	Sequência
desLys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(Hy-a1)	Cys-Bt-Hy-a1	(KKYRYHLKPFCK)$_2$K-IFGAILPLALGALKNLIK
desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(Hy-a1)	p-Bt-Hy-a1	(KKYRYHLKPF)$_2$K-IFGAILPLALGALKNLIK
desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K[PEG]-(Hy-a1)	p-Bt[PEG]Hy-a1	(KKYRYHLKPF)$_2$K-[PEG]IFGAILPLALGALKNLIK
desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(AIP-6)	p-Bt-PPC$_1$	(KKYRYHLKPF)$_2$K-KRLRWR
desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-PFV	p-Bt-PPC$_2$	(KKYRYHLKPF)$_2$K-PFVYLI
desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K-(HIV-TAT(47-57))	p-Bt-PPC$_3$	(KKYRYHLKPF)$_2$K-YGRKKRRQRRR

Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos foram obtidos em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) utilizando um gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min em um fluxo de 1 mL/min. O peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 apresentou um tempo de retenção de 15,81 min, como pode ser observado na figura 9, já o peptídeo p-Bt-Hy-a1 apresentou como tempo de retenção de 17,07 min como observado na figura 10 e o peptídeo p-Bt[PEG]-Hy-a1 apresentou um tempo de retenção de 16,61 min como pode ser observado na figura 11. Como o esperado o peptídeo contendo o espaçador polar PEG, devido a sua polaridade, apresentou menor tempo de retenção que o seu correspondente sem o espaçador.

Os peptídeos brutos foram purificados em um sistema CLAE semipreparativo. As frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema CLAE analítico e as frações puras foram juntadas e liofilizadas. Os gradientes de purificação e da análise das frações, e as massas obtidas estão colocados na tabela 5. Os cromatogramas dos peptídeos puros podem ser observados nas figuras 12, 13 e 14.

Tabela 3 - Rendimento da etapa sintética dos peptídeos conjugados com a Hy-a1.

Peptidil-resina	Ganho de massa (mg)	Ganho de massa teórico (mg)	Rendimento (%)
Cys-Bt-Hy-a1	760,3	922,5	90
p-Bt-Hy-a1	464,0	938,0	97
p-Bt[PEG]Hy-a1	407,2	1029,8	90

Tabela 4 - Rendimento da clivagem dos peptídeos conjugados com o peptídeo Hy-a1.

Peptídeos	Massa do peptídeo bruto (mg)	Massa de peptídeo bruto teórico (mg)	Rendimento de Clivagem (%)
Cys-Bt-Hy-a1	355,2	707,1	50
p-Bt-Hy-a1	431,4	990,5	43
p-Bt[PEG]Hy-a1	415,8	933,5	44

Figura 6 - Espectro de massas do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 - massa molar 5178,4 g/mol

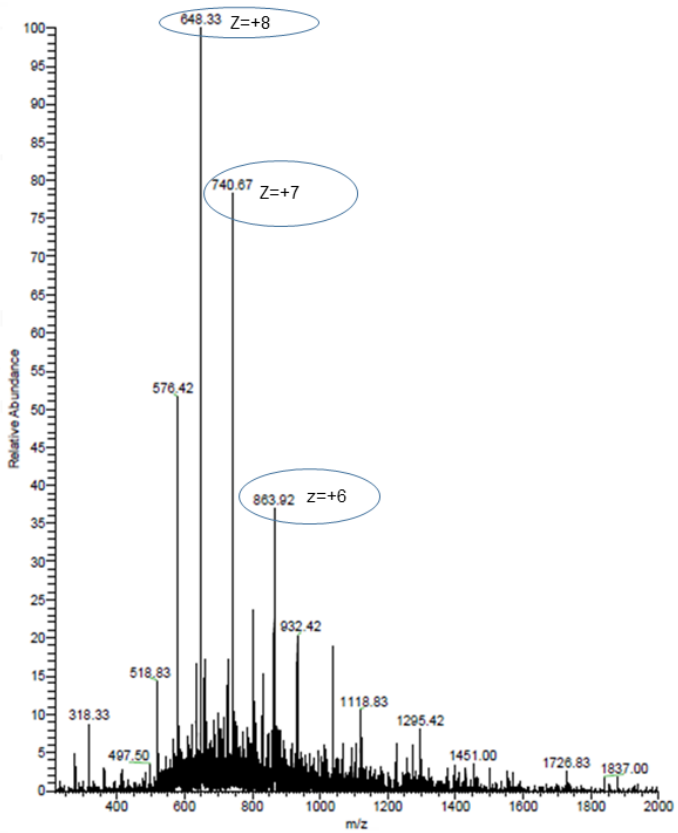


Figura 7 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-Hy-a1 - massa molar 4716,8 g/mol

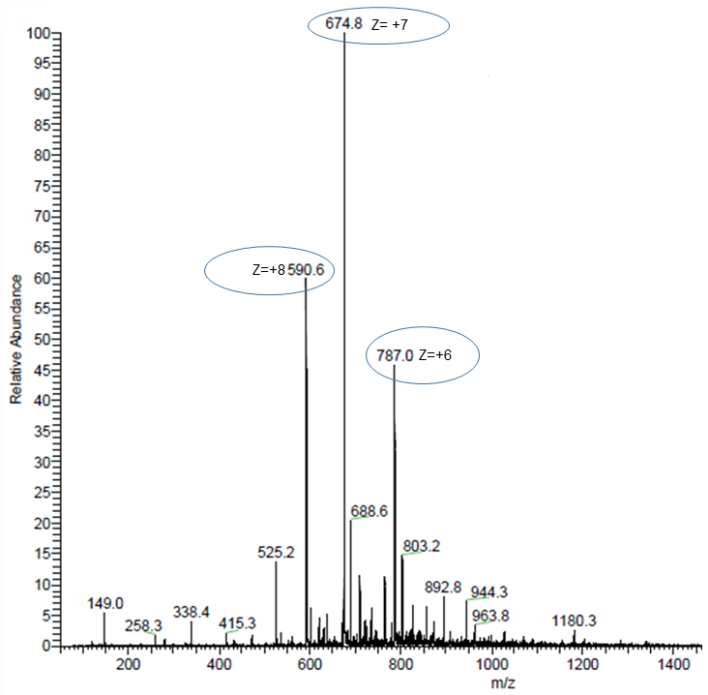


Figura 8 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 - massa molar 4860,8 g/mol

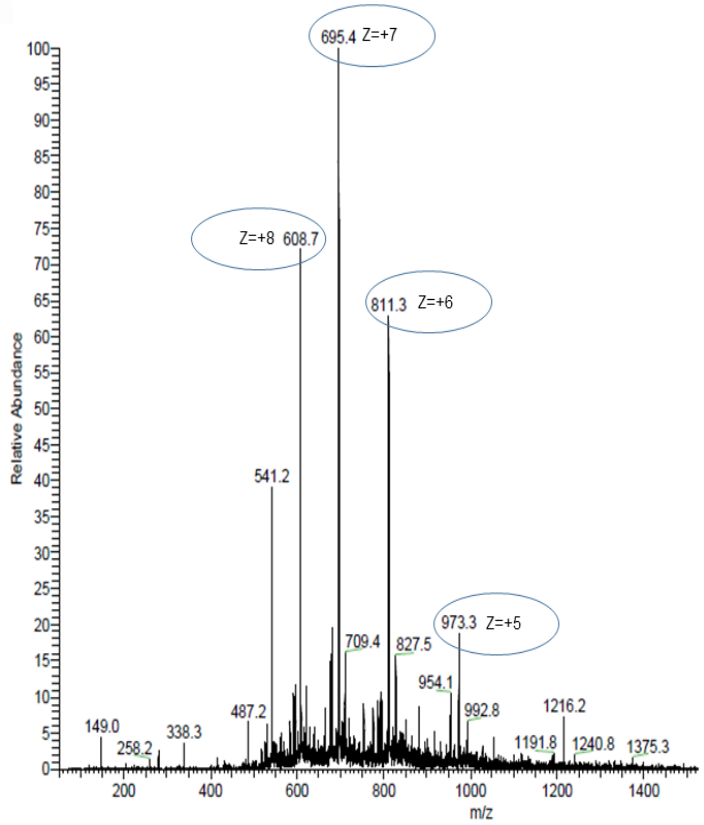


Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Cys-Bt-Hy-a1.

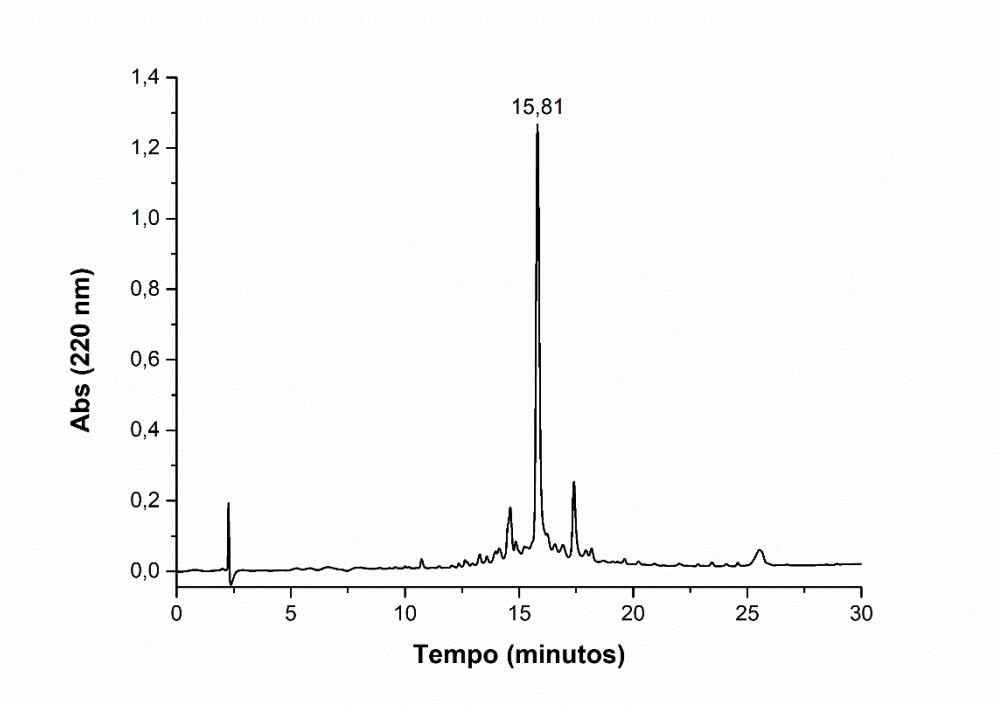


Figura 10 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-Hy-a1

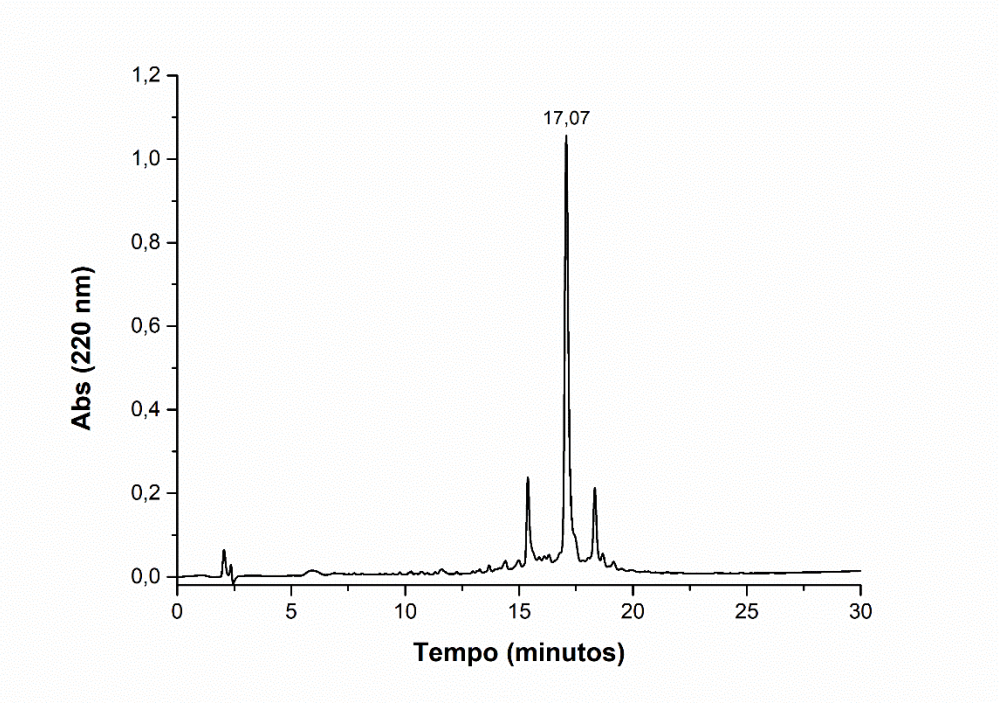


Figura 11 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt[PEG]Hy-a1.

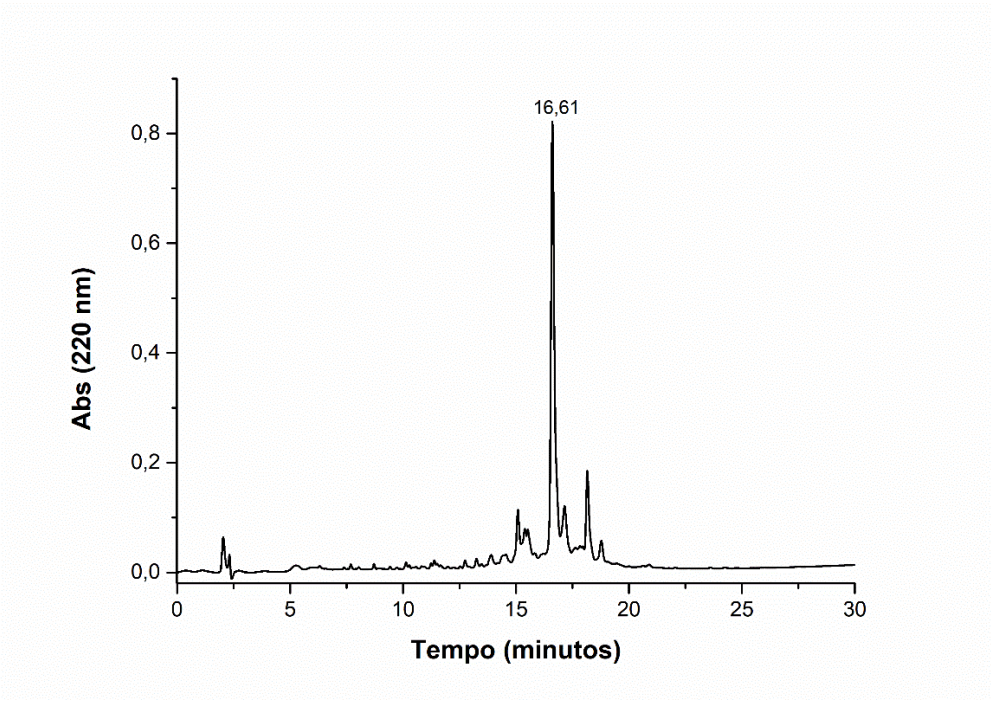


Tabela 5 - Condições de purificação dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1.

Peptídeos	Gradiente de purificação		Frações puras (mg)	Pureza (%)
	CLAE semi-preparativo	CLAE analítico		
Cys-Bt-Hy-a1	30-70 solvente B em 170 min	40-60 solvente B em 10 min	87,8	98
p-Bt-Hy-a1	30-70 solvente B em 170 min	40-60 solvente B em 10 min	41,8	92
p-Bt[PEG}Hy-a1	30-70 solvente B em 170 min	40-60 solvente B em 10 min	95,9	95

Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro Cys-Bt-Hy-a1.

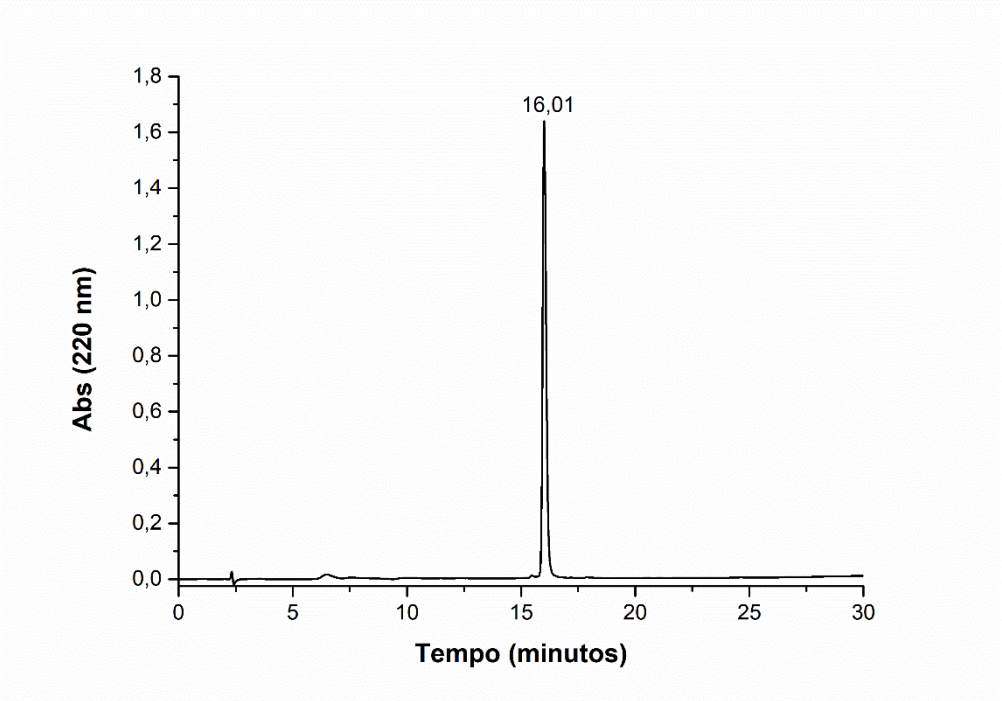


Figura 13 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-Hy-a1

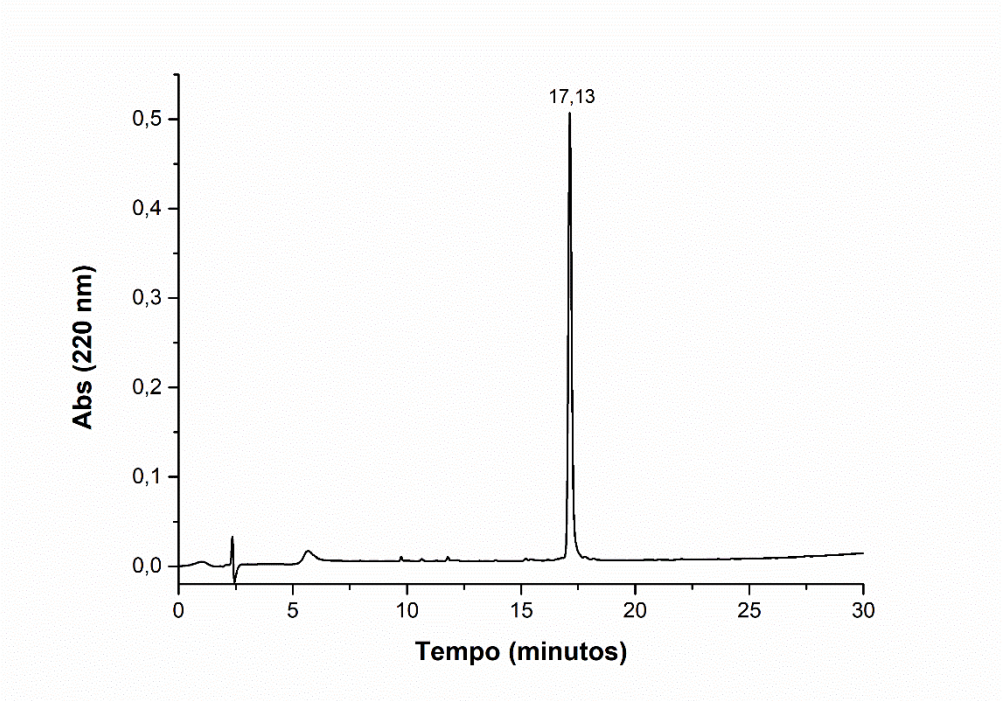
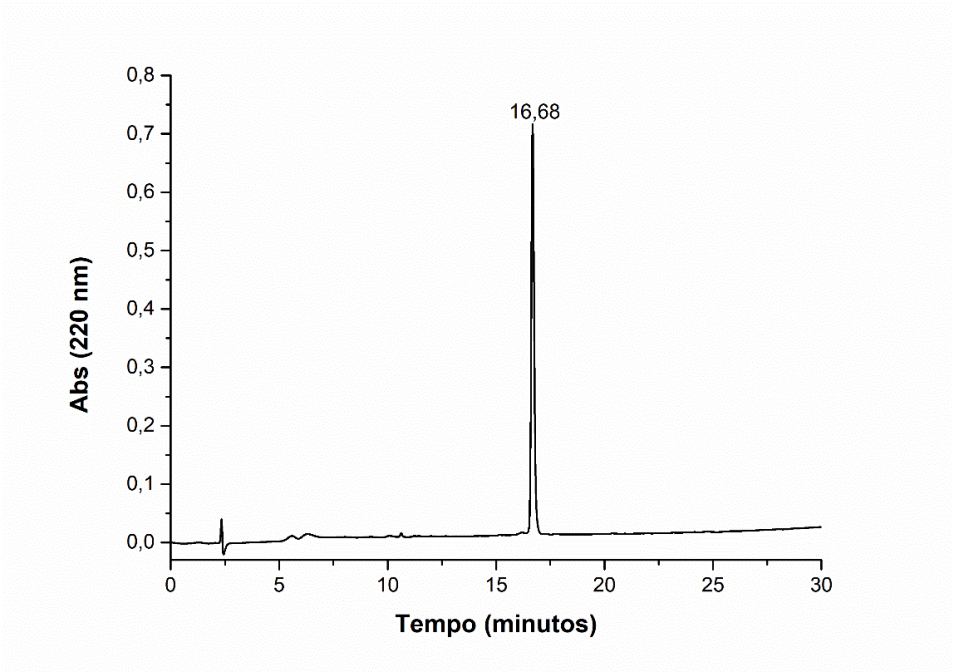


Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt[PEG]Hy-a1



Após o processo de síntese e caracterização dos peptídeos, foram feitos os ensaios antibacterianos. A partir dos resultados obtidos, os quais vão ser discutidos no tópico 4.2, decidimos fazer novas sínteses contento o peptídeo p-Bt, porém agora conjugado com PPCs em sua região C-terminal.

O primeiro peptídeo sintetizado foi o p-Bt-PPC_1, que foi iniciado com uma massa de 748,8 mg e no final apresentou uma massa de 1260,0 mg, rendimento de 83%. O segundo a ser sintetizado foi o p-Bt-PPC_2, o qual começou com uma massa de 563,4 mg de resina e terminou com 1069,0 mg de peptidil-resina, rendimento de síntese de 93%. E por fim o peptídeo p-Bt-PPC_3 que foi iniciado com uma massa de 1132,4 mg e terminou com uma massa de 1670,6 mg, tendo um rendimento final de 94%. Os dados de rendimento e o ganho de massa teórico das sínteses destes peptídeos podem ser encontrados na tabela 6.

Após a síntese dos peptídeos foi feita a clivagem da resina. Uma solução contendo 95% de TFA, 2,5% de H_2O e 2,5% de TIS foi utilizada. A extração foi realizada com 50% de solvente A e 50% de solvente B. As massas dos peptídeos brutos obtidas estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 6 - Rendimentos das sínteses dos peptídeos p-Bt-PPC$_1$, p-Bt-PPC$_2$ e p-Bt-PPC$_3$.

Peptidil-resina	Ganho de massa (mg)	Ganho de massa teórico (mg)	Rendimento (%)
p-Bt-PPC$_1$	518,2	772,4	83
p-Bt-PPC$_2$	505,6	584,4	93
p-Bt-PPC$_3$	538,2	572,5	94

Tabela 7 - Rendimento da etapa de clivagem dos peptídeos p-Bt-PPC$_1$, p-Bt-PPC$_2$ e p-Bt-PPC$_3$.

Peptídeos	Massa do peptídeo bruto (mg)	Massa de peptídeo teórico (mg)	Rendimento de Clivagem (%)
p-Bt-PPC$_1$	288,7	630,5	46
p-Bt-PPC$_2$	660,3	1.014,8	65
p-Bt-PPC$_3$	773,6	1.241,5	62

Após a obtenção dos peptídeos brutos, os mesmos foram avaliados por meio da espectrometria de massas para a confirmação da massa molar. Os resultados obtidos confirmaram a obtenção dos materiais desejados, com massas molares teóricos de 3764,57 g/mol, 3601,38 g/mol e 4410,6 g/mol para os peptídeos p-Bt-PPC$_1$, p-Bt-PPC$_2$ e p-Bt-PPC$_3$, respectivamente (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC$_1$ - massa molar 3764,57 g/mol.

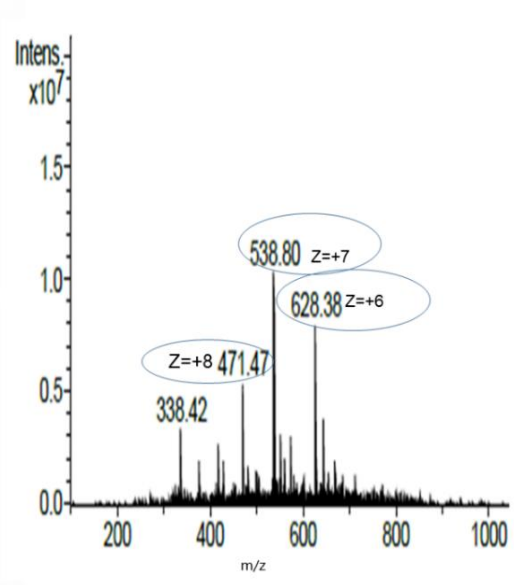


Figura 16 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC$_2$ - massa molar 3601,38 g/mol.

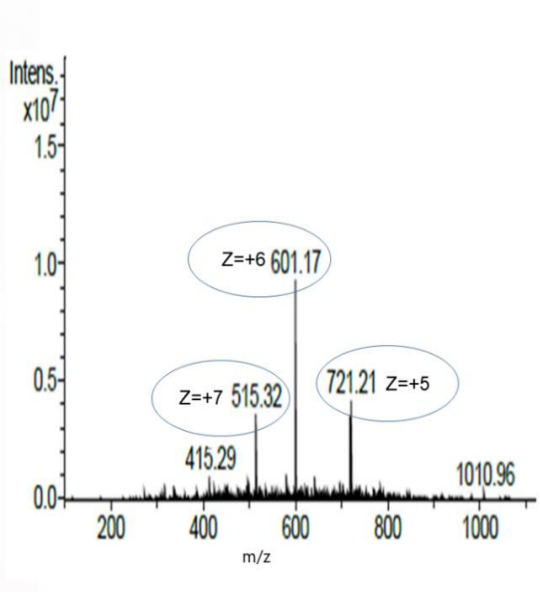
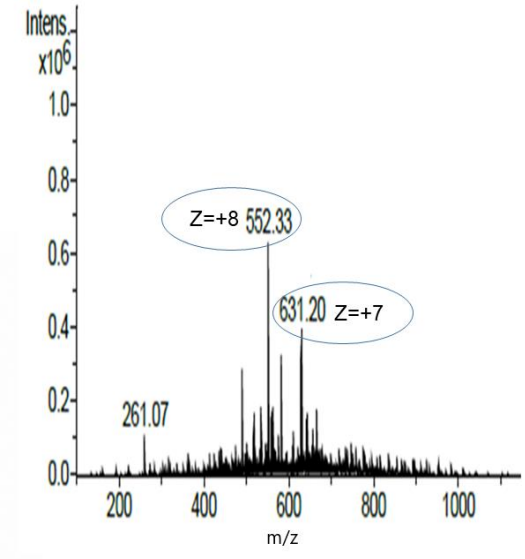


Figura 17 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC$_3$ - massa molar 4410,6 g/mol.



O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos foi obtido em CLAE utilizando um gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, em um fluxo de 1 mL/min. O peptídeo p-Bt-PPC$_1$ apresentou um tempo de retenção de 11,37 min (figura 18), já o peptídeo p-Bt-PPC$_2$ apresentou como tempo de retenção de 14,20 min (Figura 19), e o peptídeo p-Bt-PPC$_3$ apresentou um tempo de retenção de 10,64 min (figura 20). Esses dados estão de acordo com as diferentes propriedades físico-químicas dos PPCs. O mais hidrofóbico apresentou o maior tempo de retenção.

Os peptídeos foram purificados em um sistema CLAE semi-preparativo. As frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema CLAE analítico e as frações puras foram juntadas e liofilizadas. Os programas de purificação, a pureza e as massas obtidas estão colocados na tabela 8. Os cromatogramas dos peptídeos puros podem ser observados nas figuras 21, 22 e 23.

Tabela 8 - Condições e resultados obtidos da purificação dos peptídeos p-Bt-PPC$_1$, p-Bt-PPC$_2$ e p-Bt-PPC$_3$.

Peptídeos	Gradiente de purificação		Massa obtida (mg)	Pureza (%)
	CLAE semi-preparativo	CLAE analítico		
p-Bt-PPC$_1$	20-50 solvente B em 90 min	15-45 solvente B em 15 min	25,9	97
p-Bt-PPC$_2$	15-45 solvente B em 90 min	40-60 solvente B em 10 min	25,2	93
p-Bt-PPC$_3$	11-51 solvente B em 90 min	10-50 solvente B em 15 min	23,7	90

Figura 18 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC$_1$.

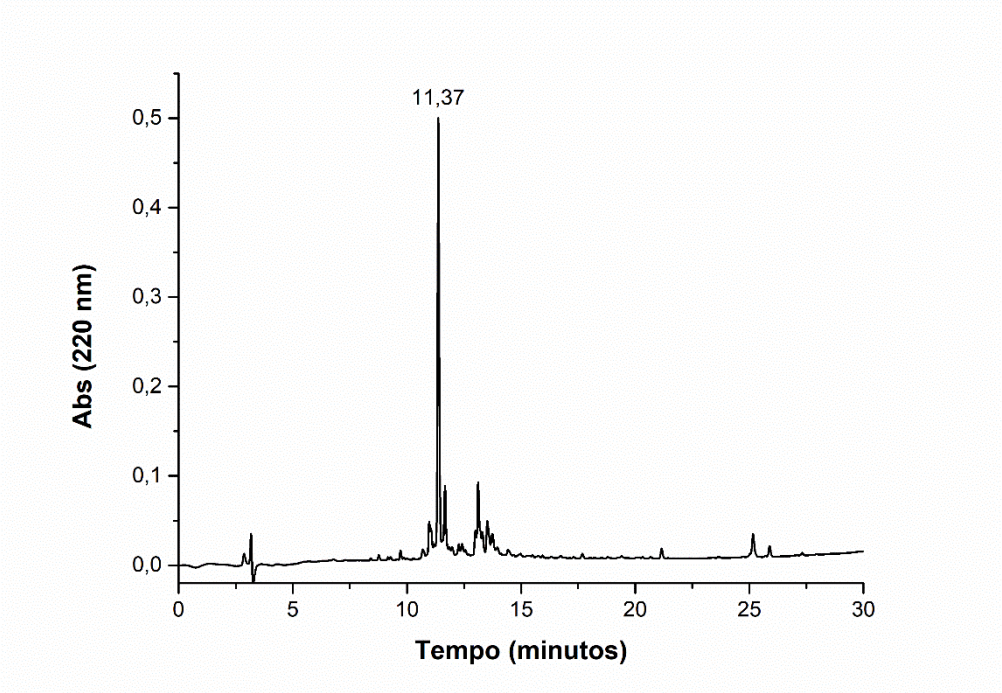


Figura 19 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC$_2$.

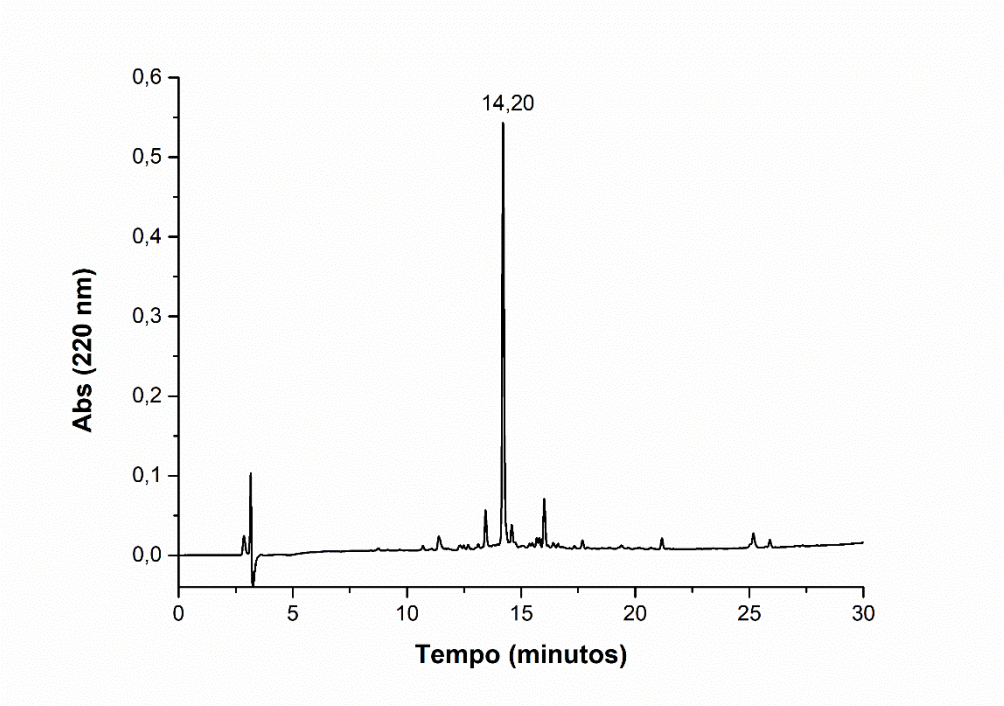


Figura 20 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC$_3$.

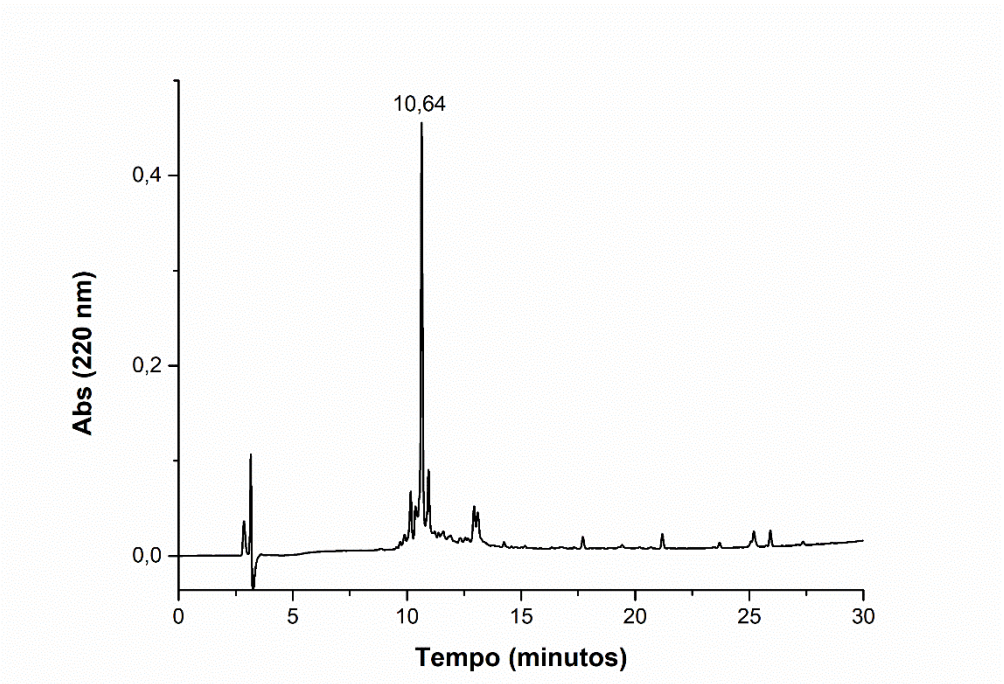


Figura 21 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC$_1$

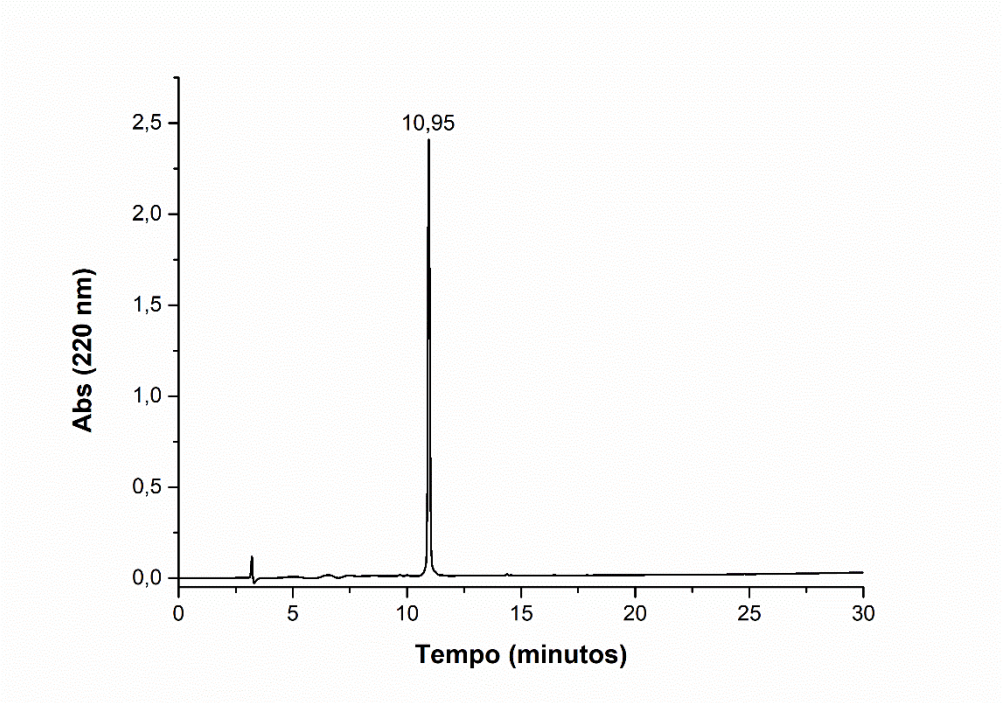


Figura 22 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC$_2$.

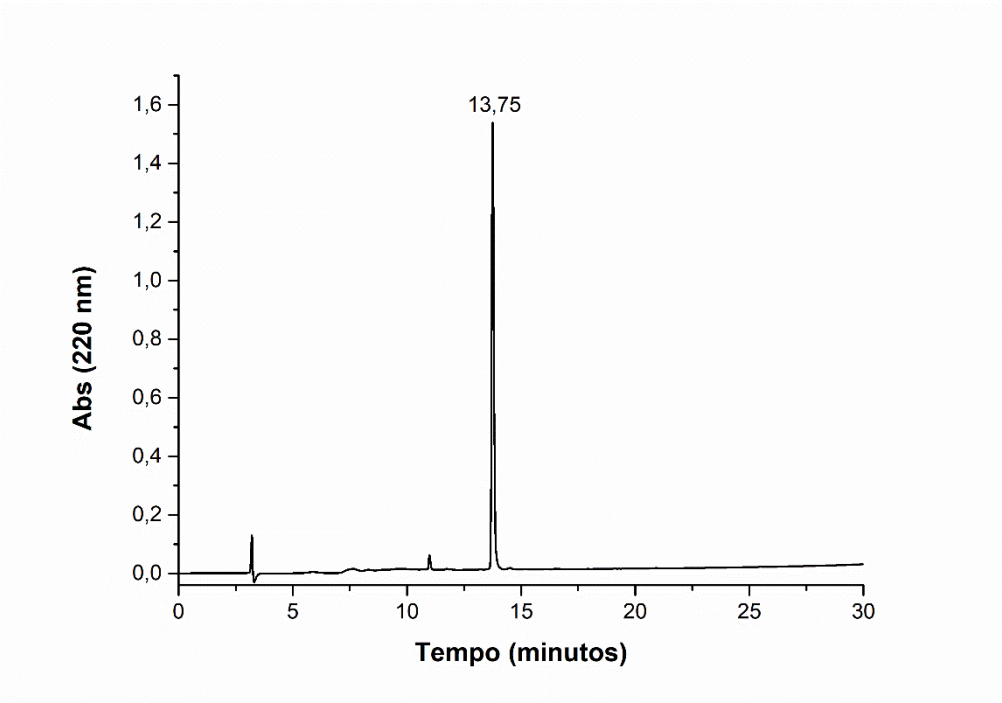
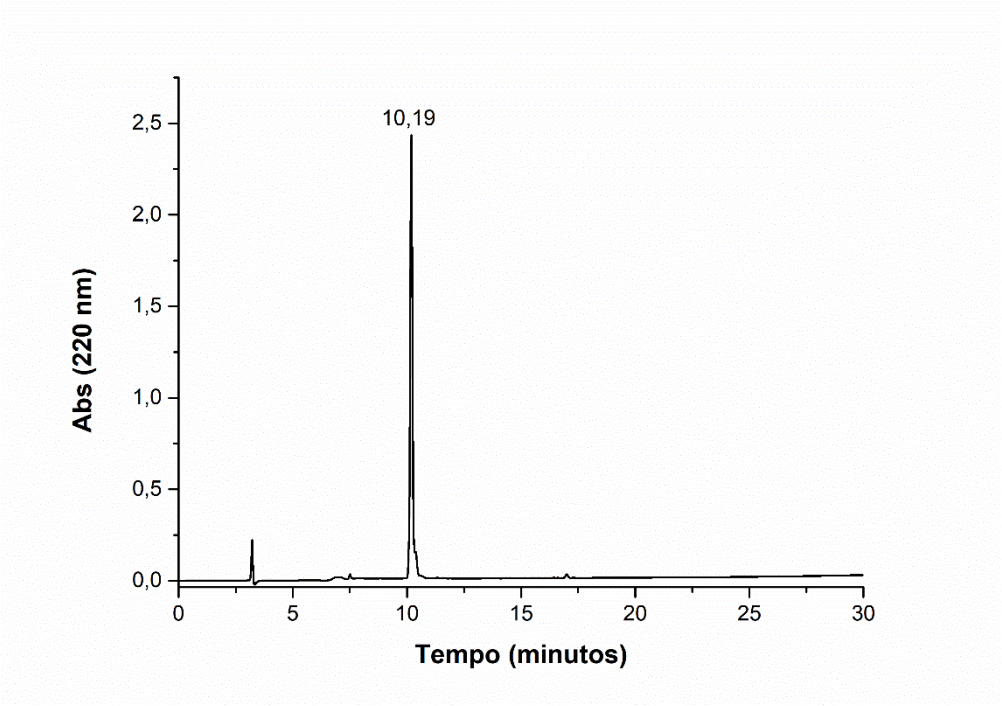


Figura 23 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC$_3$.



4.2 DICROÍSMO CIRCULAR

A técnica de dicroísmo circular (CD) pode ser utilizada para determinar a estrutura secundária de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Estas moléculas possuem diversos centros quirais que podem interagir com a luz circularmente polarizada e alterar sua absorção (MAZINI, 2012).

Os cromóforos mais importantes nos estudos de CD de amostras peptídicas são os grupamentos amidas das ligações peptídicas. Esses tipos de grupamento possuem ângulos de rotação φ (phi) e ψ (psi) que definem as condições de coplanariedade dos orbitais envolvidos na ligação peptídica, tornando-se assim característicos para cada tipo de estrutura secundária. As interações que a molécula pode fazer e o seu estado de agregação/estruturação com o solvente ou com outras espécies, como por exemplo surfactantes ou fosfolipídios, influenciam diretamente na rotação desses ângulos (GUIMARÃES, 2017).

As estruturas secundárias dos peptídeos e proteínas, principalmente folha-β, α-hélice e random coil (randômica), podem ser observadas na região do UV-distante (240-180 nm) (MURAKAMI E RULLER, 2016).

A análise de CD do peptídeo (p-BthTX-I)$_2$ foi utilizada como base para este trabalho e apresentou anteriormente uma estrutura desorganizada (random coil) na presença de LPC e TFE (SANTOS-FILHO, et al., 2015). Os espectros obtidos para o peptídeo p-Bt (Figura 24) foram muito semelhantes ao peptídeo (p-BthTX-I)$_2$. Já o peptídeo Hy-a1 (Figura 25) na presença de tampão PBS apresenta uma estrutura desordenada, porém quando ele se encontra na presença de LPC e TFE se estrutura em α-hélice (CASTRO et al., 2009). Na análise dos peptídeos precisou-se aumentar o comprimento de onda inicial de 195 para 198 nm devido a saturação da célula fotossensível do equipamento. Desta forma, para a Hy-a1 não foi observada a parte positiva do espectro e que corresponde a α-hélice (próximo de 190 nm), os valores ficaram em valores próximos de zero, mas mesmo assim, o restante do espectro mostrou estruturação em α-hélice com mínimos em 208 e 222 nm.

Os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]-Hy-a1 em PBS não apresentaram estruturação – “random coil”, enquanto a sequência p-Bt-Hy-a1 apresentou uma pequena estruturação, provavelmente em α-hélice (Figuras 26, 27 e 28). A estruturação desses peptídeos em α-hélice ocorreu na presença de 60% TFE e 1 mM de LPC. Acreditamos que essa estruturação se dá na parte do peptídeo correspondente à Hy-a1, que interage com micelas, como as de LPC, ou se estruturam em TFE. No entanto, o formato do espectro encontrado é diferente para cada um dos peptídeos estudados. Para os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1 e p-Bt-Hy-a1, a intensidade em 222 nm é maior que a de 208 nm em LPC, indicando uma agregação do peptídeo na forma de “coiled-coil” (figuras 26-28). Já em TFE, o peptídeo adota uma conformação mais estendida, sem ter as suas duas hélices em contato uma com a outra – maior absorção em 208 nm em relação ao comprimento de onda de 222 nm. No peptídeo contendo o PEG como espaçador, a agregação das moléculas não foi encontrada, indicando que essa molécula permite uma maior liberdade conformacional para esse peptídeo.

Figura 24 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt.

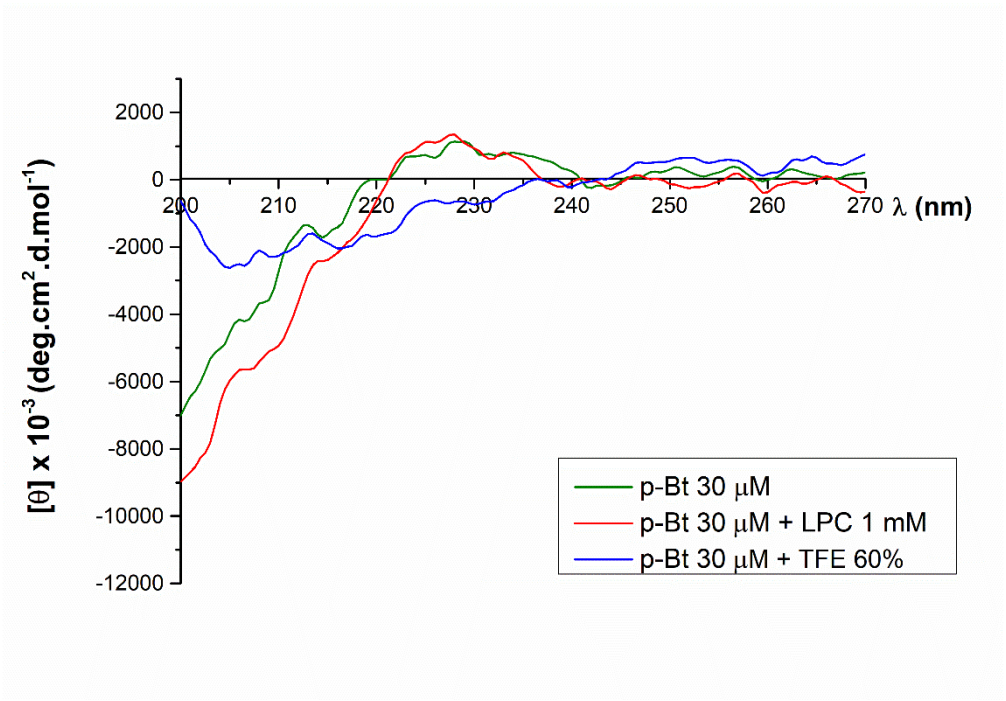


Figura 25 - Espectros de CD do peptídeo Hy-a1.

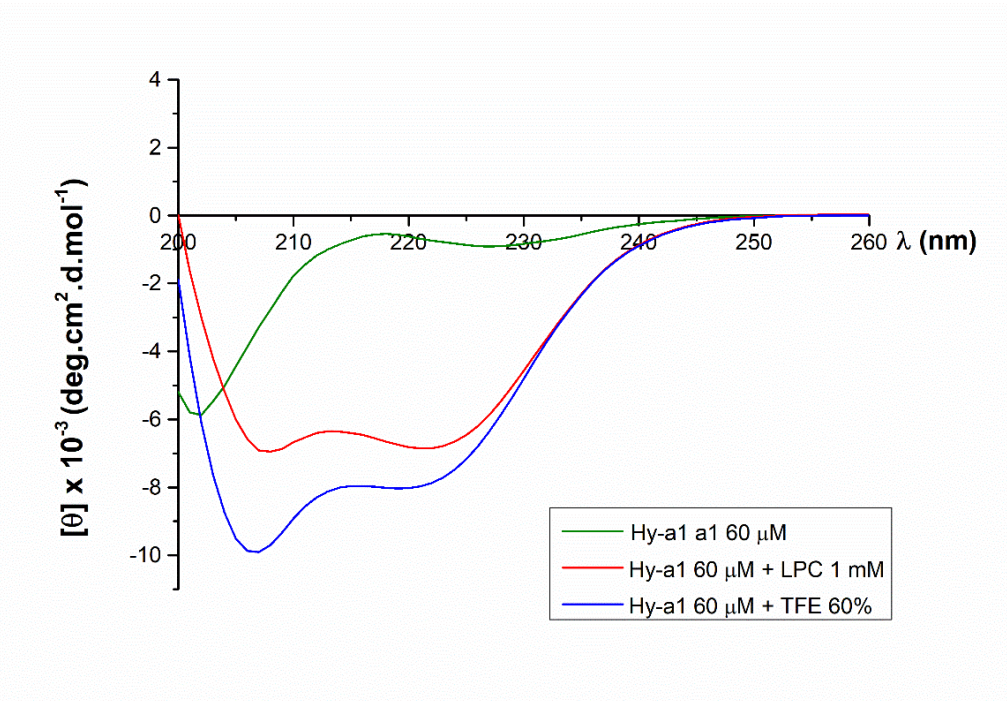


Figura 26 - Espectros de CD do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1.

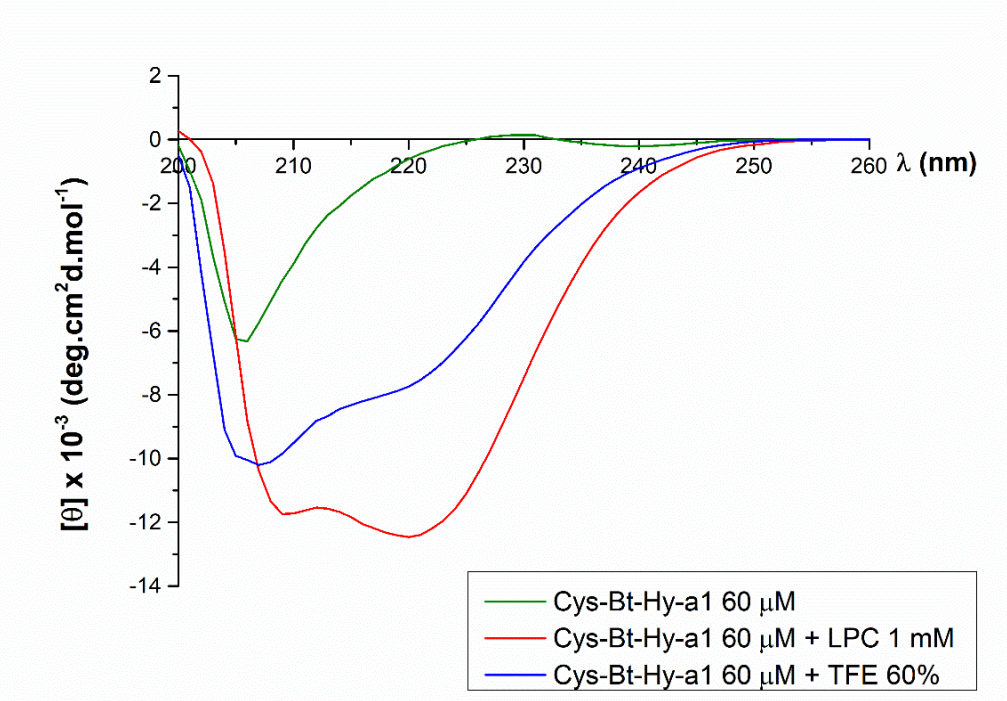


Figura 27 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-Hy-a1.

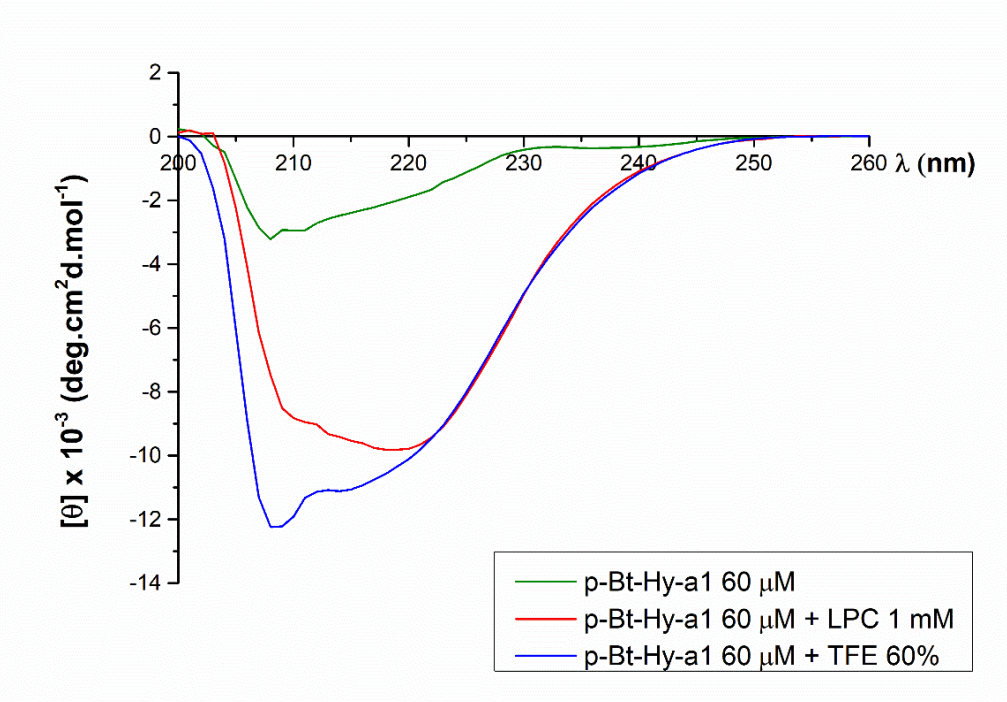
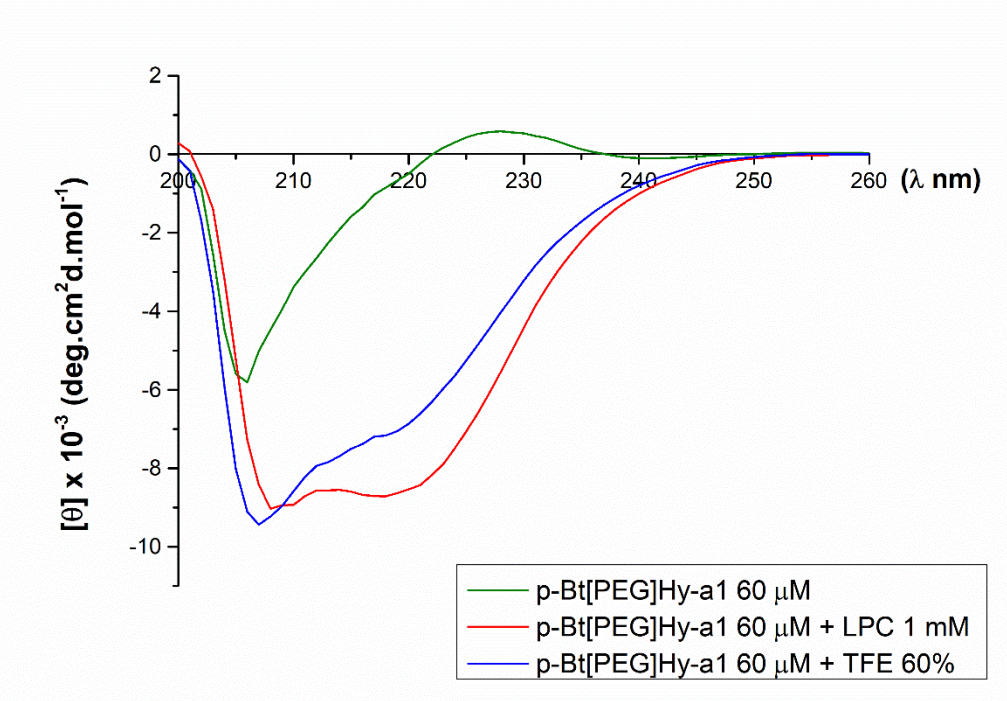


Figura 28 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt[PEG]-Hy-a1.



Os peptídeos originários das conjugações p-Bt com os PPCs também foram analisados por CD. As concentrações analisadas foram de 30 µM, pois ao tentar a análise na mesma concentração que os peptídeos anteriores (60 µM) houve a saturação da célula fotossensível do equipamento, tendo assim, a necessidade de diminuir a concentração de peptídeos na solução analisada.

Os espectros dos peptídeos PPCs AIP-6 (PPC_1) e HIV-TAT (47-57) (PPC_3) individualmente estão nas figuras 29 e 30. Os resultados indicam a não estruturação (random coil) nas condições testadas. Devido a pandemia do COVID-19 e o fechamento da universidade diante do decreto de lockdown pela prefeitura de Araraquara não foi possível a análise do PPC_2.

Ao analisar os espectros dos conjugados p-Bt com os PPCs é observado que na presença do tampão PBS quanto na presença de LPC eles não apresentaram estruturação, (random coil), porém na presença de um agente estruturante como o TFE, os peptídeos apresentaram bandas características de α-hélice, com absorbância negativa em 208 e 222 nm (figuras 31, 32 e 33). Esta estruturação pode ser explicada pela conjugação dos peptídeos, obtendo-se uma nova conformação estrutural. Destacamos que não houve mudança estrutural em LPC, um detergente que representa um meio correspondente a membrana, indicando que a interação desses peptídeos com a membrana é difícil e seu

mecanismo de ação não ocorre nesta estrutura com indicado no trabalho de SANTOS-FILHO et al., 2015.

Figura 29 - Espectros de CD do peptídeo PPC_1

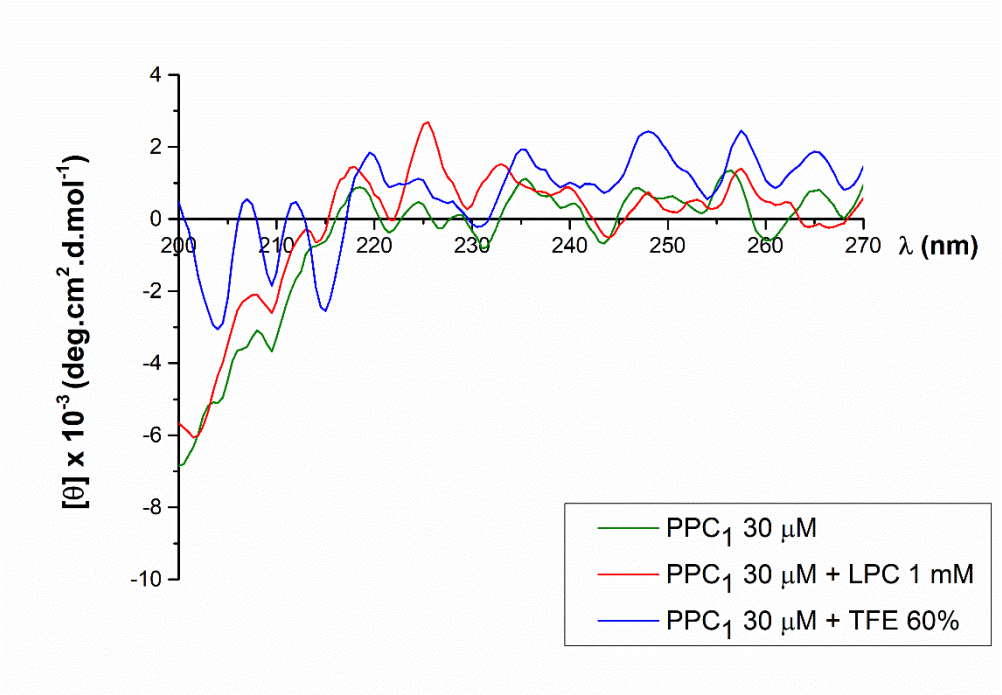


Figura 30 - Espectros de CD do peptídeo PPC_3.

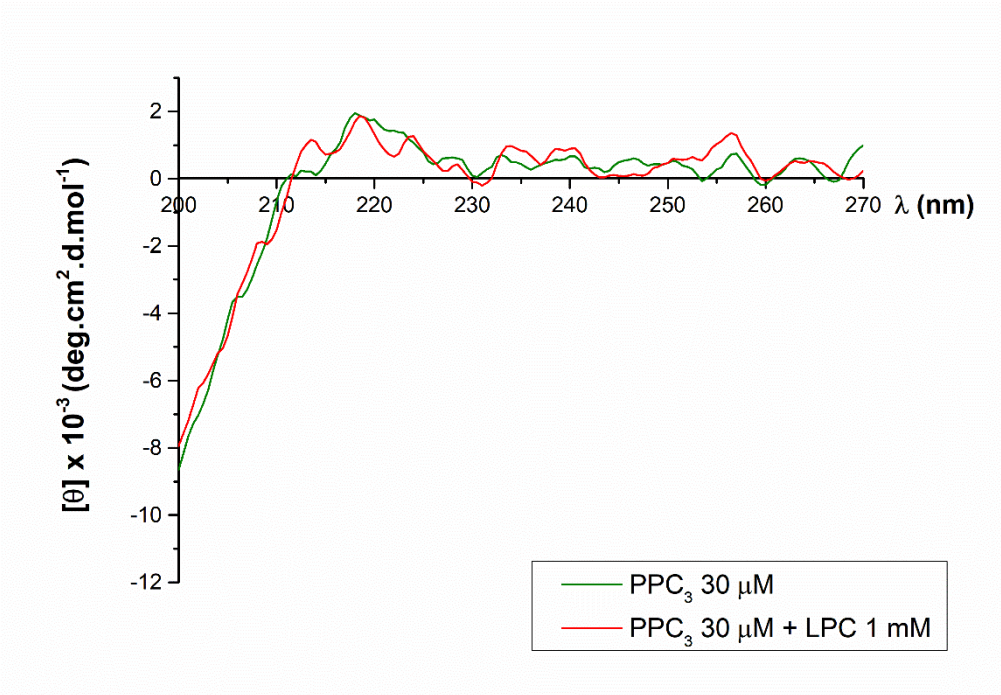


Figura 31 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_1$.

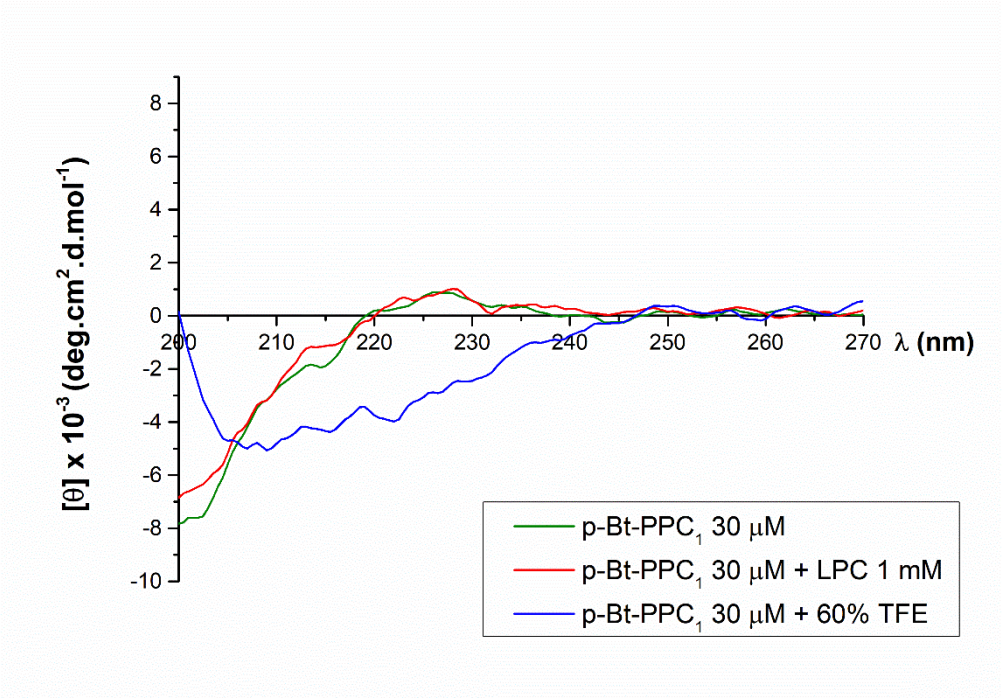


Figura 32 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_2$.

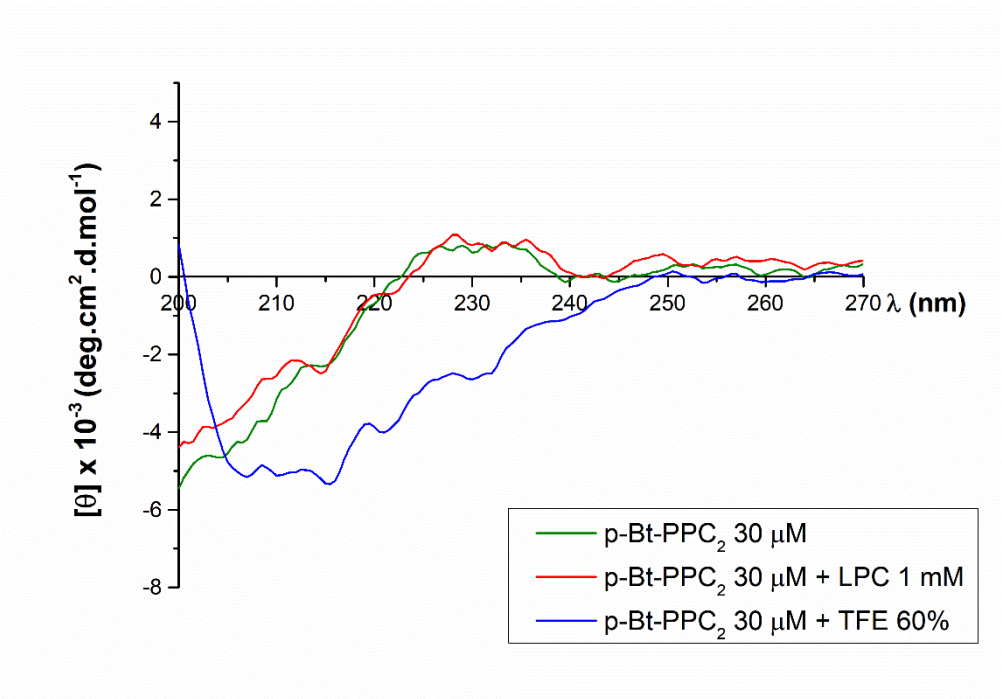
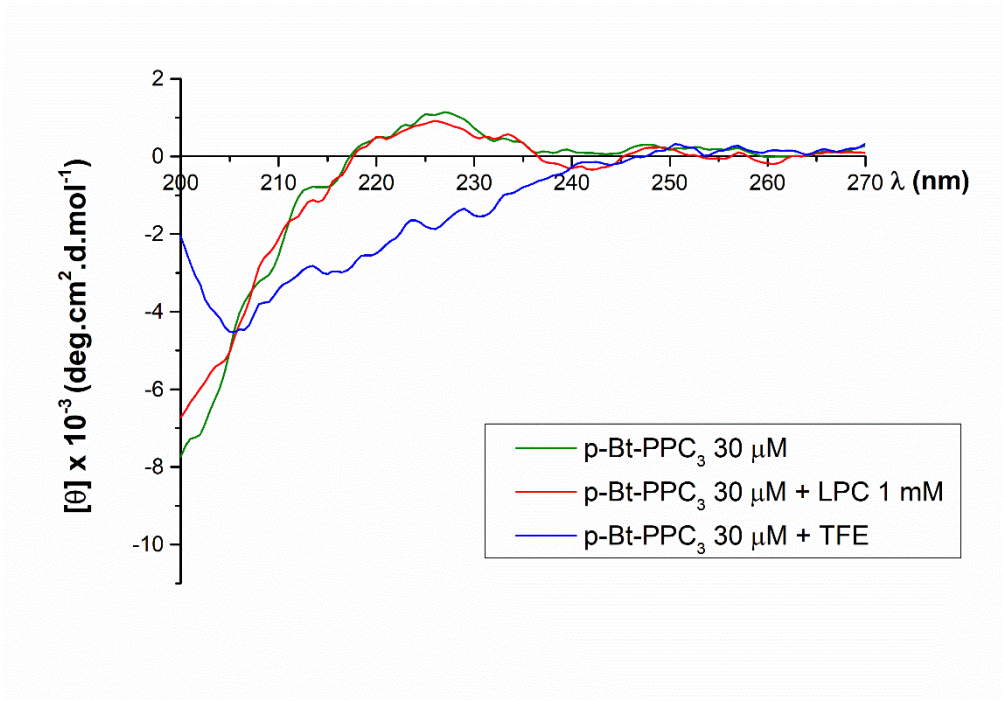


Figura 33 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_3$.



4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 Atividade antimicrobiana

4.3.1.1 Atividade antimicrobiana dos conjugados Cys- e p-Bt/Hy-a1

Os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentaram valores de CIM baixos e comparáveis com outros PAMs, demonstrando boa capacidade bactericida (Tabela 9) para a cepa resistente de *S. epidermidis*. Porém quando comparados com os peptídeos p-Bt e Hy-a1, a atividade foi menor, demonstrando que a conjugação foi ineficiente para a melhora da atividade antibacteriana. Os conjugados mostraram valores de CIM de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 32 µg/mL para os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1, respectivamente. Essa diminuição pode ser atribuída à mudança na estrutura que ocorreu com a conjugação, alterando assim a especificidade para o alvo e a atividade antimicrobiana (LI et al., 2020). A menor atividade antimicrobiana do peptídeo conjugado p-Bt-Hy-a1, pode estar relacionado a sua estrutura secundária, originalmente em “random coil” com os peptídeos originais em PBS, que em parte foi estruturada em α-hélice com a conjugação, o que pode ter atrapalhado a interação dos peptídeos com o seu

alvo e consequentemente diminuindo o efeito antimicrobiano (LORENZON, et al., 2019). Para as duas outras bactérias, o peptídeo Hy-a1 apresentou a melhor atividade, sendo que conjugação com o peptídeo p-Bt promoveu uma diminuição na atividade bacteriana.

O peptídeo H4, conjugado dos peptídeos BMAP-25 e OP-145, mostrou um aumento da atividade biológica contra as bactérias *E. faecalis* e *Klebsiella pneumoniae,* no entanto, não teve alteração em sua estrutura, o que pode ter viabilizado a sua atividade com estas bactérias (ALMAAYTAH et al., 2018).

No caso do peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1, a utilização do espaçador diminuiu a CBM em comparação ao p-Bt-Hy-a1 em *E. faecalis* e *S. epidermidis.* Isso indica que a distância entre os peptídeos pode facilitar o acesso ao seu alvo celular, porém sua CIM ainda é igual ao peptídeo p-Bt ou menor que a Hy-a1 individualmente. Os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentaram melhora na CBM em relação ao p-Bt, fato que merece maior investigação.

Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1.

Peptídeos	**Atividade antimicrobiana**					
	***S. epidermidis* ATCC 35984**		***S. aureus* ATCC 25923**		***E. faecalis* ATCC 29212**	
	CIM (µg/mL)	*CBM* (µg/mL)	*CIM* (µg/mL)	*CBM* (µg/mL)	*CIM* (µg/mL)	*CBM* (µg/mL)
p-Bt	8	16	32	128	64	128
Hy-a1	16	32	16	16	32	32
Cys-Bt-Hy-a1	32	32	128	128	64	64
p-Bt-Hy-a1	64	64	128	256	128	256
p-Bt[PEG]Hy-a1	32	32	128	128	64	64

Quando testados contra cepas Gram-negativas encontradas na piscicultura (Tabela 10), as bactérias *A. hydrophila* (ATCC 7966), *A. hydrophila* T3R e *E. tarda* I3, não mostraram ter sido afetadas nas concentrações estudadas em nenhum dos peptídeos. O peptídeo p-Bt não apresentou atividade em nenhuma das cepas testadas, já o peptídeo Hy-a1 não foi eficiente nas bactérias *A. jandaei* A124, *A. jandaei* IA1 e *C.freundii* LP15/3, além das cepas anteriormente citadas (ASSANE et al., 2021). Na cepa bacteriana de *A. jandaei* A124, o peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 foi o único que apresentou atividade, com um CIM de 31,25

µg/mL e um CBM de 62,50 µg/mL, sendo que na bactéria *A. jandaei* IA1 ele apresentou atividade duas vezes menor que a cepa anterior, CIM 62,50 µg/mL e CBM 125 µg/mL. O peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentou maior atividade na bactéria *A. jandaei* IA1, com CIM de 15,63 µg/mL e CBM de 15,63 µg/mL. Nessa bactéria, o peptídeo p-Bt-Hy-a1 não mostrou atividade, mostrando que a mobilidade das cadeias, propiciada pelo grupo PEG, nesse caso, é importante. Para as demais bactérias Gram-positivas, de forma geral, o peptídeo mais eficiente foi a Hy-a1, sendo que a conjugação não aumentou a atividade. No entanto, para as bactérias *S. agalactiae* e *L. garvieae* os resultados foram diferentes quando comparamos o peptídeo sem e o com espaçador, sendo o primeiro mais ativo em bactérias Gram-positivas, indicando diferentes modos de ação e a complexidade dos mecanismos de ação envolvidos.

A partir dos resultados obtidos observamos não haver uma melhora significativa na atividade antimicrobiana dos peptídeos quando da conjugação do p-Bt com a Hy-a1, indicando que a conjugação diminuiu a interação com componentes da parede celular e/ou dificulta a interação do peptídeo com seu alvo molecular e/ou sua internalização.

Para verificar se o alvo molecular do peptídeo p-Bt era no interior da célula, esse foi conjugado aos peptídeos de penetração celular (PPCs), que o ajudariam a entrar na célula bacteriana e atingir o seu alvo intracelular.

4.3.1.2 Atividade antimicrobiana do peptídeo conjugado p-Bt com PPCs

Os peptídeos PPCs individualmente não apresentaram atividade bacteriana significativa nas bactérias testadas (Tabela 11). A atividade antimicrobiana na bactéria Gram-negativa *E. coli* dos peptídeos conjugados com os PPCs foi semelhante ao do peptídeo p-Bt. A pouca mudança da estrutura secundária dos peptídeos, obtida por CD, pode ser uma das explicações da similaridade da atividade bacteriana.

No entanto, na bactéria Gram-positiva *S. aureus,* os peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3 apresentaram uma atividade melhorada, com MIC de 8 µM, 16 µM e 16 µM, respectivamente (Tabela 11) contra 256 µM do peptídeo p-Bt. O aumento da atividade em células bacterianas Gram-positivas pode estar relacionado à capacidade de o peptídeo agora penetrar a membrana bacteriana, facilitando assim a chegada ao seu alvo molecular interno.

Tabela 10 - Atividade dos peptídeos Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 em bactérias relacionadas à piscicultura.

Atividade antimicrobiana (µg/mL)										
	Peptídeos									
Cepas	**p-Bt**		**Hy-a1**		**Cys-Bt-Hy-a1**		**p-Bt-Hy-a1**		**p-Bt[PEG]Hy-a1**	
	CIM	*CBM*	*CIM*	*CBM*	*CIM*	*CBM*	*CIM*	*CBM*	*CIM*	*CBM*
Bactérias Gram-positivas										
A. hydrophila ATCC 7966	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-
A. hydrophila T3R	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-
A. jandaei A124	>250	-	>250	-	31,25	62,50	125	-	250	-
A. jandaei IA1	>250	-	>250	-	62,50	125	>250	-	15,63	15,63
C.freundii LP15/3	>250	-	125	>250	15,63	15,63	62,50	62,50	>250	-
Bactérias Gram-negativas										
E. tarda I3	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-	>250	-
S. agalactiae D115C	>250	-	7,81	15,63	15,63	62,50	15,63	31,25	>250	-
S. agalactiae D151C	>250	-	7,81	15,63	31,25	62,50	31,25	31,25	>250	-
L. garvieae A74	>250	-	15,63	31,25	31,25	31,25	15,63	31,25	>250	-
L. garvieae 14MS	>250	-	15,63	31,25	31,25	31,25	15,63	31,25	>250	-

A conjugação dos PPCs com os PAMs é um método descrito como eficiente para a melhora da atividade antimicrobiana. A ligação PPC-PAM aumenta a afinidade por DNA, a permeabilização da membrana e a ligação aos lipopolissacarídeos (LPS) (CHEN et al., 2021).

Kimura et a., (2020) analisou a conjugação do PAM Salusin-β com o PPC HIV-TAT (49-57). Esse peptídeo não apresentou atividade nas cepas Gram-negativas testadas, no entanto, quando as moléculas foram conjugadas elas demonstraram valores de MIC de 0,5 e 1 nmol/mL contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, demonstrando uma potente capacidade bacteriostática e a ampliação de seu espectro antimicrobiano.

No estudo com o PPC R9 conjugado com os peptídeos M15 e magainina foi demonstrado melhor atividade antimicrobiana tanto para cepas Gram-positivas quanto para Gram-negativas. Os conjugados PPC-PAM apesar de possuírem a capacidade de permeabilizar e despolarizar as membranas bacterianas, podem agir na membrana como os PAMs (LEE et al., 2019). A conjugação dos PPCs com o p-Bt pode ter facilitado a translocação da molécula através da membrana e a entrada nas células bacterianas.

Esses resultados estão coerentes com os estudos do peptídeo realizado por SANTOS-FILHO et al., 2021, onde foi proposto que o mecanismo de ação do peptídeo (p-BthTX-I)$_2$ é diferente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que na primeira o peptídeo mostra uma ação direta na parede bacteriana, enquanto na outra provavelmente ocorra a internalização do peptídeo.

Considerando as duas bactérias testadas, o PPC$_1$ (catiônico) conjugado ao peptídeo p-Bt foi o que melhor apresentou resultados, com MIC de 4 µM (similar ao peptídeo p-Bt) na *E. coli* e 8 µM *na S. aureus*. Vale destacar que o PPC$_1$ sozinho não apresentou atividade antimicrobiana contra esta bactéria e o p-Bt apresentou um MIC de 128 µM. Estudo anterior com o PPC$_1$ relatou que o mesmo tem uma capacidade de penetração celular quando testado com células RAW e em células LoVo (células derivadas de câncer de colo retal humano), sendo a sua ação na última independente de fagocitose (WANG et al., 2011). Esta capacidade pode ser atribuída a presença de vários resíduos de arginina carregados positivamente, seu baixo peso molecular e a sua hidrofobicidade. O peptídeo p-Bt-PPC$_3$, apesar de também ser catiônico, mostrou ser menos efetivo contra o *S. aureus*. O peptídeo hidrofóbico PPC$_2$ conjugado com o peptídeo p-Bt apresentou resultados semelhantes ao peptídeo acoplado ao PPC$_3$.

Os resultados obtidos indicaram que o mecanismo de ação em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é diferente, e que a conjugação afeta de maneira diversa cada uma dessas bactérias.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3

Peptídeos	***E. coli* ATCC 10536**		***S. aureus* ATCC 14458**	
	CIM (µM)	CBM (µM)	CIM (µM)	CBM (µM)
p-Bt	4	4	128	256
PPC_1	128	512	>512	>512
PPC_2	512	>512	512	>512
PPC_3	128	128	128	128
p-Bt-PPC_1	4	4	8	8
p-Bt -PPC_2	4	8	16	16
p-Bt-PPC_3	4	4	16	16
Ciprofloxacina	0,078	0,0315	2	4

4.3.2 Atividade hemolítica

4.3.2.1 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com Hy-a1

A avaliação da atividade hemolítica de um peptídeo é utilizada com um importante fator para a avaliação de sua segurança, visto que os peptídeos além de causar danos no patógeno também podem causar a destruição da integridade das células de mamíferos (WANG, 2021).

Os peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentaram uma alta toxidade aos eritrócitos humanos e de peixes, e essa toxicidade seguiu o padrão de dose resposta, ou seja, conforme aumenta-se a concentração de peptídeo maior é a porcentagem de hemólise causada (Figura 34 e 35). O peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 mostrou a maior toxicidade com HC50 de 0,8 µg/mL e 109 µg/mL em eritrócitos humanos e de peixes, respectivamente. O p-Bt-Hy-a1 foi o de menor atividade em eritrócitos humanos, com valores de HC50 = 7,9 µg/mL, sendo que em eritrócitos de peixes o valor foi de 217 µg/mL (tabela 12).

A toxicidade destes peptídeos pode ser relacionada com a toxicidade da Hy-a1, já que o peptídeo p-Bt não apresentou toxicidade contra eritrócitos (dados não publicados). A Hy-a1 apresenta alta toxicidade, sendo o seu HC50 determinado como 33,55 µg/mL (CASTRO 2009). Essa alta toxicidade foi confirmada neste estudo (tabela 12), no entanto, com valor de HC50 menor. Esta variação pode ser atribuída a fatores experimentais como metodologia, doador, etc. Outros análogos do peptídeo Hy-a1 também apresentaram uma alta atividade hemolítica. A adição de um triptofano na posição 6 de sua sequência promoveu o aumento da atividade hemolítica em relação ao peptídeo original (CRUSCA et al., 2010). Este resultado também pode estar relacionado com a estruturação do peptídeo em α-hélice, já que no estudo de Mai et al (2015) ele demonstrou que quanto mais estruturado o peptídeo em α-hélice, maior a atividade hemolítica.

No estudo de Assane et al. (2021), o peptídeo Hy-a1 também demonstrou uma alta atividade hemolítica quando testados *in vitro* contra os glóbulos vermelhos da Tilápia do Nilo, porém também demonstra uma boa atividade antimicrobiana contra as cepas de *Lactococcus garvieae e Streptococcus agalactiaes,* demonstrando que a sua atividade hemolítica também pode estar relacionada com a sua atividade antibacteriana.

Tabela 12 - HC50 dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt-Hy-a1 em eritrócitos humanos e de peixes

Peptídeos	**HC50 eritrócitos humanos (µg/mL)**	**HC50 eritrócitos peixes (µg/mL)**
Hy-a1	1,0	110
Cys-Bt-Hy-a1	0,8	109
p-Bt-Hy-a1	7,9	217
p-Bt[PEG]Hy-a1	1,2	120

Figura 34 - Atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1.

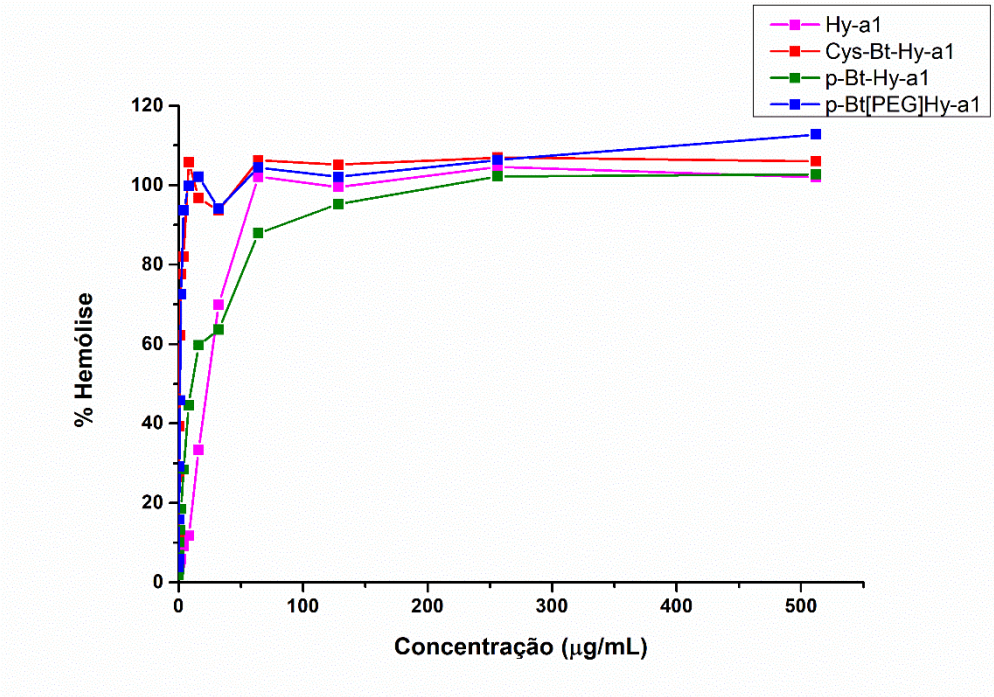
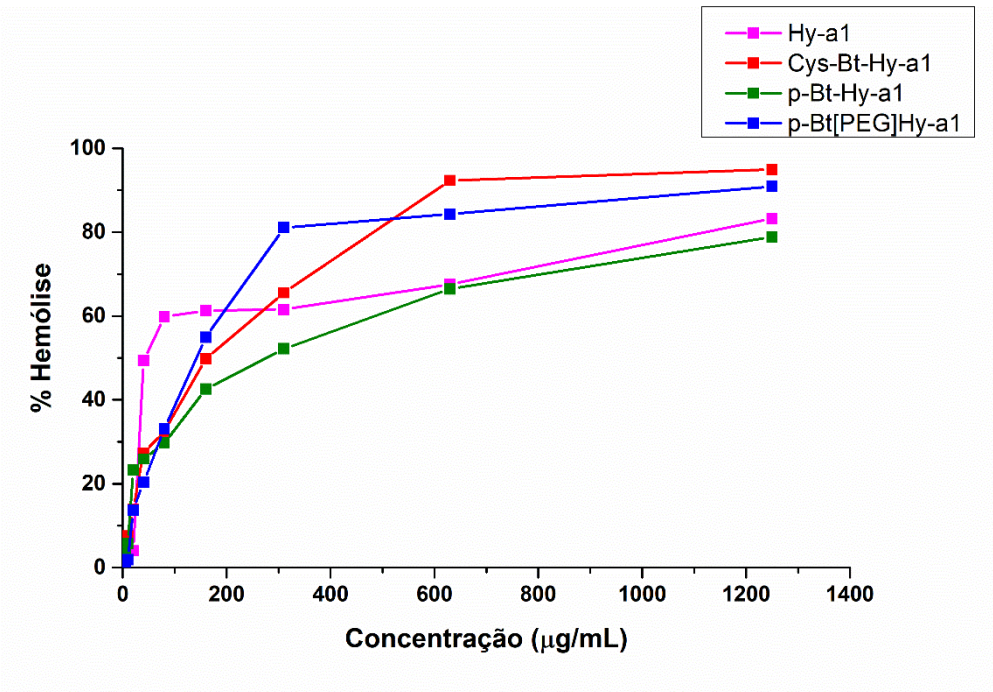


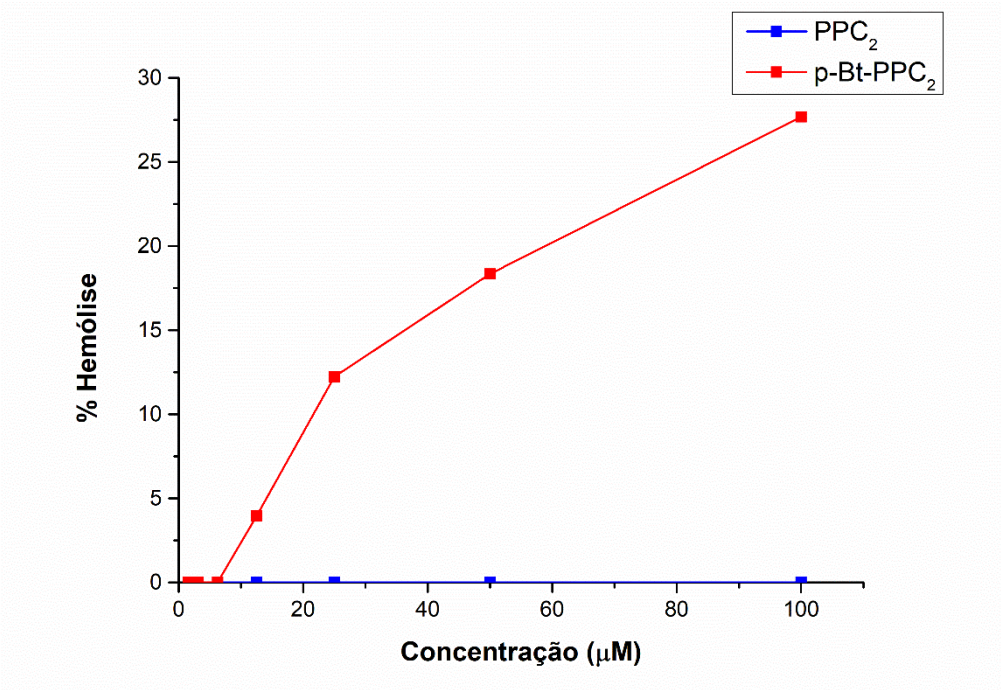
Figura 35 - Atividade hemolítica em eritrócitos de peixes dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1.



4.3.2.2 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com PPCs

Os PPCs sozinhos ou conjugados com o peptídeo p-Bt, de forma geral, não apresentaram atividade hemolítica (dados não colocados), sendo que a única molécula que apresentou esse efeito foi a p-Bt-PPC_2 - porcentagem de hemólise de cerca de 28%. Essa porcentagem, também segue o padrão dose resposta, pois ao diminuir a concentração de peptídeo a porcentagem de hemólise também diminui (figura 36). Porém mesmo com essa porcentagem de hemólise o peptídeo não chegou a permitir o cálculo de HC50, demonstrando que o uso do mesmo possa ser viável. A causa encontrada para esta atividade pode estar relacionada com a hidrofobicidade do PPC_2, pois ao ser conjugado ao p-Bt aumenta a hidrofobicidade da molécula. Regiões hidrofóbicas podem interagir com a região interfacial das membranas e destruir as estruturas das mesmas, fazendo com que o aumento da hidrofobicidade possa facilitar o processo de hemólise (WANG et al., 2021).

Figura 36 - Atividade hemolítica dos peptídeos PPC_2 e p-Bt-PPC_2.



5 CONCLUSÃO

A síntese peptídeo em fase sólida possibilitou a obtenção dos peptídeos utilizados com um bom rendimento.

Os peptídeos resultantes da conjugação da Hy-a1 com o peptídeo p-Bt mostraram menor atividade antimicrobiana, sendo que essa diminuição pode estar relacionada a mudança estrutural do peptídeo obtido, permitindo a interação com outros componentes da parede bacteriana e dificultando a interação com seu alvo. Porém mais estudos precisam ser feitos para a confirmação destes dados.

O peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentou uma boa atividade contra a cepa bacteriana de *A. jandaei* IA1, sendo o peptídeo da conjugação p-Bt/Hy-a1 (p-Bt-Hy-a1) o que obteve maior e mais diversificada atividade contra as bactérias.

Os peptídeos derivados da conjugação do p-Bt com os PPCs demonstraram resultados promissores contra bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, sem perder atividade contra as bactérias Gram-negativas. Destaque para o peptídeo p-Bt-PPC_1, que mostrou o menor MIC.

A hemólise dos peptídeos conjugados Hy-a1 com o peptídeo p-Bt foi alta, resultado que pode ser explicado pela toxicidade apresentada pela Hy-a1, já que p-Bt não apresenta essa atividade.

A conjugação com os PPCs não apresentou atividade hemolítica, com exceção do peptídeo p-Bt-PPC_2, que pode ser explicada pelo aumento da hidrofobicidade do peptídeo p-Bt ao ser conjugado com o PPC_2.

Os resultados obtidos até o momento mostram que a conjugação p-Bt com PPCs torna o peptídeo ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, indicando um caminho para o desenvolvimento de moléculas mais ativas contra vários tipos de bactérias.

Somado a isto, os dados aqui demonstrados podem contribuir para o entendimento do modo de ação dos peptídeos aqui estudados, e mostra que a conjugação de peptídeos não é um processo simples, sendo que mais estudos são necessários para um melhor entendimento do efeito da conjugação na atividade antibacteriana.

REFERÊNCIAS

ABUSHAHEEN, M. A.; FATANI, A. J.; ALOSAIMI, M.; MANSY, W.; GEORGE, M.; ACHARYA, S.; RATHOD, S.; DIVAKAR, D. D.; JHUGROO, C.; VELLAPPALLY, S.; KHAN, A. A.; SHAIK, J.; JHUGROO, P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.

ALMAAYTAH, A.; QAOUD, M. T.; ABUALHAIJAA, A.; AL-BALAS, Q.; ALZOUBI, K. H. Hybridization and antibiotic synergism as a tool for reducing the cytotoxicity of antimicrobial peptides. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 835, 2018.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49-59, 2017.

ASSANE, I. M.; SANTOS-FILHO, N. A.; de SOUSA, E. L.; de ARRUDA BRASIL, M. C.O.; CILLI, E. M.; PILARSKI, F. Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

AWASTHI, M. K., HONGYU, T. L, VERMA, S., DUAN, Y., AWASTHI, S. K, WANG, Q., REN, X., ZHAO, J., ZHANG, Z. The behavior of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during poultry manure composting. **Bioresource technology**, v. 280, p. 70-78, 2019.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. **Journal of dental research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.

BEN, Y., FU, C., HU, M., LIU, L., WONG, M. H., ZHENG, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental research**, 2018.

BÖHMOVÁ, E., MACHOVÁ, D., PECHAR, M., POLA, R., VENCLÍKOVÁ, K., JANOUŠKOVÁ, O., ETRYCH, T. Cell-Penetrating Peptides: a Useful Tool for the Delivery of Various Cargoes Into Cells. **Physiological research**, v. 67, p. S267-S279, 2018.

BÖHMOVÁ, E.; POLA, R.; PECHAR, M. PARNICA, J.; MACHOVÁ, D.; JANOUŠKOVÁ, O.; ETRYCH, T. Polymer Cancerostatics Containing Cell-Penetrating Peptides: Internalization Efficacy Depends on Peptide Type and Spacer Length. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 59, 2020.

BOTTAGISIO, M.; BARBACINI, P.; BIDOSSI, A.; TORRETTA, E.; LANCEY-PULCINI, E.; GELFI, C.; JAMES, G. A.; LOVATI, A. B.; CAPITANIO, D. Phenotypic Modulation of Biofilm Formation in a Staphylococcus epidermidis Orthopedic Clinical Isolate Grown Under Different Mechanical Stimuli: Contribution From a Combined Proteomic Study. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 2194, 2020.

BWALYA, P.; HANG'OMBE, B. M.; GAMIL, A. A.; MUNANG'ANDU, Ø. E.; MUTOLOKIL, S. A whole-cell *Lactococcus garvieae* autovaccine protects Nile tilapia against infection. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0230739, 2020.

CAI, D.; GAO, W.; HE, B.; DAI, W.; ZHANG, H.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Hydrophobic penetrating peptide PFVYLI-modified stealth liposomes for doxorubicin delivery in breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2283-2294, 2014.

CARDOSO, P.; GLOSSOP, H.; MEIKLE, T. G.; ABURTO-MEDINA, A.; CONN, C. E.; SAROJINI, V.; VALERY, C. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. **Biophysical Reviews**, p. 1-35, 2021.

CASTRO, M. S., FERREIRA, T. C. G., CILLI, E. M. CRUSCA JR, E., MEDES-GIANNINI, M. J. S., SEBBEN, A., RICART, C. A., SOUSA, M. V., FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog Hypsiboas albopunctatus ("spotted treefrog"). **Peptides**, 2009, 30.2: 291-296.

CASALLANOVO, F.; OLIVEIRA F. J. F.; SOUZA F. C.; ROS, U.; PENTÓN, D.; TEJUCA, M.; MARTÍNEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANJO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREJER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers,** v. 84, n. 2, p. 169-80, 2006.

CIUMAC, D., GONG, H., HU, X., LU, J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of colloid and interface science**, v. 537, p. 163-185, 2019.

CHEN, H.; BATTALAPALLI, D.; DRAZ, M. S.; ZHANG, P.; RUAN, Z. The Application of Cell-Penetrating-Peptides in Antibacterial Agents. **Current Medicinal Chemistry**, 2021.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.

CRUSCA JR, E., REZENDE, A. A., MARCHETTO, R., MENDES-GIANNINI, M. J. S, FONTES, W., CASTRO, M. S., CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Peptide Science**, 2011, 96.1: 41-48.

DAGA, A. P.; KOGA, V. L.; SONCINI, J. G. M.; MATOS, C. M.; PERUGINI, M. R. E.; PELISSON, M.; KOBAYASHI, R. K. T.; VESPERO, E. C. Escherichia coli bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 191, 2019.

D'ANDREA, M. M.; FRAZIANO, M.; THALLER, M. C.; ROSSILINI, G. M. The Urgent Need for Novel Antimicrobial Agents and Strategies to Fight Antibiotic Resistance. 2019.

DESALE, K.; KUCHE, K.; JAIN, S. Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. **Biomaterials Science**, 2021.

DERAKHSHANKHAH, H.; JAFARI, S. Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1090-1096, 2018.

DONG, J.; ZHANGA, L.; XUA, N., ZHOUA, S.; SONGC, Y.; YANGA, Q.; LIUA, Y.; YANGA, Y.; AIA, X. Rutin reduces the pathogenicity of Streptococcus agalactiae to tilapia by inhibiting the activity of sortase A. **Aquaculture**, v. 530, p. 735743, 2021.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; ALECRIM, J. V. C., SOUZA, P. G.; CARVALHO, F. C. A.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Meningitis Caused by Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus): Infection and Inflammatory Response. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2166, 2020.

FERNANDES, D. C.; ETOB, S. F.; FUNNICELLIB, M. I. G.; FERNANDES, C. C.; CHARLIR-SILVAC, I.; BELOC, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Immunoglobulin Y in the diagnosis of Aeromonas hydrophila infection in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture, v. 500, p. 576-585, 2019.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of infection and public health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

GALDIEIRO, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; LIBRALATO, G.; GUIDA, M.; CAROTENUTO, R. Biofilms: Novel strategies based on antimicrobial peptides. **Pharmaceutics,** v. 11, n. 7, p. 322, 2019.

GONÇALVES, E.; CARVALHAL, R; MESQUITA, R.; AZEVEDO, J., COELHO, M. J.; MAGALHÃES, R., FERRAZ, M. P.; MANSO, M. C.; GAVINHA, S.; PINA, C.; CARDOSO, I. L. Detection of Staphylococcus aureus (MRSA/MSSA) in surfaces of dental medicine equipment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 4, p. 1003-1008, 2020.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants–A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GRECO, I.; MALCHANOVA, N.; HOLMEDAL, E.; JENSSEN, H.; HUMMEL, B. D.; WATTS, J. L.; HÅKANSSON, J.; HANSEN, P. R.; SVENSON, J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

GUI, L.; ZHANG, X. H.; QIAO, Z. Y.; WANG, H. Cell-Penetrating Peptides and Polymers for Improved Drug Delivery. **ChemNanoMat**, v. 6, n. 8, p. 1138-1148, 2020.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 4, p. 406-424, 2017.

GUIMARÃES, C. F. R. C. Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos. 2017. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais.

HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. **Nat. Biotechno**l. 2006, 24, 1551–1557.

HANSEN, P. R.; ODDO, A. Fmoc solid-phase peptide synthesis. In: **Peptide Antibodies**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 33-50.

JIANG, X.; YANG, K.; YUAN, B.; HAN, M; ZHU, Y.; ROBERTS, K. D.; PATIL, N. A., LI, J.; GONG, B.; HANCOCK, R. E. W., VELKOV, T., SCHREIBER, F.; WANG, L. LI, J. Molecular dynamics simulations informed by membrane lipidomics reveal the structure–interaction relationship of polymyxins with the lipid A-based outer membrane of Acinetobacter baumannii. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3534-3543, 2020.

JUNIOR, G. B.; SANTOS, A. C.; SOUZA, C. F.; BALDISSERAB, M. D.; MOREIRAC, K. L. S.; VEIGAC, M. L.; ROCHAC, M. I. U. M.; VARGASD, A. P. C.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Citrobacter freundii infection in silver catfish (Rhamdia quelen): hematological and histological alterations. **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 276-280, 2018.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D., COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595, 1970.

KIMURA, M.; KOSUGE, K.; KUROSAKI, N.; TAGAWA, N.; KATO, I.;UCHIDA, Y. Potent Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Designed from Salusin-β and HIV-1 Tat (49-57). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, p. c20-00209, 2020.

KRISHNAN, M.; CHOI, J.; JANG, A.; KIM, Y. A Novel Peptide Antibiotic, Pro10-1D, Designed from Insect Defensin Shows Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities in Sepsis Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6216, 2020.

KUPPUSAMY, R.; WILLCOX, M.; BLACK, D. StC; KUMAR, N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 44, 2019.

LEE, H., LIM, S. I., SHIN, S. H., LIM, Y., KOH, J. W., YANG, S. Conjugation of Cell-Penetrating Peptides to Antimicrobial Peptides Enhances Antibacterial Activity. **ACS omega**, v. 4, n. 13, p. 15694-15701, 2019.

LEÓN-CALVIJO, M. A.; LEAL-CASTRO, A. L.; ALMANZAR-REINA, G. A.; ROSASPÉREZ, J. E.; GARCÍA-CASTAÑEDA, J. E; RIVERA-MONROY, Z. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against Escherichia coli ATCC 25922 and Enterococcus faecalis ATCC 29212. **BioMed research international**, 2015, 2015.

LEI, J.; SUN, L.; HUANG, S.; ZHU, C.; LI, P.; MACKEY, V.; COY, D. H.; HE, Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 3919, 2019.

LORENZON, E. N.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M. Dimerization of antimicrobial peptides: A promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. **Protein and peptide letters**, v. 26, n. 2, p. 98-107, 2019.

LI, S.; WANG, Y.; XUE, Z.; JIA, Y.; LI, R.; HE, C.; CHEN, H. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

LOZANO-MUÑOZ, I.; WACYK, J.; KRETSCHMER, C.; V'ASQUEZ-MARTÍNEZ, Y.; MARTIN, M. C. S. Antimicrobial resistance in Chilean marine-farmed salmon: Improving food safety through One Health. **One Health**, p. 100219, 2021.

MAGANA, M.; PUSHPANATHAN, M.; SANTOS, A. L.; LEANSE, L.; FERNANDEZ, M.; IOANNIDIS, A.; GIULIANOTTI, M. A.; APIDIANAKIS, Y.; BRADFUTE, S.; FERGUSON, A. L.; CHERKASOV, A.; SELEEM, M. N.; PINILLA, C.; FUENTE-NUNEZ, C.; LAZARIDIS, T.; DAI, T.; HOUGHTEN, R. A.; HANCOCK, R. E. W.; TEGOS, G. P. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTADN BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 194, 2016.

MAI, X.; HUANG, J.; TAN, J.; HUANG, Y.; CHEN, Y. Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 7, p. 561-568, 2015.

MANAGE, P. M.; LIYANAGE, G. Y. Antibiotics induced antibacterial resistance. In: Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology. **Butterworth-Heinemann**, 2019. p. 429-448.

MANZINI, M. C. Efeito da carga dos lipídios na interação do BP100 em modelos de membrana. 2012. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MISHRA, A. K.; CHOI, J.; MOON, E.; BAEK, K. H. Tryptophan-rich and proline-Rich antimicrobial peptides. **Molecules**, 2018, 23.4: 815.

MORAVEJ, H.; MORAVEJ, Z.; YAZDANPARAST, M.; HEIAT, M.; MIRHOSSEINI, A.; MOGHADDAM, M. M.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 747-767, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MURAKAMI, L. M. Z.; RULLE, R. Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. 2016. **Memorando Técnico.** Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

NAHA, A.; MIRYALA, S. K.; DEBROY, R.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Elucidating the multi-drug resistance mechanism of Enterococcus faecalis V583: a gene interaction network analysis. **Gene**, v. 748, p. 144704, 2020.

NEUNDORF, I. Antimicrobial and Cell-Penetrating Peptides: How to Understand Two Distinct Functions Despite Similar Physicochemical Properties. In: **Antimicrobial Peptides**. Springer, Singapore, 2019. p. 93-109.

ONUMA, Y.; SAKATAKAE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M. NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Rev. Antimicrob. Resist**, 2014, 20: 1-16.

PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. A lytic podophage specific to fish pathogenic Edwardsiella tarda. Pak. **J. Biotechnol**, v. 15, n. 1, p. 117-121, 2018.

QI, X.; JIN, Y; DUAN, J.; HAO, Z.; WANG, S.; GUO, Y.; LV, J.; HU, L.; WANG, L.; YU, F. SesI may be associated with the invasiveness of Staphylococcus epidermidis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2574, 2018.
RHEE, M.; DAVIS, P. Mechanism of uptake of C105Y, a novel cell-penetrating peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1233-1240, 2006.

RUSESKA, I.; ZIMMER, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 11, n. 1, p. 101-123, 2020.

SÁNCHEZ, A.; BENITO, N.; RIVERA, A.; GARCÍA, L.; MIRÓ, E.; MURC, I.; GONZÁLEZ Y.; GUTIÉRREZ, C.; HORCAIADA, J. P.; ESPINAL, P.; NAVARRO, F. Pathogenesis of Staphylococcus epidermidis in prosthetic joint infections: can identification of virulence genes differentiate between infecting and commensal strains?. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 3, p. 561-568, 2020.

SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; RAMOS, M. A. S.; SANTOS C. T.; PICCOLI, J. P; BAUAB, T. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, v. 103, p. 160-168, 2015.

SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, R. S.; SGARDIOLI, B. F.; RAMOS, M. A. S.; PICCOLI, J. P.; CAMARGO, I. L. B. C.; BAUAB, T. M.; CILLI, E. M. Antibacterial Activity of the Non-Cytotoxic Peptide (p-BthTX-I) 2 and Its Serum Degradation Product against Multidrug-Resistant Bacteria. **Molecules**, 2017, 22.11: 1898.

SANTOS-FILHO, N. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; RIGETTO, G. M.; LEAL, T. C., CILLI, E. M. **PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DIMÉRICOS des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K [Trp 3, 5], des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K E [Trp 3, 5, 10], des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K E SEUS USOS COMO ANTIMICROBIANO.** Depositante: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Procurador: Renan Padron Almeida. BR1020180719149. Depósito: 24 out. 2018

SANTOS-FILHO, N. A.; de FREITAS, L. M; SANTOS, C. T; PICCOLI, J. P; FONTANA, C. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) 2 derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA2)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Toxicon**, 2021.

SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors,

prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. **Gut pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2019.

SEYFI, R.; KAHAKI, F. A.; EBRAHIMI, T.; MONTAZERHEB, S.; EYVAZI, S.; BABAEIPOUR, V.; TARHRIZ, V. Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451-1463, 2020.

SHAHI, N.; MALLIK, S. K. Emerging bacterial fish pathogen Lactococcus garvieae RTCLI04, isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Genomic features and comparative genomics. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104368, 2020.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in colloid and interface science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

WATKINS, C. L.; BRENNAN, P.; FEGAN, C.; TAKAYAMA, K.; NAKASE, I.; FUTAKI, S.; JONES, A. T. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 3, p. 237-244, 2009.

WANG, G. The antimicrobial peptide database provides a platform for decoding the design principles of naturally occurring antimicrobial peptides. **Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 8-18, 2020.

WANG, Q.; WANGA, X.; WANGD, X.; FENGE, R.; LUOA, Q.; HUANGA, J. Generation of a novel Streptococcus agalactiae ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia. Fish & shellfish immunology, v. 81, p. 49-56, 2018.

WANG, T.; ZOU, C.; WEN, N.; LIU, X.; MENG, Z.; FENG, S.; ZHENG, Z., MENG, Q., WANG, C. The effect of structural modification of antimicrobial peptides on their antimicrobial activity, hemolytic activity, and plasma stability. **Journal of Peptide Science**, p. e3306, 2021.

WANG, Y. F., XU; X., FAN, X.; ZHANG, C.; WEI, Q.; WANG, X.; GUO, W.; XING, W.; YU, J.; YAN, J. L.; LIANG, H. P. A cell-penetrating peptide suppresses inflammation by inhibiting NF-κB signaling. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 10, p. 1849-1857, 2011.

WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A.; LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2331-2337, 2014.

WEN, Z.; SHANG, Y.; XU, G.; PU; Z.; LIN, Z.; BAI, B.; CHEN, Z., ZHENG, J.; DENG, Q.; YU, Z. Mechanism of eravacycline resistance in clinical Enterococcus faecalis isolates from China. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 916, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental aspects of manufacturing for the prevention of antimicrobial resistance. **WHO Drug Information**, v. 33, n. 4, p. 709-712, 2019.

WU, S. C.; LIU, F.; ZHU, K.; SHEN, J. Z. Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. Journal of agricultural and food chemistry, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

YASIR, M.; WILLCOX, M. D. P.; DUTTA, D. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. **Materials**, v. 11, n. 12, p. 2468, 2018.

ZOU, L.; PENG, Q.; WANG, P.; ZHOU, B. Progress in research and application of HIV-1 TAT-derived cell-penetrating peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 250, n. 2, p. 115-122, 2017.