



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA
MESTRADO ACADÊMICO

ANNA CAROLINA TOLEDO BORGES

**Estudo da interação *in vitro* de peptídeos sintetizados a partir da região RBD
do SARS-CoV-2 com o receptor ECA-2**

ARAQUARA, SP

2023

ANNA CAROLINA TOLEDO BORGES

Estudo da interação *in vitro* de peptídeos sintetizados a partir da região RBD do SARS-CoV-2 com o receptor ECA-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

ARARAQUARA, SP

2023

B731e Borges, Anna Carolina Toledo.
Estudo da interação in vitro de peptídeos sintetizados a partir da região RBD do SARS-CoV-2 com o receptor ECA-2 / Anna Carolina Toledo Borges. – Araraquara, 2023.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

1. Glicoproteína Spike. 2. SARS-CoV-2. 3. Síntese Peptídica. 4. ECA-2. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da Interação in vitro de peptídeos sintetizados a partir da região RBD do SARS-CoV-2 com o receptor ECA-2

AUTORA: ANNA CAROLINA TOLEDO BORGES

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Imunologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ADILSON CÉSAR ABREU BERNARDI (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 29 de setembro de 2023

ESTE TRABALHO FOI FINANCEIRAMENTE APOIADO COM UMA BOLSA DE ESTUDOS DO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) DURANTE 24 MESES ATRAVÉS DO PROCESSO 162054/2021-1 E PELO PROCESSO FUNDUNESP nº 3119/2020. O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR – BRASIL (CAPES) – CÓDIGO DE FINANCIAMENTO 001.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à Anna Beatriz, que nos deixou cedo demais. Também dedico este trabalho a minha família, que me deu as forças para conseguir terminá-lo.

Agradecimentos

Agradeço à minha família – mãe, pai e a Anna Clara (irmã) – pelo amor, apoio e força para realizar este trabalho.

Agradeço à minha irmã Anna Beatriz, que mesmo não estando aqui durante todo o processo, me ajudou muito no começo e sempre me apoiou em todas as minhas decisões.

Agradeço à minha outra família – Priscilla (esposa) e Albus (cachorro) – pelo suporte e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Paulo Inácio pela oportunidade, orientação e os aprendizados.

Agradeço ao pessoal do laboratório – Aline, Anderson, Rualdo, Lorrane, Eloise, Elisandra, Felipe, Nicolý e Rafael – pela companhia e amizade.

Agradeço ao Anderson pelas sequências.

Agradeço em especial à Aline e à Lorrane por ouvir meus desabafos e por me hospedarem sempre e, pela nossa amizade.

Agradeço à UNESP pela infraestrutura e pelo programa.

Agradeço à CNPq e à CAPES pelo financiamento.

Resumo

O SARS-CoV-2 surgiu em 2019 na China e rapidamente se espalhou pelo mundo causando uma pandemia com mais de três anos de duração e com quase 15 milhões de mortes, segundo a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022). Responsável por causar a COVID-19, uma nova forma de síndrome respiratória aguda e grave, abalou o mundo economicamente e demograficamente. Graças aos avanços tecnológicos o genoma viral foi rapidamente sequenciado e identificado 4 importantes proteínas estruturais: a glicoproteína de superfície (S) – responsável pela entrada no vírus na célula do hospedeiro; a glicoproteína de membrana (M); a fosfoproteína do nucleocapsídio (N); e, a proteína do envelope (E). A descoberta da região da proteína S capaz de promover a ligação do vírus ao receptor na célula alvo, denominado de RBD (Receptor-Binding Domain), permitiu por meio de estudos *in silico* o desenho e síntese de peptídeos para o entendimento da interação vírus-célula. Neste sentido, este trabalho teve como proposta a análise da sequência predita da proteína S correspondente ao RBD para a síntese dois peptídeos denominados E7 selvagem (E7w) e E7 com a mutação L452R (E7mut). A síntese manual foi feita em suporte sólido de rink-amida com grau de substituição de 04-06mesh/g, usando a estratégia Fmoc/tBu. Os peptídeos sintetizados foram caracterizados pela espectrometria de massas e suas qualidades avaliadas por HPLC. O estudo da interação dos peptídeos com a ECA-2 foi realizado em um novo sistema proposto neste trabalho usando sensores eletroquímicos para imobilização da enzima e análise das interações pela inibição da transdução do sinal eletrônico na superfície do eletrodo de trabalho. Como resultado, ambos os peptídeos apresentaram excelentes interações com o receptor ECA-2 nas concentrações de 1 e 10ng. Entretanto, a mutação L452R no peptídeo E7 revelou maior eficiência de interação quando comparada com a forma selvagem. Portanto, conclui-se que o modelo de plataforma proposto para o estudo de *binding* vírus-receptor é de grande relevância e que a mutação estudada permitiu corroborar no entendimento da eficiência do SARS-CoV-2 (variante P.4 da linhagem B.1.1.28) na infecção das células possuindo o receptor EAC-2 e conseqüentemente sugerir que as variantes com maior transmissibilidade possam apresentar aspectos semelhantes a esse, avaliado neste trabalho.

Palavras-chave: Glicoproteína Spike; SARS-CoV-2; Síntese Peptídica; ECA-2

Abstract

SARS-CoV-2 emerged in 2019 in China and quickly spread around the world causing a pandemic that lasted more than three years and killed nearly 15 million people, according to the estimate of the World Health Organization (WHO, 2022). Responsible for causing COVID-19, a new form of severe acute respiratory syndrome, it shook the world economically and demographically. Thanks to technological advances, the viral genome was quickly sequenced and identified 4 important structural proteins: the surface glycoprotein (S) - responsible for the entry of the virus into the host cell; the membrane glycoprotein (M); the nucleocapsid phosphoprotein (N); and the envelope protein (E). The discovery of the region of the S protein capable of promoting the binding of the virus to the receptor on the target cell, called RBD (Receptor-Binding Domain), allowed through *in silico* studies the design and synthesis of peptides for understanding the virus-cell interaction. In this sense, this work proposed to analyze the predicted sequence of the S protein corresponding to the RBD for the synthesis of two peptides called E7 wild type (E7w) and E7 with the L452R mutation (E7mut). The manual synthesis was done on a solid rink-amide support with a degree of substitution of 04-06mesh/g, using the Fmoc/tBu strategy. The synthesized peptides were characterized by mass spectrometry and their qualities evaluated by HPLC. The study of the interaction of the peptides with ACE-2 was carried out in a new system proposed in this work using electrochemical sensors for enzyme immobilization and analysis of interactions by inhibition of electronic signal transduction on the surface of the working electrode. As a result, both peptides showed excellent interactions with the ACE-2 receptor at concentrations of 1 and 10ng. However, the L452R mutation in peptide E7 revealed greater interaction efficiency when compared to the wild type. Therefore, it is concluded that the platform model proposed for the study of virus-receptor binding is of great relevance and that the mutation studied allowed to corroborate the understanding of the efficiency of SARS-CoV-2 (P.4 variant of the B1.1.28 lineage) in the infection of cells possessing the EAC-2 receptor and consequently suggest that variants with higher transmissibility may present similar aspects to this one, evaluated in this work.

Keywords: Spike Glycoprotein; SARS-CoV-2; Peptide Synthesis; ECA-2

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do SARS-CoV-2.....	página 10
Figura 2: Comparação da organização genômica de dois β -coronavírus: SARS-CoV original e 2019-nCoV (o novo coronavírus).....	página 10
Figura 3: Esquema da proteína S do SARS-CoV-2.....	página 11
Figura 4: Ciclo do SARS-CoV-2.....	página 11
Figura 5: Ligação SARS-CoV-2 à ECA-2.....	página 13
Figura 6: Estrutura geral dos aminoácidos.....	página 14
Figura 7: Esquema de um espectrômetro de massas.....	página 17
Figura 8: Posição do peptídeo E7. a) Na proteína S. b) Na estrutura quaternária da proteína S.....	página 24
Figura 9: Exemplos de resultados do teste de ninidrina. a) Sem nitrogênio livre. b) Com nitrogênio livre.....	página 25
Figura 10: Precipitado seco do peptídeo E7 wt.....	página 25
Figura 11: Precipitado seco do peptídeo E7 mut.....	página 26
Figura 12: Espectro de massas do peptídeo E7wt.....	página 26
Figura 13: Espectro de massas do peptídeo E7mut.....	página 27
Figura 14: Cromatograma do peptídeo E7wt.....	página 28
Figura 15: Cromatograma do peptídeo E7mut.....	página 29
Figura 16: Esquema da reação no sensor.....	página 30
Figura 17: Teste de <i>binding</i> do peptídeo E7wt-ECA-2.....	página 30
Figura 18: Teste de <i>binding</i> do peptídeo E7mut-ECA-2.....	página 31
Figura 19: Comparação do <i>binding</i> entre os peptídeos E7wt e E7mut. a) Na concentração de 1 ng. b) Na concentração de 10 ng. c) Na concentração de 50 ng.....	página 32
Figura 20: Resultado do teste de viabilidade da enzima.....	página 33
Figura 21: Gráfico da atividade da ECA-2.....	página 34
Figura 22: Gráfico da atividade enzimática na presença dos peptídeos. a) E7wt. b) E7mut.....	página 35
Figura 23: Gráfico da atividade da ECA-2 na presença do inibidor.....	página 36
Figura 24: Gráfico da comparação da atividade enzimática com a presença dos peptídeos E7wt e W7mut em sua melhor concentração.....	página 36

Figura 25: Gráfico da comparação da atividade enzimática com a presença dos peptídeos E7wt e W7mut na mesma concentração.....página 37

Figura 26: Gráfico de coluna montado com o ponto final da leitura da atividade da ECA-2.....página 38

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1: Vacinas contra a COVID-19.....	página 8
Quadro 2: Sequências sintetizadas.....	página 23
Quadro 3: Ionização teórica dos peptídeos E7 wt e E7 mut.....	página 27

Lista de símbolos e abreviações

µg: Migrograma

µL: Microlitro

µM: Micromolar

a.C.: Antes de Cristo

Boc: terc-butiloxicarbonil

DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida

DCM: diclorometamo

DMF: dimetilformamida

DODT: 2,2'-etil enedioxidietanetriol

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonil

HOBT: N-Hidroxibenzotriazol

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Inib: MLN-4760 – Inibidor seletivo de ECA-2

M: Molar

MERS: Síndrome Respiratória do Oriente Médio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: RNA mensageiro

MUT: mutante

NaCl: Cloreto de Sódio

ng: Nanograma

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salina (sigla em inglês)

Pep: Peptídeo

RBD: Domínio de Ligação ao Receptor

RT-qPCR: Reação da Polimerase em Cadeia da Transcriptase Reversa

[S]: Concentração de Substrato

SARA: Síndrome de Angústia Respiratória Aguda

SNC: sistema nervoso central

SPFS: Síntese de Peptídeo em Fase Sólida

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

Subs: Substrato fluorogênico de ECA-2

TFA: ácido trifluoracético

TIS: triisopropilsilano

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

WT: *wild type* - selvagem

Sumário

1.	Introdução.....	4
1.1	Surtos passados.....	4
1.2	COVID-19.....	7
1.3	SARS-CoV-2.....	9
1.4	Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2 (ECA-2).....	12
1.5	Interação RBD-ECA-2.....	13
1.6	Síntese peptídica.....	14
1.7	Análise e caracterização por espectrometria de massas e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	16
1.8	Sensores eletroquímicos.....	17
1.9	Atividade enzimática.....	18
2.	Objetivos.....	19
2.1	Geral.....	19
2.2	Específicos.....	19
3.	Material e métodos.....	19
3.1	Seleção da sequência peptídica.....	19
3.2	Síntese peptídica e clivagem.....	19
3.3	Análise e caracterização peptídica.....	21
3.3.1	Análise e caracterização peptídica por espectrometria de massas.....	21
3.3.2	Análise e caracterização peptídica por HPLC.....	21
3.4	Estudo de <i>binding</i> através da análise por voltametria de pulso diferencial.....	22
3.5	Teste de viabilidade da ECA-2.....	22
3.6	Teste de atividade enzimática.....	23
4.	Resultados e discussão.....	23
4.1	Seleção da sequência peptídica	23
4.2	Síntese peptídica.....	24
4.3	Análise e caracterização peptídica.....	26
4.3.1	Análise e caracterização por espectrometria de massas.....	26
4.3.2	Análise e caracterização por HPLC.....	28
4.4	Estudo de <i>binding</i> através da análise por voltametria de pulso diferencial.....	30
4.4.1	Comparação entre o <i>binding</i> dos peptídeos.....	32
4.5	Teste de viabilidade da ECA-2.....	33
4.6	Teste de atividade enzimática.....	34
4.7	Teste da atividade enzimática com os peptídeos E7wt e E7mut.....	34
4.8	Comparação entre os peptídeos na alteração da atividade da ECA-2.....	36
5.	Conclusões.....	38
6.	Perspectivas.....	39
7.	Benefícios à sociedade.....	39
	REFERÊNCIAS.....	39

1. Introdução

1.1 Surtos passados:

Pandemias são comuns durante a história, sendo, algumas vezes, atribuídas a pragas bíblicas. (PIRET; BOIVIN, 2021) O estreitamento dos laços entre animais e humanos é o responsável pelas primeiras pandemias. As atividades humanas criaram a situação ideal para o surgimento de patógenos capazes de infectar humanos. (MORENS et al., 2020)

Atualmente, grandes surtos têm ocorrido em períodos cada vez mais curtos, por exemplo, SARS-COV (2002), H1N1 (2009), Zika e Chikungunya (2014) e Ebola (1976-2020). Tal situação pode ser associada à expansão da população, ocupação de novas terras, deslocamento da fauna, mudanças climáticas e desastres naturais. (PIRET; BOIVIN, 2021) A Peste de Atenas (430 a. C) é o primeiro surto com registro, cuja causa ainda é desconhecida, apesar de inúmeras as investigações. (MORENS et al., 2020)

A Peste é uma das doenças mais antigas que ainda assola a humanidade, com 200 milhões de mortes estimadas. Seu agente etiológico é a *Yersinia pestis*, uma bactéria Gram negativa, imóvel e sem esporos, e roedores, seu agente de transmissão. (ZIETZ; DUNKELBERG, 2004; GLATTER; FINKELMAN, 2021) Tem-se três tipos de manifestações da doença: a forma bubônica, a forma septicêmica e a forma pneumônica. A forma bubônica tem como sintomas dor de cabeça e no corpo, febre, calafrios e inchaço nos linfonodos e é causada por mordida de pulgas. A forma septicêmica é a progressão da infecção para o sangue e linfonodos, já a forma pneumônica é a infecção nos pulmões.

As formas septicêmica e pneumônica podem tanto ser as manifestações primárias da infecção como uma evolução da forma bubônica. Foram várias ocorrências ao longo da história, mas três se destacam: a Peste Justiniana (541), a Peste Negra (1347-1351) e a Peste de Hong Kong (1885-hoje). (PIRET; BOIVIN, 2021)

A Peste Justiniana sendo a primeira confirmada, ocorreu na África, Europa, e regiões da Ásia. Foi devastadora, estimando-se perda de metade da população em aproximadamente 20 anos de ondas, sendo um componente na queda do Império Bizantino. (ZIETZ; DUNKELBERG, 2004) A Peste Negra matou 25 milhões de

peças no século XIV na Europa e é a mais famosa e bem documentada; foi espalhada por roedores por toda a Europa. (GLATTER; FINKELMAN, 2021) Além de ter causados muitos óbitos, afetou a economia e intensificou problemas sociais e a geopolítica da Europa. (ZIETZ; DUNKELBERG, 2004)

A Peste de Hong Kong originou-se na região de Yunan, na China, e espalhou-se, através de navios mercantes, para Cantão, Taiwan e Hong Kong. (PIRET; BOIVIN, 2021; GLATTER; FINKELMAN, 2021) O Japão, Índia, América do Sul, África do Sul, Austrália e a porção oeste da América do Norte também foram atingidas. Tendo, somente na Índia, cerca de 12 milhões de mortes. Seu agente etiológico foi descoberto nesta época por Alexandre Yersin. (ZIETZ; DUNKELBERG, 2004) Hoje, a peste ainda causa epidemias e é endêmica em algumas partes do mundo. Em 2017, por exemplo, a doença reemergiu em Madagascar com índice de fatalidade de quase 9%. (PIRET; BOIVIN, 2021)

A Influenza é outra doença com múltiplas ocorrências registradas durante a história. É provocada por vírus da família *Orthomyxoviridae*, um vírus de RNA de fita simples. A infecção deste vírus nos seres humanos está associada à domesticação dos animais. A doença afeta todas as faixas etárias, com uma mortalidade em torno de 1%. (CUNHA, 2004; POTTER, 2008) Em geral, o tempo de incubação é de 1 a 5 dias e os sintomas são: febre de início súbito, dor muscular e fadiga. No inverno, há mais casos, assim como em locais de aglomeração de pessoas ou com alta taxa de umidade. Acredita-se que o primeiro relato de influenza foi em 412 a.C. por Hipócrates, mas o consenso é que a primeira foi em 1580. (CUNHA, 2004; POTTER, 2008)

De todos os surtos de influenza que marcaram a história, a gripe espanhola foi de um grande impacto na sociedade. A gripe espanhola é uma das mais destrutivas, com cerca de 40 a 50 milhões de mortes. Apesar de ter sido nomeada como gripe espanhola, sua origem não foi na Espanha, mas pelo fato de por tido acometido a região mais intensamente. Não há consenso, mas os primeiros surtos foram na América do Norte. A infecção chegou na Europa através dos militares na França e, em seguida, espalhou-se posteriormente pela Itália, Espanha, Alemanha, Grã-Bretanha, Rússia, África e China. De início teve a letalidade esperada, mas após alguns ciclos tornou-se mais virulenta e aumentou sua letalidade em 10 vezes.

Estima-se que, durante o pico, 50% da população mundial foi infectada e chegou-se a uma taxa de letalidade de 25%. (POTTER, 2008) Porém, a mortalidade era maior entre pessoas mais vulneráveis do que entre as populações saudáveis, como os idosos. (CUNHA, 2004) A principal causa de morte era pneumonia. Além disso, não se deve esquecer que ocorreu durante a Primeira Guerra Mundial, aumentando o impacto na sociedade, já que a má nutrição e fome foram responsáveis por mortes.

A pandemia da 'Gripe Suína', em 2009, foi o primeiro surto de influenza no século XXI. Foi semelhante à gripe espanhola e sua mortalidade foi de 2 a 9%, em adultos jovens, com mais de 18.000 mortes no mundo. O vírus surgiu no México e em julho de 2009 já casos em mais de 168 países. (KHANDAKER et al., 2011; PATEL et al., 2010; CHENG et al., 2012) Tendo como sintomas febre, tosse, falta de ar, fadiga, coriza, dor de garganta e mialgia. (PATEL et al., 2010)

Em casos mais graves, desenvolve-se a pneumonia viral com Síndrome de Angústia Respiratória Aguda (SARA), que requer cuidado intensivo e auxílio respiratório. O vírus testou a capacidade de contenção das agências de vigilância, como o Centro de Controle de Doenças e a Organização Mundial da Saúde e dos governos e sociedade, bem como desenvolvimento de vacinas. Seu surto teve fim em 2010 de acordo com a OMS. (CHENG et al., 2012)

Outros vírus que são monitorados pelos órgãos de vigilância são os da família *Coronaviridae*, particularmente, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. (HARAPAN et al., 2020) O SARS-CoV, causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave, foi responsável pela primeira epidemia viral do século XXI, que aconteceu em 2002 e reemergiu em 2004. Faz parte do rol de doenças que quebrou a barreira animal-humano, com a civeta como seu intermediário e o morcego seu transmissor. Sua transmissão é através de aerossóis e oral-fecal, uma vez que também afeta o sistema digestório. Essa epidemia matou 774 pessoas. (SOUZA et al., 2021)

O vírus usa a ECA-2 como receptor para entrar no organismo, uma proteína encontrada no trato respiratório, como os alvéolos pulmonares. Também pode ser encontrado no esôfago, íleo, rins, células do miocárdio e bexiga. (KRISHNAN et al., 2021) O tempo de incubação foi de 2 a 11 dias e os principais sintomas são: febre alta, dores de cabeça, tosse seca, falta de ar, diarreia e diminuição nos linfócitos. A

progressão à forma grave da doença se dá com febres altas e agravamento da capacidade respiratória. A doença reemergiu em 2004 e foi controlada antes mesmo do desenvolvimento da vacina. (SOUZA et al., 2021)

O MERS-CoV é o agente causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), que também tem os morcegos como hospedeiros e os camelos como intermediários. (SOUZA et al., 2021) Teve uma taxa de mortalidade alta em 2014, além de contaminar mais de 2400 pessoas e causar 858 óbitos na Europa, África e América. Apesar de ter mais dados epidemiológicos em 2014, há evidências de que em 2012 tenha acontecido o primeiro surto. (RAMADAN & SHAIB, 2019; SOUZA et al., 2021) Ao contrário do SARS-CoV, o MERS-CoV usa a proteína externa DPP4 (Dipeptidil peptidase-4), com ancoramento feito pela proteína viral Spike e posterior inserção do genoma viral.

Os sintomas comuns são tosse e febre, mas pode surgir pneumonia que pode levar à insuficiência respiratória e à óbito. Neste episódio, a maioria dos casos foram leves e devido à alta mortalidade, o vírus não se espalhou muito. (SOUZA et al., 2021; HU, HUANG & YING, 2020) Como o vírus ainda é circulante, são necessárias outras estratégias para conter o avanço da doença, como vigilância em camelos e dromedários. (PIRET; BOIVIN, 2021)

Com a globalização e aumento dos deslocamentos de animais e pessoas, facilitou bastante a propagação de patógenos, logo era somente uma questão de tempo até o surgimento de um patógeno capaz de causar uma pandemia. (PIRET; BOIVIN, 2021) Assim, em 2019, o novo Coronavírus surgiu; sendo nomeado como SARS-CoV-2, devido a sua semelhança com o SARS-CoV (GORBALENYA et al., 2020). O SARS-CoV-2 foi o causador da maior pandemia do século XXI. (SOUZA et al., 2021)

1.2 COVID-19:

No final de 2019, na China, uma nova síndrome respiratória viral aguda surgiu, a COVID-19. Causada pelo vírus SARS-CoV-2, pertencente à família *Coronaviridae*. (CUI; LI; SHI, 2018) Geralmente, a infecção com sintomas leves, incluindo tosse, dor muscular e anosmia; em alguns casos pode evoluir para quadros clínicos mais graves, como febre alta, pneumonia e estresse respiratório, podendo ser fatal. Porém, a maioria dos pacientes apresenta pouco ou nenhum sintoma, favorecendo a

transmissão e dificultando a contenção da doença (AMORIM FILHO et al., 2020; SUN et al., 2020).

Mais de 14% dos pacientes precisam de hospitalização por insuficiência respiratória e de 3 a 5% destes pacientes vão ser para UTI. (PIRET; BOIVIN, 2021) Apesar de o principal órgão afetado ser o pulmão, sabe-se hoje que a COVID-19 pode causar danos, as vezes irreversíveis, no músculo cardíaco, no SNC e em outros tecidos. (GUPTA et al., 2020)

O registro dos primeiros casos de COVID-19 foi em dezembro de 2019 e em janeiro de 2020, cerca de vinte países já haviam registrado seus primeiros casos. Devido à dificuldade de contenção de vírus respiratórios e como o SARS-CoV-2 já havia razoavelmente se espalhado pelo mundo, em março de 2020 a OMS determinou a pandemia do novo coronavírus (WHO, 2020). O Brasil registrou seu primeiro caso em fevereiro de 2020 e atualmente, março de 2023, tem-se quase 700 mil óbitos e mais de 37 milhões de casos (BRASIL, 2023a).

O diagnóstico da infecção é feito por exames de detecção do vírus, como o RT-qPCR ou o teste rápido de detecção do antígeno e por testes sorológicos, que fazem a dosagem de anticorpos no sangue, como os testes rápidos para a detecção de IgM ou IgG. (FIOCRUZ, 2020) A coleta para realização do teste deve ser feita no terceiro ou quarto dia após o surgimento dos sintomas, podendo ser feita até o décimo dia. O material é coletado com o uso de um *swab* nasal ou nasofaríngeo ou sangue. (BRASIL, 2023b)

No Brasil, foram quatro ondas vividas desde o começo da pandemia, mas graças às vacinas, que surgiram em tempo recorde, elas ficaram cada vez mais curtas e o número de casos em cada onda também diminui. Segue quadro com as principais vacinas.

Quadro 1: Vacinas contra a COVID-19.

Fabricante	Tecnologia	Plataforma
Sinovac / Instituto Butantan	Vírus inativado	Vírus inteiro e inativado adsorvido em adjuvante
Oxford / AstraZeneca	Vetor viral não replicante	Adenovírus de chimpanzé com a proteína S na superfície
Janssen Pharmaceutical	Vetor viral não replicante	Adenovírus do sorotipo 26 com a proteína S na superfície

Pfizer / BioNTech	mRNA	mRNA modificado que codifica a glicoproteína S
-------------------	------	--

FONTE: adaptado de CHUNG; THONE & KWON, 2021; CDC, 2023a.

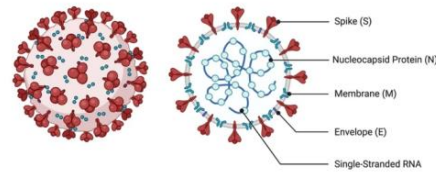
Apesar de anos terem se passado, vacinas terem sido criadas e fármacos terem sido aprovados, ainda há casos novos de COVID-19. (BRASIL, 2023c) Além disso, a pandemia apenas evidenciou a dependência por parte do Brasil de outros países na questão da produção de insumos farmacêuticos. (PASSARINHO, 2021; VALÉCIO, 2021) Logo, é imprescindível a pesquisa de tecnologias nacionais e de fácil obtenção para a contenção deste e de futuros vírus.

1.3 SARS-CoV-2:

O SARS-CoV-2 pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e gênero *Betacoronavirus* (β CoVs) (CUI, LI; SHI, 2018). É vírus envelopado de RNA fita simples positiva (+ssRNA) organizado em duas grandes regiões, a extremidade 5'-replicase e a extremidade 3'-estrutural (ZHU et al., 2020; CHAN et al., 2020). Os coronavírus são de origem zoonótica e amplamente distribuídos através do mundo e, além disso, possuem uma diversidade genética muito grande devido à alta recombinação de RNA; todos estes fatores, tornam o surgimento de novos coronavírus, capazes de infectar o ser humano, algo provável, podendo ou não causar surtos epidemiológicos (CUI; LI; SHI, 2019; ZHU et al., 2020).

Na extremidade 5' encontram-se as ORFs 1a e 1b, que codificam cerca de 16 proteínas não-estruturais envolvidas na replicação do vírus. Já na extremidade 3', encontra-se cerca de 9 fatores acessórios e as 4 proteínas estruturais: a fosfoproteína do nucleocapsídio (N) a glicoproteína de superfície (ou *spike*, S), a glicoproteína de membrana (M), e a proteína do envelope (E) (CHAN et al., 2020).

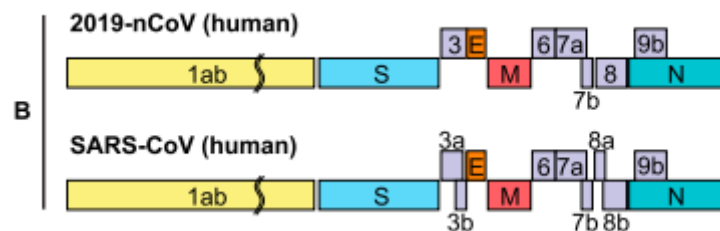
Figura 1: Representação esquemática do SARS-CoV-2.



FONTE: adaptado de JAMISON et al., 2022.

A proteína S é uma glicoproteína composta por duas subunidades (S1 e S2), sendo a responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira; é uma proteína transmembrana de fusão de classe I. (WRAPP et al., 2020; CHENG et al., 2020) A proteína S é encontrada no envelope viral composta por três protômeros idênticos associados uns aos outros, com 1273 aminoácidos de extensão cada. Eles formam as duas subunidades da *Spike*. A subunidade S1 é responsável por ligar o vírus com a superfície da célula alvo, utilizando como receptor a enzima conversora da angiotensina tipo 2 (ECA-2) e contém o domínio de ligação ao receptor (RBD); já a subunidade S2 é altamente conservada e faz a fusão do envelope viral com a membrana celular (AKRAM; MANNAN, 2020). Como representado na figura 2, o SARS-CoV-2 recebeu este nome devido à sua semelhança com o SARS-CoV. (GORBALENYA et al., 2020)

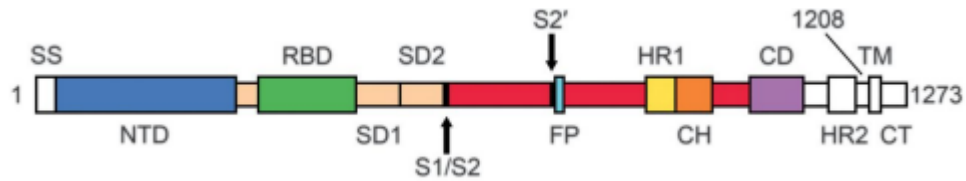
Figura 2: Comparação da organização genômica de dois β -coronavírus: SARS-CoV original e 2019-nCoV (o novo coronavírus).



Fonte: Adaptado de CHAN et al., 2020.

Cada subunidade possui uma função específica, como citada anteriormente. Porém, no SARS-CoV-2 a clivagem por furina se dá previamente à liberação do vírion maduro, conferindo uma vantagem evolutiva ao SARS-CoV-2 em relação ao seu parente, o SARS-CoV. Isto o torna mais transmissível. (ANDERSEN et al., 2020)

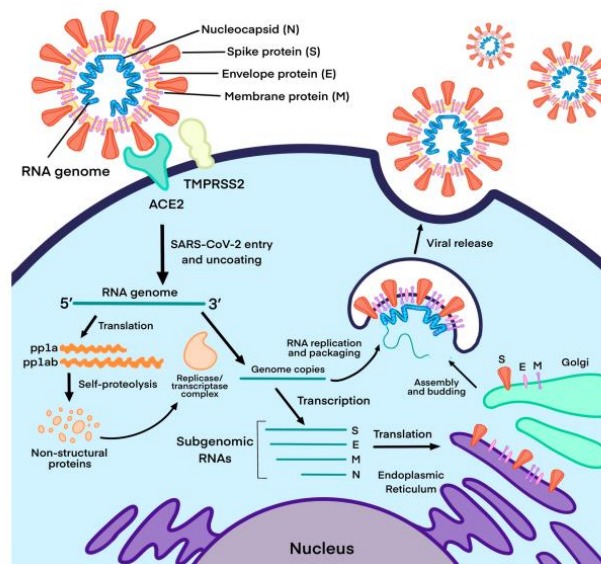
Figura 3: Esquema da proteína S do SARS-CoV-2.



FONTE: adaptado de WRAPP et al., 2020.

Como anteriormente mencionado, a proteína *Spike* é a responsável pelo reconhecimento do receptor ECA-2 e pela ligação do vírus na superfície da célula que está prestes a ser infectada (LAN et al., 2020). Na figura 4, segue uma representação do ciclo de infecção do SARS-CoV-2, por ela é possível observar que uma vez que há o reconhecimento da ECA-2 pelo vírus, este utiliza a maquinaria da célula para formar novos vírus. Este fato fez com que esta proteína fosse muito estudada para a criação de vacinas e fármacos anti-SARS-CoV-2. (CHUNG; THONE; KWON, 2021; ZOST et al., 2020)

Figura 4: Ciclo do SARS-CoV-2.



FONTE: FENG et al., 2020

A alta variabilidade genética, obtida pelas mutações, é comum para vírus patogênicos, logo, há o surgimento das chamadas variantes. Uma variante apresenta uma ou mais mudanças no genoma que a diferencia do vírus antes circulante (CDC, 2023b). Sabe-se que o SARS-CoV-2 apresentou um grande

número de variantes. A patogenia e o comportamento imunológico destas variantes precisam ser estudado e analisado. Normalmente, as mutações geradas no material genético viral são deletérias ou neutras, contudo, uma pequena fração dessas mutações são capazes de alterar a infectividade, a interação vírus-hospedeiro, a gravidade da doença, as propriedades do vírus, a fuga do sistema imunológico e, conseqüentemente, a imunidade produzida pelas vacinas (HARVEY et al., 2021).

As variantes que apresentam mutações no domínio RBD conseguem escapar totalmente ou parcialmente da neutralização mediada por anticorpos direcionados contra este domínio (GRAHAM et al., 2021). Por isso, a importância de estudar os efeitos destas mutações.

1.4 Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2 (ECA-2):

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um dos maiores mecanismos para o controle da pressão sanguínea, dentro deste sistema temos a enzima conversora de angiotensina 1 (ECA-1) como um dos principais componentes. A ECA-1 faz a clivagem da angiotensina 1 em angiotensina 2, promovendo a vasoconstrição; além de reduzir os níveis de bradicinina. Ela é uma enzima dependente de zinco e está situada na superfície das células endoteliais. (BERNE; LEVY, 2010; HUANG, L et al., 2003)

Outro componente deste sistema é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2; estruturalmente semelhante à ECA-1, também depende do zinco e possui uma semelhança com o domínio ativo da ECA-1 de 42%. A enzima conversora da angiotensina tipo 2 (ECA-2) é uma molécula expressa na superfície das células do endotélio, dos rins, dos pulmões e de outros órgãos em abundância. (HUANG et al., 2003; COLOMBO et al., 2020)

Embora estruturalmente similares, funcionalmente são diferentes. Primeiramente a ECA-2 é uma carboxipeptidase e a ECA-1 é uma dipeptidase. Além disso, a ECA-2 faz a conversão da angiotensina 1 em angiotensina 2, provocando efeitos deletérios devido à estimulação dos receptores AT1, com aumento da atividade simpática, reabsorção de sal e água, vasoconstrição, inflamação, liberação de aldosterona e vasopressina, o que contribui para fibrose tecidual, disfunção do endotélio e hipertensão arterial. (HUANG et al., 2003; COLOMBO et al., 2020)

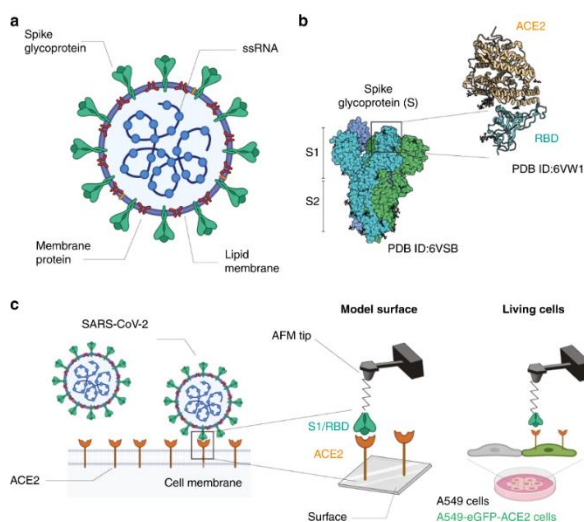
A ECA-2 faz remoção do C-terminal da angiotensina 1, formando angiotensina (1 a 9) e outras diferenças são os substratos específicos e os inibidores específicos. A ECA-2 também faz a quebra da angiotensina 2 em angiotensina (1 a 7), o que ativa receptores que são potentes vasodilatadores, ou seja, podendo ser um regulador negativo do SRA. (HUANG et al., 2003; COLOMBO et al., 2020)

A expressão de ECA-2 ocorre em vários tecidos, entre eles as vias respiratórias superiores e inferiores, o miocárdio e a mucosa gastrointestinal. Mesmo com sua função na saúde e na doença humana não totalmente elucidada, ela aparentemente apresenta um papel importante na regulação da pressão sanguínea e na função cardíaca. Porém, seu papel nas vias respiratórias ainda não foi descoberto; entretanto, foi demonstrado em camundongos que ela age na proteção de lesões pulmonares graves associadas a aspiração e sepse. (COLOMBO et al., 2020)

1.5 Interação RBD-ECA-2:

A ligação entre o RBD do SARS-CoV-2 e a ECA-2 é a etapa inicial para a entrada do vírus na célula, que é feita através da glicoproteína S. A ECA-2 liga-se simultaneamente nos dois trimeros da proteína S, clivando a subunidade S2 com proteases do hospedeiro; assim, ocorre a formação do peptídeo de fusão, o que, através de mudanças conformacionais, leva à fusão do vírus na membrana. Na figura 5 é possível observar a ligação entre o vírus e seu receptor. (LAN et al, 2020; YANG et al., 2020)

Figura 5: Ligação SARS-CoV-2 à ECA-2.



FONTE: Yang et al., 2020

A fusão permite que o vírus entre na célula devido à ativação de uma cascata de eventos. Após a entrada na célula hospedeira, a replicase do RNA viral entra em ação, formando mRNAs. Eles resultam na rápida replicação do RNA viral e das outras proteínas estruturais. (LAN et al, 2020; MUKHERJEE; CHOUDHURY, 2020).

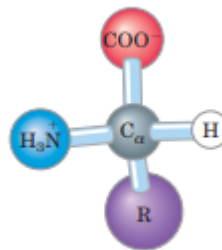
O RBD forma um bolsão amplo que consegue acomodar a região de reconhecimento da ECA-2 humana. A proteína S do SARS-CoV-2 também utiliza outras moléculas na superfície da célula para facilitar a ligação de alta afinidade com a ECA-2. A ligação entre o vírus e a ECA-2 se dá através de interações eletrostáticas e forças de Van der Waals. (ZHOU et al., 2020; AMIN; SOROUR; KASRY, 2020; HAO et al., 2021)

1.6 Síntese peptídica:

Proteínas fazem o controle de quase todos os processos na célula e elas possuem uma gama enorme de funções, como compor as estruturas das células até fazer a aceleração de reações. Elas são formadas pelos aminoácidos, através de uma ligação covalente – a ligação peptídica – entre cada resíduo de aminoácido. São 20 aminoácidos comuns. (NELSON; COX, 2019)

Os aminoácidos são compostos de um carbono central ao qual está ligado um hidrogênio, um grupo carboxila, grupo amino e uma cadeia lateral (R), responsável por diferenciar cada aminoácido (NELSON; COX, 2019). Segue imagem (figura 6) ilustrando a estrutura de um aminoácido.

Figura 6: Estrutura geral dos aminoácidos.



FONTE: NELSON; COX, 2019.

A junção de dois ou mais aminoácidos dá um peptídeo ou uma proteína – quando são muitos aminoácidos agrupados. A extremidade do peptídeo em que o resíduo de aminoácido com o grupamento amino livre é chamado de N-terminal e a

extremidade com o grupamento carboxila livre é a C-terminal. (NELSON; COX, 2019)

O que diferencia as proteínas em suas diferentes funções é a sua estrutura, na qual a sequência dos aminoácidos possui uma grande importância. A sequência dos aminoácidos é determinada pelo código genético de todos os seres, desde os vírus até o ser humano. (NELSON; COX, 2019)

O código genético é transcrito em mRNA, que por sua vez é traduzido para a formação das proteínas. É durante o processo de tradução que a interação (pareamento) entre os códons e anticódons resulta na sequência que a proteína irá possuir. Os ribossomos são os responsáveis pelo pareamento, sendo chamados de mini fábricas. (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

A síntese química de peptídeos já é antiga, já que por volta de 1900 Emil Fischer produziu pequenos peptídeos compostos por glicina. Esta técnica foi melhorada por Merrifield em 1963 com a síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS). Trazendo como vantagens: a reação é feita em um único recipiente; o excesso de reagentes e aminoácidos usados para que a reação seja completa pode ser facilmente removido através de filtração, o que elimina a necessidade de purificações entre cada etapa e o processo pode ser automatizado, pois são etapas repetitivas e como desvantagem: a impossibilidade de se remover produtos intermediários durante a reação. (TRIER; HANSEN; HOUEN, 2019; NIELSEN; MARCATILI, 2015)

Na síntese de peptídeos em fase sólida, o crescimento do peptídeo é da porção C-terminal para N-terminal e uma resina é utilizada como suporte sólido, sendo nela feito o acoplamento do primeiro aminoácido. Quando a síntese termina, o peptídeo é clivado da resina com o uso de um ácido. Antes desta técnica, havia a necessidade da realização de uma etapa de purificação após cada etapa da síntese. (TRIER; HANSEN; HOUEN, 2019; NIELSEN; MARCATILI, 2015)

Há duas estratégias que podem ser utilizadas na SPFS, a Fmoc e Boc. Na Fmoc, o grupamento N-terminal dos aminoácidos estão protegidos pelo grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil e a cadeia lateral pelo grupo terc-butilo; a desproteção é feita utilizando uma base e a clivagem, um ácido. Já na estratégia Boc, o grupamento N-terminal está protegido pelo grupo terc-butiloxicarbonil e a cadeia

lateral por grupos à base de benzilo; a desproteção e a clivagem são feitas utilizando um ácido. (TRIER; HANSEN; HOUEN, 2019; NIELSEN; MARCATILI, 2015)

A estratégia Fmoc é a mais utilizada quando se trata da síntese de peptídeos em fase sólida devido ao reagente empregado na etapa de clivagem, o ácido trifluoroacético; enquanto na estratégia Boc, é utilizado o ácido fluorídrico anidro líquido, altamente tóxico e corrosivo. (SIGMAALDRICH, 2023)

Atualmente, há um interesse crescente na síntese de peptídeos devido a gama de aplicabilidade que eles possuem, como o uso de peptídeos anticorpos no diagnóstico de doenças, no desenvolvimento de vacinas e no tratamento de doenças – no caso da insulina sintética. (TRIER; HOUEN, 2017; Kent, 1988)

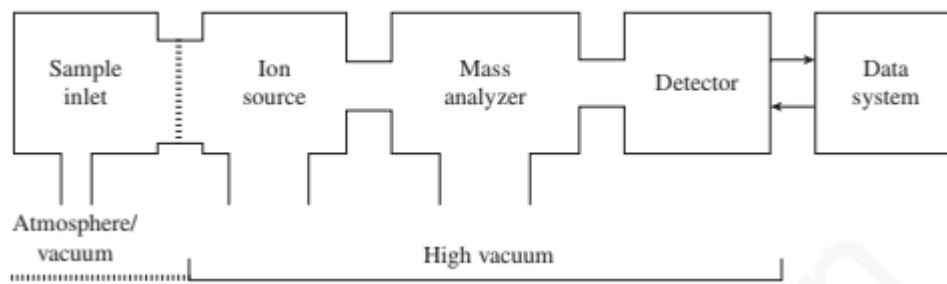
1.7 Análise e caracterização por espectrometria de massas e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC):

Utilizando a proporção de massa em relação à carga (m/z), a espectrometria de massa consegue identificar compostos numa amostra. Identificando um composto através de seu peso molecular e sua abundância isotópica. Um espectrômetro de massa faz a ionização da amostra em íons gasosos e, em seguida, faz a identificação dos íons através de suas proporções de massa em relação à carga e abundâncias relativas. (MERCK, 2023)

A espectrometria de massa oferece uma série de benefícios, como seletividade, sensibilidade e análise de várias amostras, sendo assim, um método de detecção bem estabelecido. (MERCK, 2023)

O espectrômetro de massas é composto de cinco componentes básicos: o injetor de amostra – faz a injeção da amostra no componente de baixa pressão; depois do injetor fica a fonte de ionização – transforma a amostra em um gás ionizado, que será acelerado por campo magnético; em seguida, o espectrômetro separa os íons com base na razão massa/carga. O detector faz a detecção dos íons e um computador, gera o gráfico – espectro de massas – onde os íons detectados são apresentados em função de sua razão massa/carga. Segue uma imagem (figura 6) esquemática de um espectrômetro de massas. (PAVIA et al., 2009)

Figura 7: Esquema de um espectrômetro de massas.



Fonte: PAVIA et al., 2009.

A técnica de HPLC consiste na separação dos componentes de uma amostra através de sua aplicação em colunas com um fluxo de solventes em alta pressão; podendo ser utilizada tanto para a análise da composição da amostra, como para sua purificação. Os aparelhos empregados nesta técnica são os cromatógrafos líquidos. As colunas constituem a fase estacionária, podendo ser apolares – também chamadas de fase reversa ou polares – também chamadas de fase normal. Os solventes constituem a fase móvel, sendo os responsáveis pela separação através de sua afinidade pela mesma. Eles precisam solubilizar somente a amostra e não a fase estacionária. Há dois tipos de eluição: isocrática – a composição da fase móvel é não se altera durante toda a corrida – e a gradiente – a composição da fase móvel varia durante a corrida. Juntamente com os cromatógrafos, um computador faz a emissão do cromatograma – gráfico que nos permite identificar e separar os componentes da amostra. (UFJF, 2022)

1.8 Sensores eletroquímicos:

Os sensores fazem a conversão de um sinal biológico ou químico em um sinal eletrônico, relacionado à concentração do analito. (LI et al., 2021) Para gerar um sinal analítico, utilizam uma reação específica, como variação de corrente, impedância ou potencial mensurável. (RICCARD et al., 2002; SOARES, 2011). São três as partes essenciais: o bioreceptor – molécula específica que se liga ao analito, o transdutor – sendo o sinal em si – e o sistema de processamento de sinal – responsável por gerar o gráfico de resposta. (ABID et al., 2021) O sinal pode ser mudanças de corrente ou voltagem, luz, pH e temperatura e é convertido em sinal eletrônico. (METKAR & GIRIGOSWAMI, 2019)

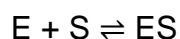
São vários os tipos de biossensores: os ópticos, que são baseados em fenômenos ópticos como espalhamento de luz e interferometria; os transdutores mecânicos, que detectam mudanças de propriedades mecânicas, força ou movimento. Além dos biossensores elétricos, que dependendo do tipo de análise utilizada, fazem a medição de mudanças de voltagem, potência e corrente elétrica. O reconhecimento da interação entre o biomarcador e o analito é vista na mudança de carga que ocorre com a ligação do marcador e do analito e na formação de uma dupla camada elétrica. (SIN et al., 2014; LI et al., 2021)

Devido à facilidade na utilização dos biossensores, faz com que ele seja de um crescente interesse. Além do baixo custo e das respostas específicas e de alta sensibilidade. (GASPAROTTO et al., 2017)

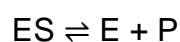
1.9 Atividade enzimática:

Determinar a velocidade da reação é a abordagem mais antiga e uma das mais importantes para entender o mecanismo das enzimas; além disso, verificar a cinética enzimática – modificação da enzima em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais. A concentração de substrato [S] é um fator-chave que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Porém, estudar os efeitos da concentração do substrato é difícil, pois o substrato é convertido em produto durante a reação. (NELSON; COX, 2019).

Em primeiro lugar, a enzima combina-se reversivelmente com o substrato, o que forma um complexo enzima-substrato (ES) em uma etapa reversível e relativamente rápida:



Em seguida, o complexo ES é rompido lentamente em uma segunda etapa, gerando a enzima livre e o produto P:



A segunda reação sendo mais lenta, limita a velocidade da reação total. Numa reação catalisada por enzima, num determinado momento, a enzima está presente de duas maneiras, na forma livre ou não combinada (E) na forma combinada (ES). A velocidade é proporcional à concentração de substrato, pois em baixa concentração, a maior parte da enzima está na forma livre e o equilíbrio é deslocado na direção da

formação de mais enzima combinada com o aumento da concentração. (NELSON; COX, 2019)

2. Objetivos

2.1 Geral:

Sintetizar peptídeos da região RBD do vírus SARS-CoV-2 e testar sua ligação com o receptor das células humanas, a ECA-2.

2.2 Específicos:

- Através de estudos de bioinformática, selecionar sequências peptídicas da região RBD do vírus SARS-CoV-2;
- Sintetizar e caracterizar as sequências escolhidas;
- Fazer o *binding* do peptídeo com a ECA-2;
- Analisar se o *binding* há interferência na atividade da ECA-2.

3. Material e métodos

3.1 Seleção da sequência peptídica:

Os estudos de bioinformática foram realizados, previamente, no projeto de mestrado do aluno Anderson Amendola Pinheiro do programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, fazendo o uso de *software* de predição de epítomos e de alinhamento. (PINHEIRO, 2022)

3.2 Síntese peptídica e clivagem:

Os dois peptídeos que pertenciam à região RBD e ligavam-se à ECA-2 foram selecionados utilizando os dados obtidos mencionados no item 3.1. A estratégia selecionada para fazer a síntese manual foi a síntese em fase sólida Fmoc/tBu (MERRIFIELD, 1963; HOUGHTEN, 1985) modificada.

A resina escolhida como suporte sólido foi a Rink Amida com grau de substituição de 04 – 06 mesh/g. A carga peptídica utilizada na reação foi de 0,09 e excesso de 3 vezes. O sentido da síntese foi o aminoácido C-terminal para o N-terminal. O primeiro passo da síntese foi montar o *manifold* e depois conectá-lo à bomba de vácuo. Em seguida, preparou-se o reator com dupla membrana de filtro no fundo acoplado à uma torneira para controlar a vazão de líquido. A resina foi pesada, transferida para o reator e lavada 3 vezes com dimetilformamida (DMF) por

1 minuto e 3 vezes com diclorometano (DCM) também por um minuto. Por fim, a resina foi deixada em DCM por 15 minutos para intumescimento dela.

Após as lavagens, fez-se a desproteção da resina – remoção do grupamento Fmoc com a solução de desproteção (20% de 4-metilpiperidina em DMF + 1% de Triton X-100) durante 20 minutos. Depois foi repetidamente a etapa de lavagem com DMF e DCM. Em seguida, foi feito o acoplamento dos aminoácidos. Primeiramente os aminoácidos e os agentes acoplantes sólidos 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) foram pesados; estes foram solubilizados em DMF e DCM, por último, foi adicionado o agente acoplante líquido diisopropilcarbodiimida (DIC). Verteu a solução de aminoácido no reator, que ficou protegido da luz a 40°C por duas horas, com ocasionais agitações.

Nos aminoácidos em que a reação foi deixada *overnight*, a solubilização foi apenas em DMF. Após este tempo, foram feitas lavagens, novamente, com DMF e DCM e um teste de ninidrina (Ninidrina 20% etanol absoluto). Para este teste foi retirada uma alíquota da resina e adicionada a solução de ninidrina, a qual foi incubada a 100 °C por 5 minutos. Após o último aminoácido foi feita a remoção do grupo Fmoc com a solução de desproteção, dissolvida a 20% em DMF, por 20 minutos e a secagem natural da resina e armazenamento na geladeira.

Para clivar os peptídeos da resina foi usado uma solução na proporção de 92,5% de TFA, 2,5% de água ultrapura (Milli-Q®), 2,5% de TIS e 2,5% de DODT. A resina ficou em contato com esta solução por 2 horas a 25°C, sob agitação. Em seguida, foi feita uma filtração para separar o peptídeo solúvel da resina sólida e depois com éter dietílico frio (conservado de 2° a 8°), fez-se a precipitação deste peptídeo, seguida de cinco lavagens. Deixou-se o éter evaporar na capela de exaustão e quando o precipitado de peptídeo estava bem seco, foi dissolvido em 0,5 mL volume de água (Milli-Q®), liofilizado, armazenado a - 20 °C.

Todos os reagentes e solventes utilizados nas etapas de síntese e clivagem dos peptídeos foram obtidos da Merck/Sigma-Aldrich.

3.3 Análise e caracterização peptídica:

3.3.1 Análise e caracterização peptídica por espectrometria de massas:

A análise foi feita pelo Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. As amostras liofilizadas foram solubilizadas em solução de água ultrapura (Milli-Q®), sendo aplicados 5 µL de cada amostra com auxílio do injetor automático (SIL- 20AXR, Shimadzu), com fluxo de 0,2 mL/min. As análises por espectrometria de massas foram realizadas com a utilização de um sistema Electrospray - Ion trap (ESI/IT), modelo Amazon SL (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), acoplado a um sistema Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) (Nexera-Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Para o controle de aquisição dos dados, foram utilizados os softwares HyStar e Trap Control (ambos BRUKER Daltonics), e LC Solution (SHIMADZU). O espectrômetro de massas foi operado no modo íon positivo, com scan em um intervalo de 50 a 2200 m/z. O padrão de ionização dos peptídeos foi feito no software CEM Peptide Calculator (<https://cem.com/en/peptide-calculator>).

Todos os reagentes e solventes utilizados na etapa de análise dos peptídeos foram obtidos da Merck/Sigma-Aldrich.

3.3.2 Análise e caracterização peptídica por HPLC:

As amostras liofilizadas foram solubilizadas em solução de água ultrapura (Milli-Q®), sendo aplicados 20 µL de cada amostra com uma seringa. As análises foram feitas em um cromatógrafo líquido da PerkinElmer, com *software* Chromera Flexar; a coluna utilizada foi uma C18 (Sulpeco®, Wilde pore C18 5µM, 25 cmx 4,6 mm). A corrida teve duração de 30 minutos com eluição no modo gradiente – início: 5% de B e fim: 95% de A – com alteração linear da concentração. Como fase móvel, foram utilizados água ultrapura (Milli-Q®) + 0,04% de ácido trifluoroacético (Solvente A) e acetonitrila + 0,03% de ácido trifluoroacético (Solvente B). O comprimento de onda usado foi de 220 nm.

Todos os reagentes e solventes utilizados na etapa de análise dos peptídeos foram obtidos da Merck/Sigma-Aldrich. Para as análises de HPLC, os solventes possuíam grau HPLC.

3.4 Estudo de *binding* através da análise por voltametria de pulso diferencial:

Primeiramente, limpou-se a superfície do sensor eletroquímico 220AT Metrohm DropSens (Metrohm AG, Ionestrasse, Suíça) com acetona, utilizando um *swab*. Em seguida, ele foi colocado numa placa de Petri, imerso em 2-propanol (Sigma-Aldrich) e submetido ao banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner – Unique) por 15 minutos. O excesso de 2-propanol foi retirado pela lavagem com água ultrapura e o processo foi repetido com água ultrapura (Milli-Q®). Após foi feito a secagem do sensor com gás nitrogênio e ele foi armazenado no vácuo.

Depois fez-se a funcionalização do sensor com glutaraldeído 2,5% e cistamina 20 mM; foi colocado 10 µL das soluções e incubado por 15 minutos a 37°C, seguido de uma lavagem com água ultrapura (Milli-Q®) e secagem com gás nitrogênio.

Em seguida, aplicou 10 µL da solução de rECA-2 20 ng/µL e incubou por 30 minutos a 37°C, seguido da lavagem e secagem do sensor (descrito anteriormente). Após, colocou 10 µL da solução dos peptídeos – 1 µg, 10 µg e 50 µg – e incubou por 30 minutos a 37°C; depois o sensor foi lavado com água ultrapura (Milli-Q®) e mergulhado na solução de revelação $K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$ (1mM $K_3Fe(CN)_6$ e 1mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) em PBS 0,01M, pH 7,4). Por último foi feita a leitura da corrente através do software PSTrace 5.9 da PalmSens. Utilizando os mesmos sensores, três leituras consecutivas foram feitas, sendo a primeira descartada.

3.5 Teste de viabilidade da ECA-2:

Em uma placa preta de 96 poços, foi colocado, em duplicada, 160 µM do substrato fluorescente Mca-APK(Dnp) e 0,4 µg/mL de ECA-2 humana recombinante, ambos foram diluídas em tampão de reação – Tris 75 mM pH 7,5 e NaCl 0,3M. Foi feita uma incubação em temperatura ambiente e protegida do escuro e após 1, 2 e 4 horas de incubação foi realizada a leitura de fluorescência com excitação de 320 nm e emissão de 405 nm.

A enzima recombinante foi obtida Merck/Sigma-Aldrich e o substrato fluorescente da ECA-2 foi adquirido da Enzo Life Sciences, o aparelho utilizado para fazer a leitura de fluorescência foi Synergy H1 da BioTek.

3.6 Teste de atividade enzimática:

Em uma placa preta de 96 poços, foi colocado, em duplicata, uma diluição seriada de base 2 de 160-0,6 μM do substrato fluorescente Mca-APK(Dnp); 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de ECA-2 humana recombinante; uma diluição seriada do peptídeo sintetizado E7wt e E7mut de 800-6 μM e 10 mM do inibidor de ECA-2 MLN-4760, todos foram diluídos em tampão de reação – Tris 75 mM pH 7,5 e NaCl 0,3M. Foi feita uma incubação em temperatura ambiente e protegida do escuro e a leitura da fluorescência, em intervalos de 20 minutos, por 8 horas. Foram usados os comprimentos de onda de excitação de 320 nm e de emissão de 405 nm. A metodologia foi baseada no trabalho de LU, J.; SUN, 2020.

A enzima recombinante e o inibidor foram obtidos Merck/Sigma-Aldrich e o substrato fluorescente da ECA-2 foi adquirido da Enzo Life Sciences, o aparelho utilizado para fazer a leitura de fluorescência foi Synergy H1 da BioTek.

4. Resultados e discussão

4.1 Seleção da sequência peptídica:

A escolha da sequência a ser sintetizada se deu a partir dos resultados de dinâmica molecular e análise de predição de peptídeos com *software*, como o BepiPred 2.0, realizadas no mestrado do Anderson Amendola Pinheiro, sendo escolhidas as sequências por ele determinadas, um peptídeo que fizesse parte do RBD e fizesse interação direta com a ECA-2 – o peptídeo E7. Foi escolhida uma sequência, que durante a realização do trabalho sofreu uma mutação pertencente a mutação L452R, contida dentro do peptídeo selecionado do vírus original. Então foi realizada a síntese de ambas as sequências para verificar se havia diferença no *binding* das mesmas com a ECA-2. (PINHEIRO, 2022; BITTAR et al., 2021) O quadro 2 contém as sequências escolhidas e algumas de suas características e na figura 8, temos a posição que do peptídeo E7 na proteína S e sua posição na estrutura quaternária.

Quadro 2: Sequências sintetizadas.

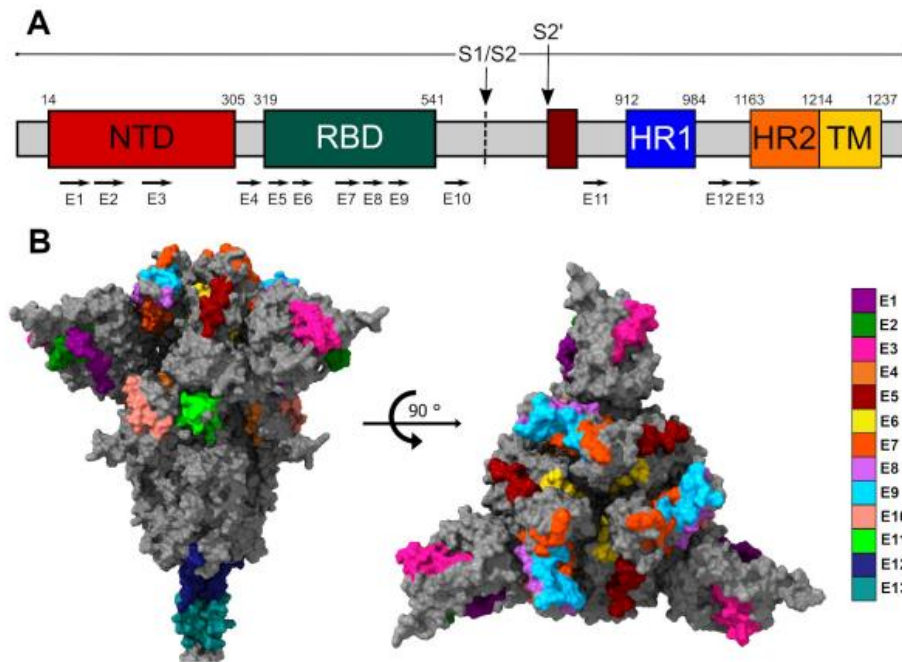
	E7wt	E7mut
Sequência	VGGNYNYLYRLFRKSNLKPFER	VGGNYNYRYRLFRKSNLKPFER
Massa molar	2734.12 g/mol	2777.15 g/mol

Solubilidade	Boa solubilidade em água	Boa solubilidade em água
---------------------	--------------------------	--------------------------

FONTE: autora.

*Dados em fase de publicação.

Figura 8: Posição do peptídeo E7. a) Na proteína S. b) Na estrutura quaternária da proteína S.



FONTE: PINHEIRO, 2022

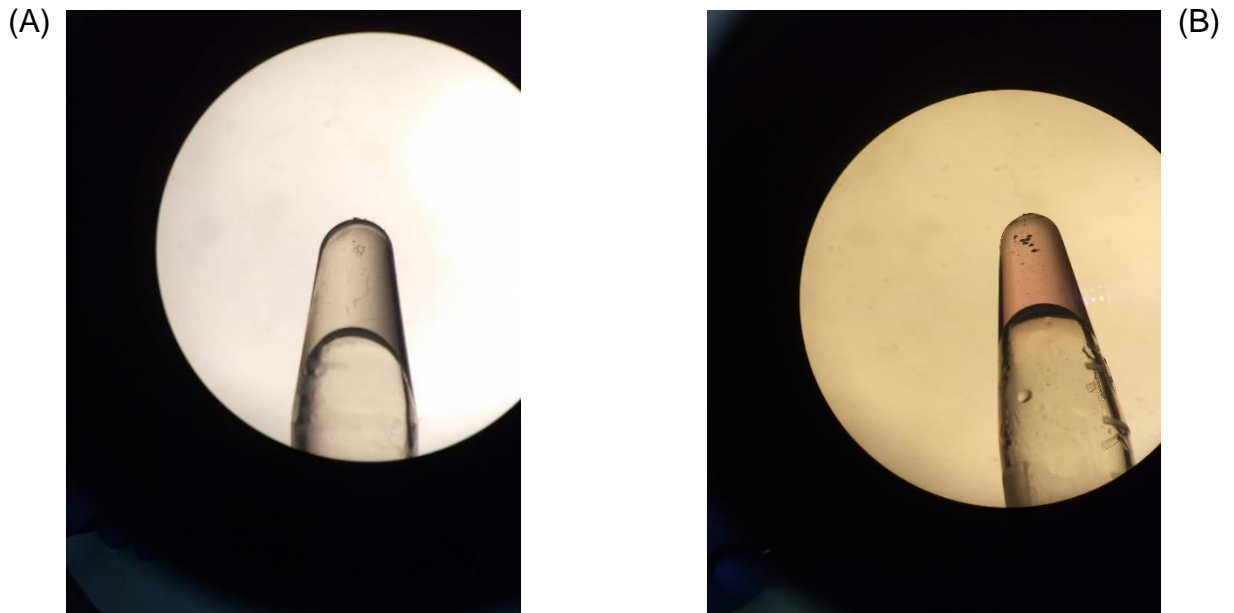
4.2 Síntese peptídica:

As estratégias de DNA recombinante e a síntese de peptídeos em fase sólida fez com que uma grande quantidade de peptídeos e proteínas pudessem ser sintetizados. (AGUILAR, 2004) Por isso, a estratégia escolhida neste trabalho foi a síntese de fase sólida, uma vez que ela é indicada para pequenas sequências e por ser etapas repetitivas e permitir a remoção do excesso de reagentes em cada acoplamento. (TRIER; HANSEN; HOUEN, 2019; NIELSEN; MARCATILI, 2015)

Como mencionado no item 3.2, após cada acoplamento é feito o teste de ninidrina para verificar se o acoplamento foi bem-sucedido. Quando o acoplamento havia ocorrido, as partículas de resina ficavam incolores, indicando a presença do grupo Fmoc; enquanto o resultado negativo para acoplamento ou sucesso na etapa

de desproteção, apresenta partículas com coloração roxa, indicando a ausência do grupo Fmoc. Segue figura 9 demonstrando o resultado do teste de ninidrina.

Figura 9: Exemplos de resultados do teste de ninidrina. a) Sem nitrogênio livre.
b) Com nitrogênio livre.



FONTE: autora.

Também como mencionado no item 3.2, após adicionado o éter o peptídeo é precipitado. Segue imagens (figuras 10 e 11) da formação do precipitado, indicando que houve a formação de produto e a síntese foi bem-sucedida. Porém, até ser feita a análise do precipitado, não é possível saber se a sequência foi sintetizada corretamente.

Figura 10: Precipitado seco do peptídeo E7 wt.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 11: Precipitado seco do peptídeo E7 mut.



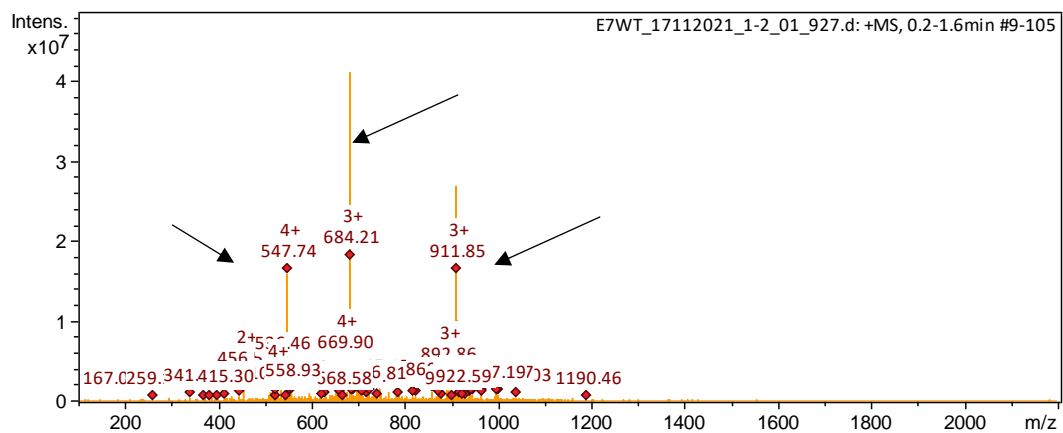
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Análise e caracterização peptídica:

4.3.1.1 Análise e caracterização por espectrometria de massas:

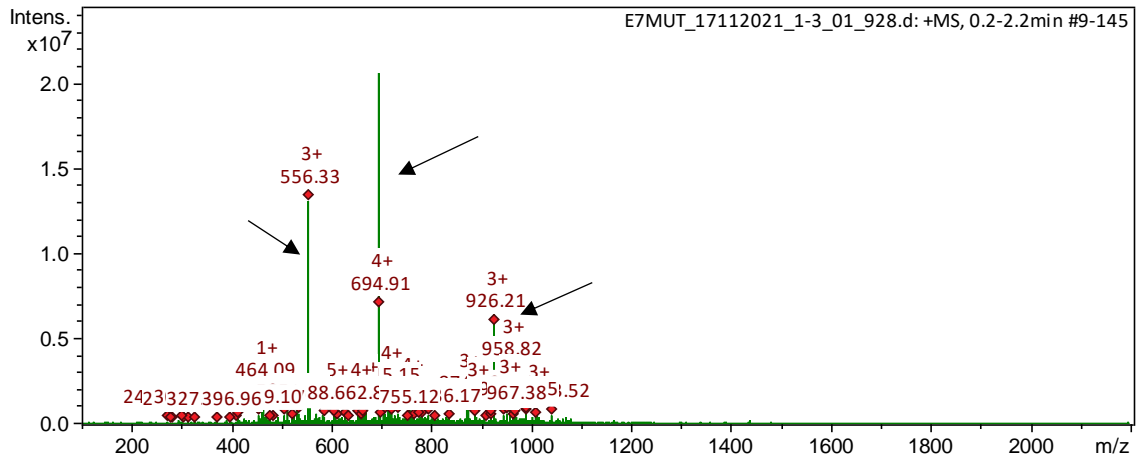
O padrão de ionização pode ser predito com a utilização de softwares e este padrão, o que indica se a sequência ficou correta. Segue as figuras 12 e 13 dos espectros de massas.

Figura 12: Espectro de massas do peptídeo E7wt.



FONTE: autora.

Figura 13: Espectro de massas do peptídeo E7mut.



FONTE: autora.

Os picos detectados (apontados pelas setas) estão de acordo com os picos apontados pelo *software* de padrão da ionização dos peptídeos, CEM Peptide Calculator (<https://cem.com/en/peptide-calculator>), o que confirma que a sequência foi sintetizada de forma correta. Devido ao aparelho utilizado possuir um *range* máximo de 2200 m/z, não se era esperado identificar os picos correspondentes aos íons inteiros, de valor maior que *range*, como especificado no quadro 3.

Quadro 3: Ionização teórica dos peptídeos E7 wt e E7 mut.

Íon	E7 wt		E7 mut	
	Massa	Detectado	Massa	Detectado
$[M + H]^+$	2733.47	Não	2776.49	Não
$[M + Na]^+$	2755.46	---	2798.47	---
$[M + K]^+$	2771.43	---	2814.45	---
$[M + 2H]^{2+}$	1367.24	Não	1388.75	Não
$[M + 3H]^{3+}$	911.83	Sim	926.17	Sim
$[M + 4H]^{4+}$	684.12	Sim	694.88	Sim
$[M + 5H]^{5+}$	547.50	Sim	556.10	Sim
$[M + 6H]^{6+}$	456.42	Não	463.59	Não

Fonte: Elaborado pela autora.

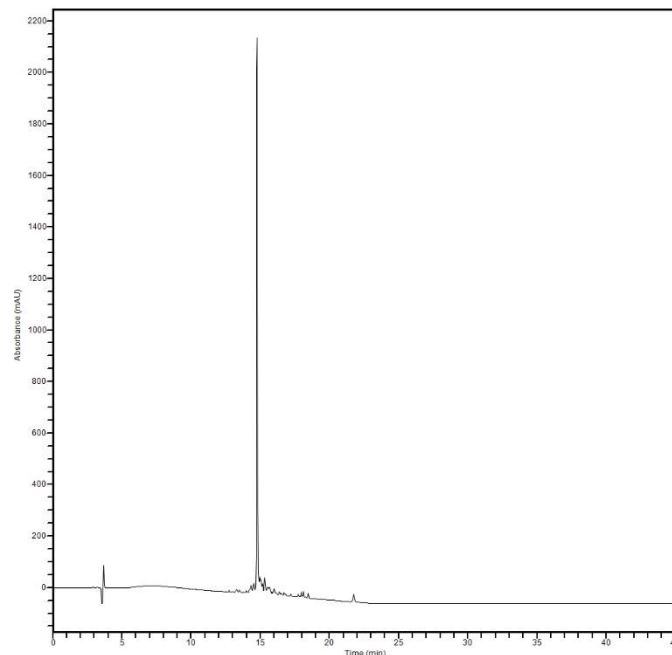
Porém, como pode ser observado nas imagens 10 e 11, os picos – destacados pelas setas – correspondentes aos íons $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ e $[M+5H]^{5+}$ dos peptídeos E7 wt e E7 mut foram detectados.

A utilização de ferramentas de bioinformática para obtenção dos valores teóricos dos picos de ionização é possível para peptídeos lineares, como o E7wt e o E7mut; também se é possível obtê-los manualmente. (PAIZS; SUHAI, 2004; WYSOCKI et al., 2005)

4.3.1.2 Análise e caracterização por HPLC:

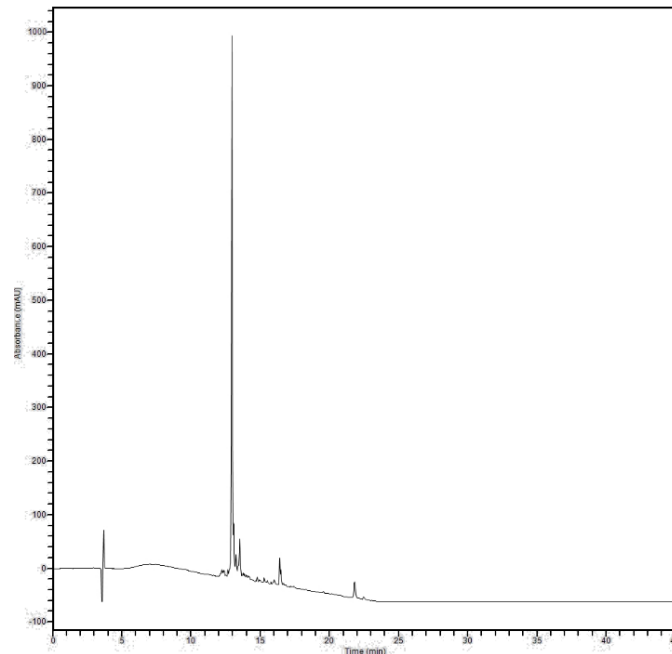
Uma das técnicas mais importantes para a análise e purificação para uma variedade de moléculas é a cromatografia líquida de alta eficiência, em particular para peptídeos e proteínas. A estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida fez com que peptídeos pudessem ser sintetizados em grande quantidade e a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa é o modo mais comum de fazer a caracterização e purificação dos peptídeos. Segue os cromatogramas (figuras 14 e 15) dos peptídeos. (AGUILAR, 2004)

Figura 14: Cromatograma do peptídeo E7wt.



FONTE: autora.

Figura 15: Cromatograma do peptídeo E7mut.



FONTE: autora.

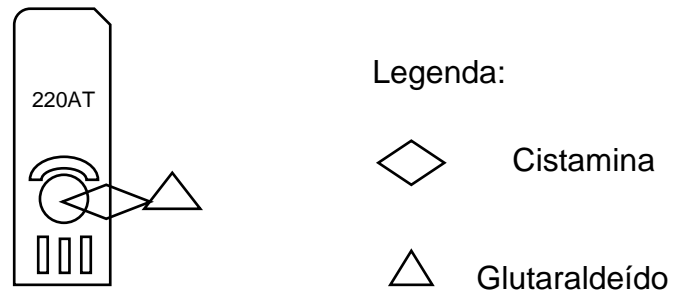
Apesar de não ter um padrão para comparação, por ser um produto de síntese e o uso do comprimento de onda em 220 nm – específico para a detecção da ligação peptídica – pode-se assumir que o pico majoritário é o peptídeo sintetizado. Além de ter-se o espectro de massas para confirmar. (AGUILAR, 2004)

O tempo de retenção para o peptídeo E7wt foi de 14,744 minutos e para o E7mut foi de 12,922 minutos; nota-se, ainda, que o tempo de retenção do E7mut é menor que do E7wt uma vez que ele é mais polar devido à troca do aminoácido leucina pelo aminoácido arginina. Logo, ele apresenta maior afinidade pela fase móvel, eluindo mais rapidamente. O E7wt foi obtido com mais de 90% de pureza e o E7mut com mais de 85%. Assim, a pureza dos peptídeos foi satisfatória, principalmente do E7wt, foi decidida não haver a necessidade de purificar os peptídeos para a realização do teste com o sensor eletroquímico; já que a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa pode causar a desnaturação dos peptídeos, perdendo a atividade biológica. (AGUILAR, 2004) Além de que a separação destes subprodutos pode ser extremamente difícil e desperdiçar o produto sintetizado. (CILLI, 2017)

4.4 Estudo de *binding* através da análise por voltametria de pulso diferencial:

Como mencionado anteriormente, o sensor faz a conversão de um sinal biológico ou químico em corrente elétrica. (LI et al., 2021) Sobre o sensor é construído camadas que fazem a reação. Segue esquema ilustrativo na figura 16.

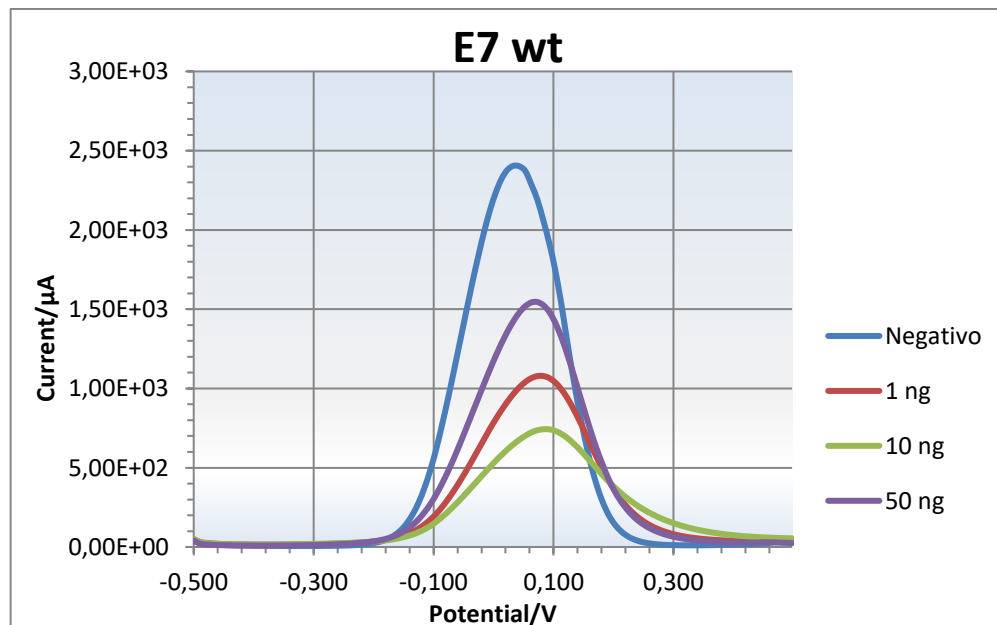
Figura 16: Esquema da reação no sensor.



FONTE: autora.

O analito se liga nas monocamadas, logo, mais camadas são formadas. A formação de mais camadas, reduz ou bloqueia a transdução do sinal. Portanto, quando ocorre reação, o sinal elétrico obtido é menor. Assim, pode-se ver na figura 17, que o peptídeo E7wt ligou-se efetivamente à ECA-2. (COSTA, 2019)

Figura 17: Teste de *binding* do peptídeo E7wt-ECA-2.



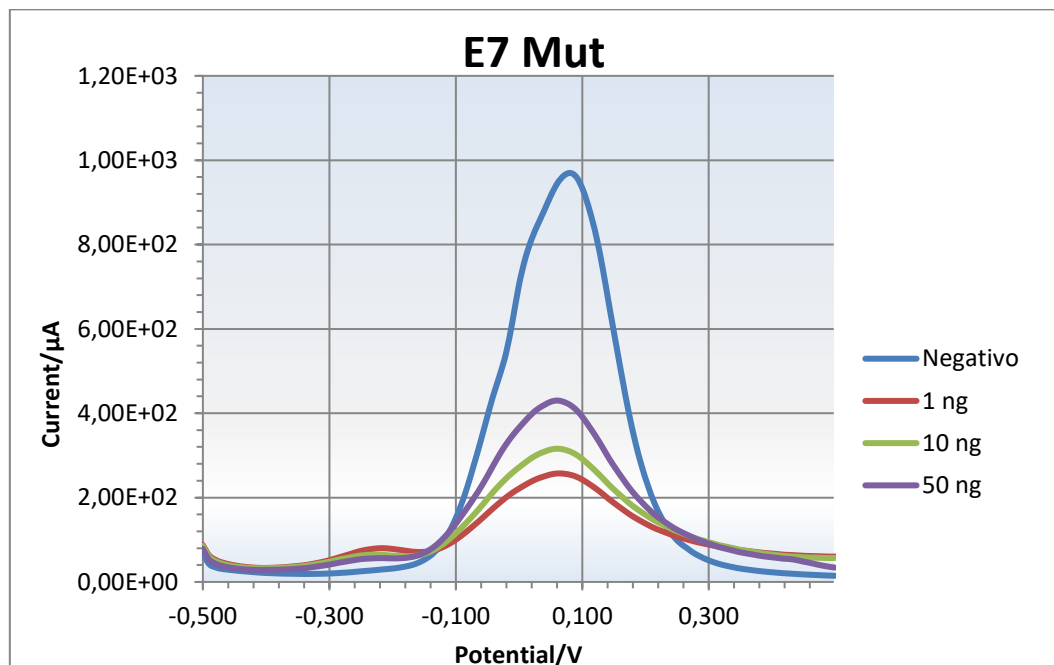
FONTE: autora.

Observar-se que em uma alta concentração do peptídeo (curva roxa), a ligação não é tão efetiva, visto que a curva ficou próxima do negativo – sem a

presença do peptídeo. Também é possível notar numa concentração baixa (curva vermelha), ainda sobrou enzima e, assim, a ligação não foi ótima. Assim, vê-se que a ligação mais efetiva – com a menor curva (curva verde) – é a de 10 ng do peptídeo. Portanto, alta concentração de peptídeo E7wt há dificuldade de ligação do mesmo na enzima, provavelmente por impedimento estérico, também nota-se que baixa concentração de peptídeo E7wt, a ligação também não é a melhor, o que deve ser pela sobra de enzima. Logo, uma concentração intermediária do peptídeo E7wt é que mais se liga à enzima.

Para o peptídeo E7mut (figura 18) é possível notar que na menor concentração de peptídeo (curva vermelha) ocorre melhor ligação com a enzima. Isto, provavelmente, ocorre devido a mudança do aminoácido leucina (oitavo aminoácido da sequência) pela arginina, o que deve melhorar sua afinidade para o sítio de ligação da enzima; o que pode ser esperado para uma variante, uma vez que as mutações, quando bem-sucedidas, aumentam sua transmissibilidade ou evasão do sistema imune. (HARVEY et al., 2021)

Figura 18: Teste de *binding* do peptídeo E7mut-ECA-2.

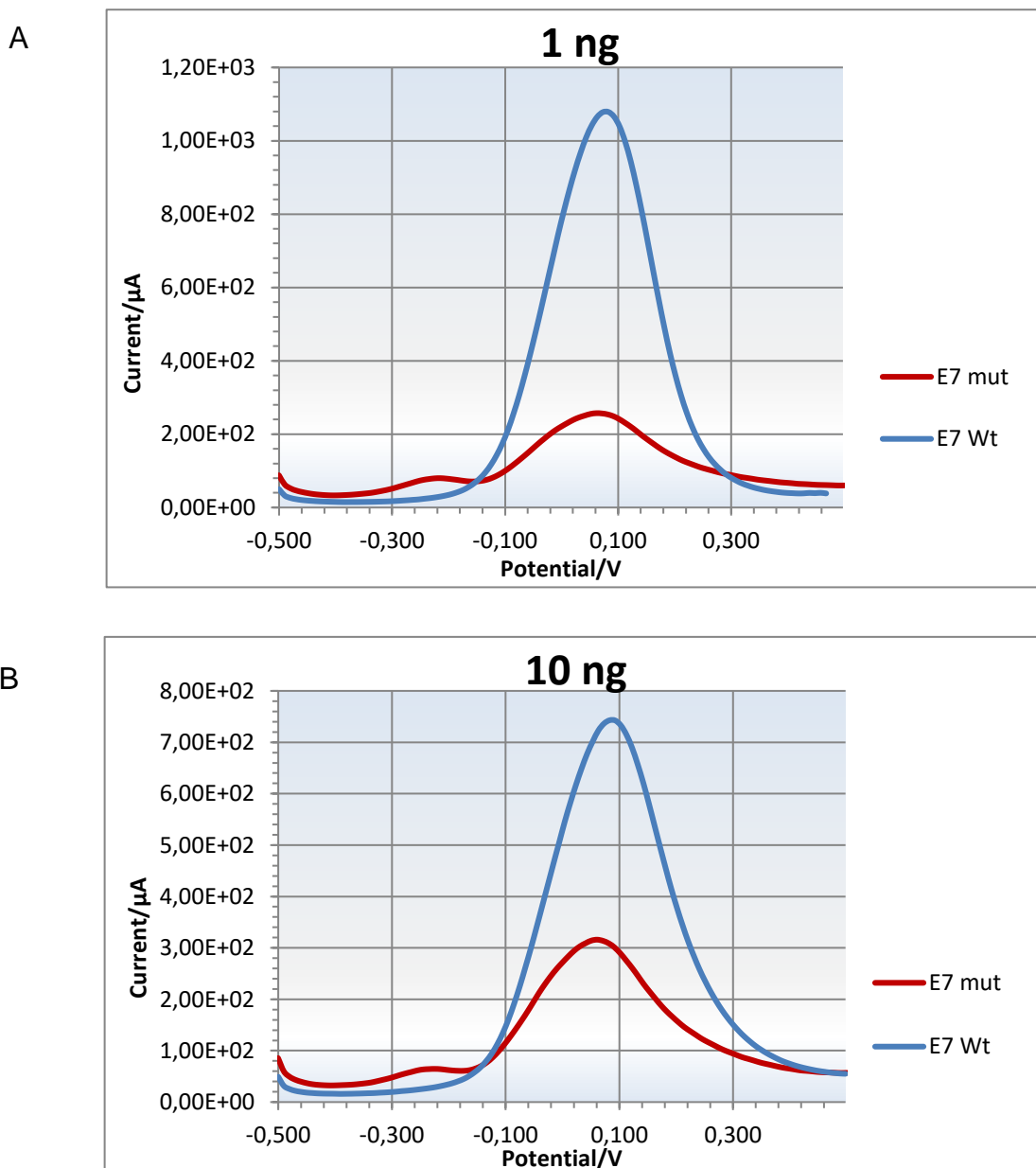


FONTE: autora.

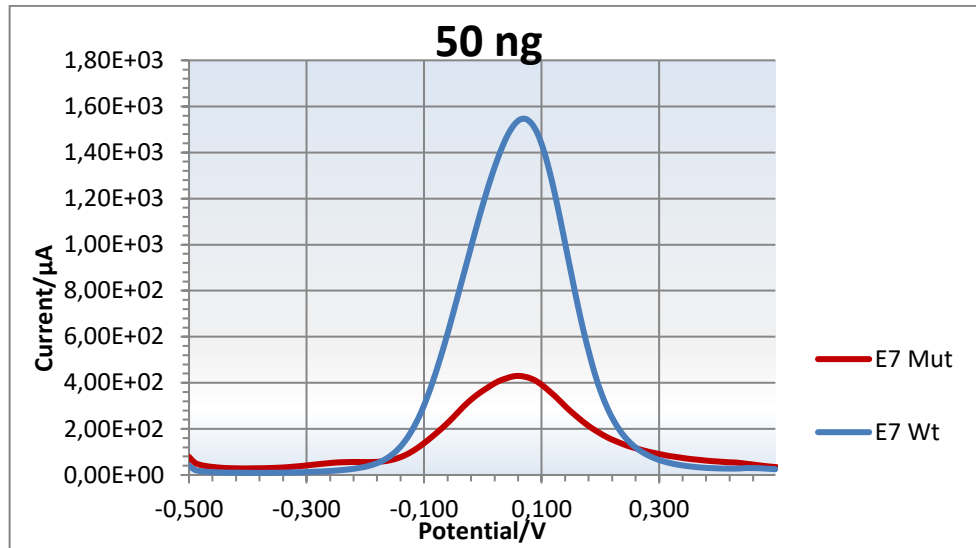
4.4.1 Comparação entre o *binding* dos peptídeos:

Como mencionado no item 4.4, o peptídeo E7mut apresentou a melhor ligação à ECA-2 numa concentração mais baixa do que o peptídeo E7wt. Logo, esperava-se que ele se ligasse mais eficientemente à ECA-2, por pertencer a uma variante, já que algumas mutações conseguem aumentar a capacidade de transmissão da variante em relação ao seu original, que de fato ocorreu (figura 19). (HARVEY et al., 2021)

Figura 19: Comparação do *binding* entre os peptídeos E7wt e E7mut. a) Na concentração de 1 ng. b) Na concentração de 10 ng. c) Na concentração de 50 ng.



C

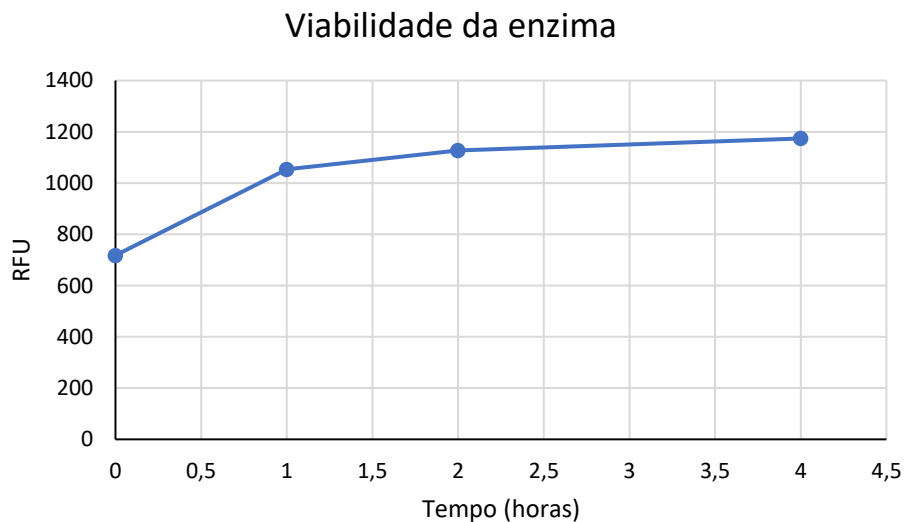


FONTE: autora.

4.5 Teste de viabilidade da ECA-2:

A enzima foi obtida comercialmente, portanto, primeiro foi feito um teste para verificar sua viabilidade. Então, fez-se um pré-teste, cujo resultado segue na figura 20.

Figura 20: Resultado do teste de viabilidade da enzima.



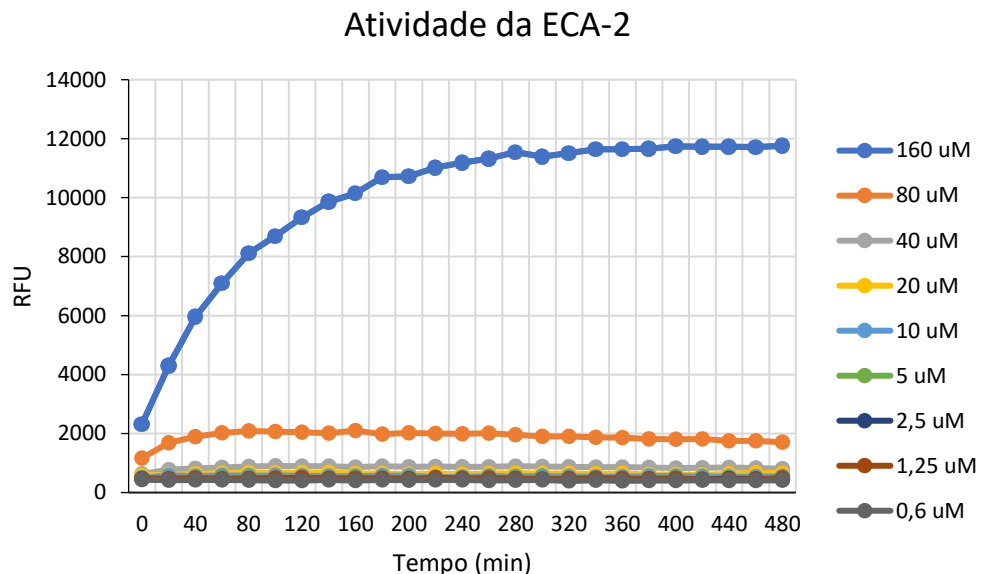
FONTE: autora.

Uma vez que era medida a formação de produto, esperava-se um aumento na fluorescência, já que à medida que o substrato era utilizado liberava fluorescência.

Logo os valores crescentes no eixo y demonstram que a enzima estava viável. (LU; SUN, 2020; XIAO; BURNS, 2017)

4.6 Teste de atividade enzimática:

Figura 21: Gráfico da atividade da ECA-2.



FONTE: autora.

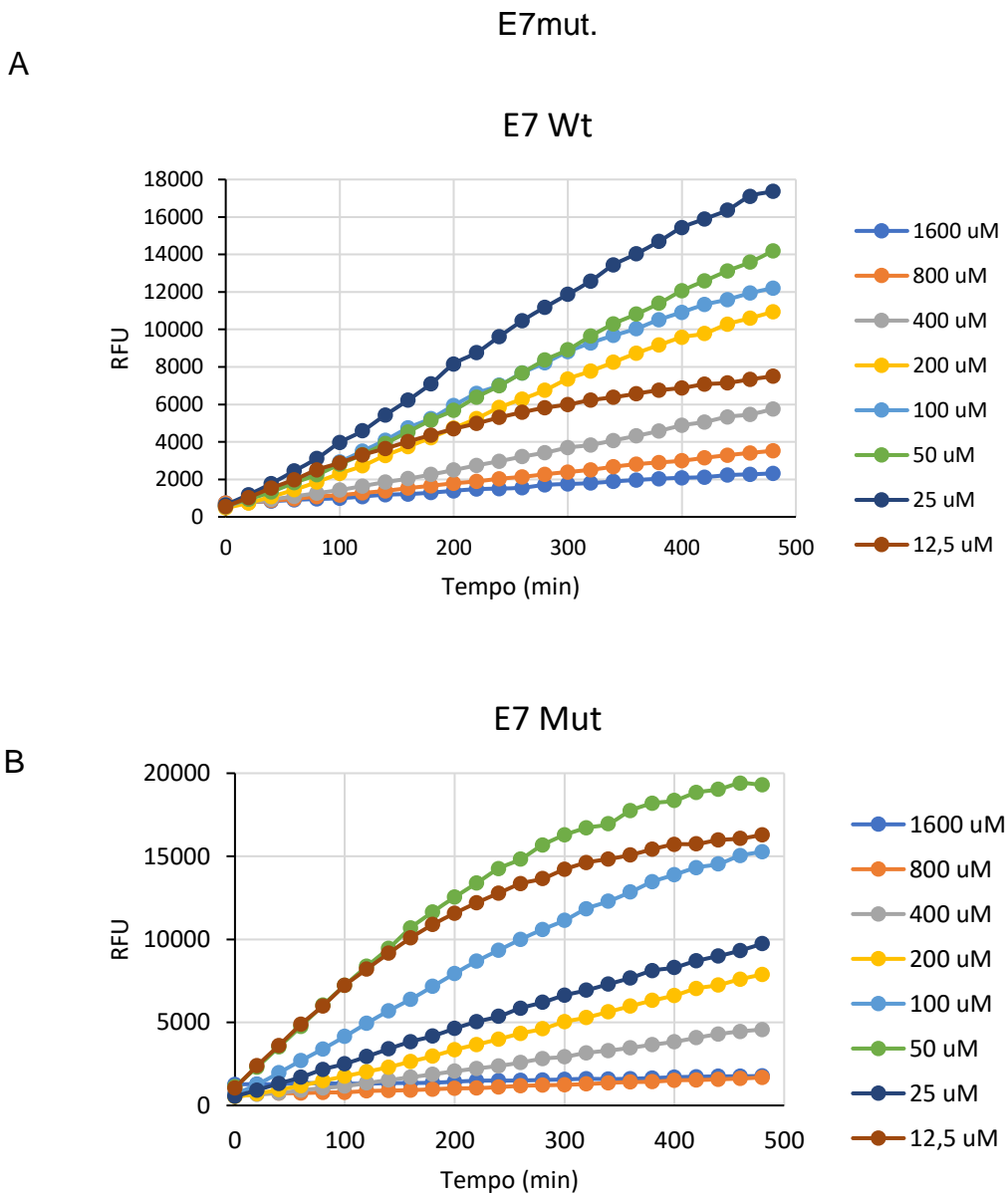
Como é possível observar na figura 21, a enzima obtida de maneira comercial, estava de fato viável; uma vez que houve um aumento na fluorescência captada, confirmando o resultado do item 4.5. Várias concentrações de substrato foram utilizadas, sendo a de maior concentração (160 µM) com a melhor atividade. Como a reação é muito rápida, pequenas concentrações de substrato nem chegam a formar o platô, característico de uma curva de cinética enzimática. (LU; SUN, 2020; XIAO; BURNS, 2017)

4.7 Teste da atividade enzimática com os peptídeos E7wt e E7mut:

Na figura 22, observa-se que o aumento da atividade enzimática não é diretamente proporcional à concentração do peptídeo, visto que para ambos os peptídeos a maior concentração dos mesmos não é a de maior emissão de fluorescência. Para o peptídeo E7wt, a curva de 25 µM é a de maior fluorescência, ou seja, com mais produto formado e já para o peptídeo E7mut, é a curva de 50 µM. Logo, estas concentrações foram escolhidas para fazer a comparação. Com a figura

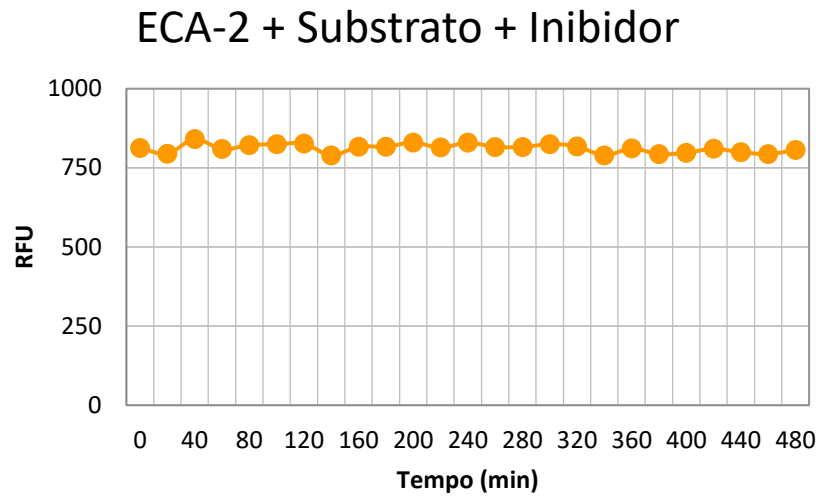
22, também se tem uma prévia de que o peptídeo E7mut aumenta mais a atividade da ECA-2 do que o peptídeo E7wt, uma vez sua curva chega próximo de 20 RFU e do peptídeo E7wt fica pouco abaixo do 18000 RFU. Também foi utilizado um inibidor específico da ECA-2, o MLN-4760 e vê-se, pelo gráfico (figura 23) que a inibição é potente, pois a atividade não varia, além disso, a fluorescência não passa de 1000 RFU.

Figura 22: Gráfico da atividade enzimática na presença dos peptídeos. a) E7wt. b)



FONTE: autora.

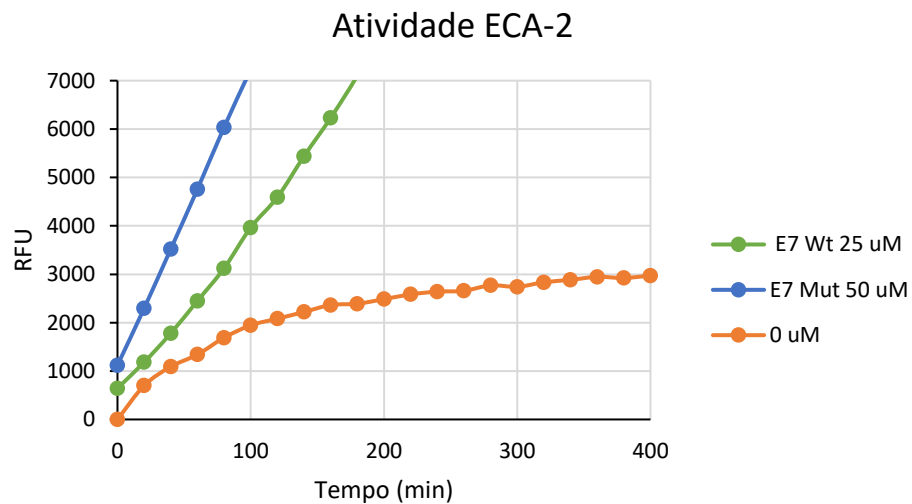
Figura 23: Gráfico da atividade da ECA-2 na presença do inibidor.



FONTE: autora.

4.8 Comparação entre os peptídeos na alteração da atividade da ECA-2:

Figura 24: Gráfico da comparação da atividade enzimática com a presença dos peptídeos E7wt e W7mut em sua melhor concentração.



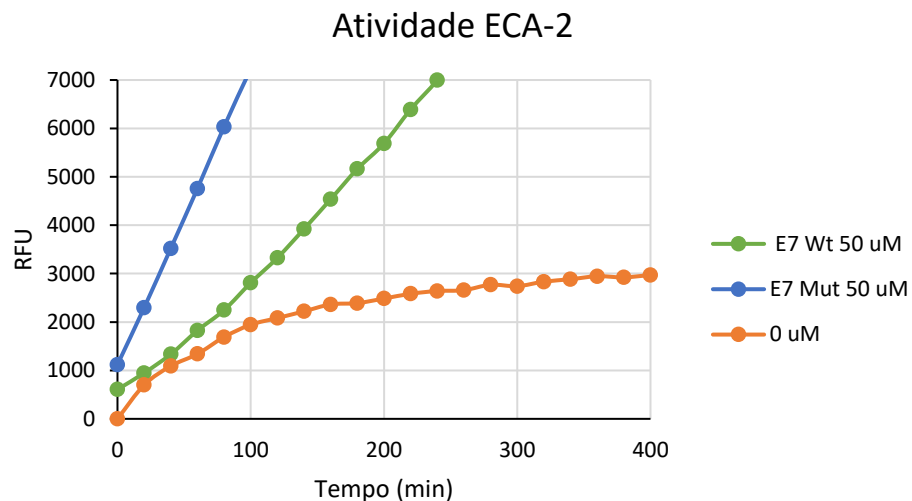
FONTE: autora.

Para montar o gráfico da figura 24 foram utilizadas as melhores curvas com cada peptídeo, cujos gráficos se encontram no item 4.7. Sabe-se que a ligação do RBD à ECA-2 aumenta a atividade dela; logo, era esperado que os peptídeos derivados do RBD também aumentassem. Esta hipótese foi confirmada na figura 24, onde é

possível ver que há um aumento da atividade da ECA-2 quando ambos os peptídeos são adicionados na reação. (LU; SUN, 2020) Uma vez que a ligação dos peptídeos com a enzima aumentou sua atividade, notou-se que o peptídeo E7mut aumentasse mais que o E7wt, provavelmente por apresentar mais afinidade pela enzima. Ou seja, formou mais produto e por isso teve uma maior leitura de fluorescência.

Mesmo quando o peptídeo E7wt estava na concentração que mais aumentou a atividade da ECA-2, ele aumentou menos que o peptídeo E7. Isto é possível ver na figura 25.

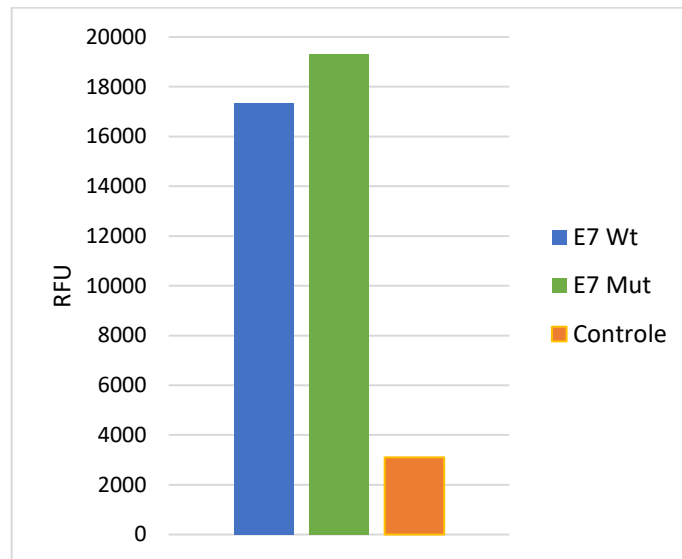
Figura 25: Gráfico da comparação da atividade enzimática com a presença dos peptídeos E7wt e W7mut na mesma concentração.



FONTE: autora.

Fazendo uma última comparação, na figura 26 é possível observar mais uma vez que o peptídeo E7mut aumentou a atividade da ECA-2 mais do que o peptídeo E7wt. Isto confirma o resultado obtido no item 4.8.

Figura 26: Gráfico de coluna montado com o ponto final da leitura da atividade da ECA-2.



FONTE: autora.

5. Conclusões

- Os peptídeos foram escolhidos com sucesso;
- Os peptídeos foram sintetizados e caracterizados com sucesso;
- Os peptídeos E7wt e E7mut se ligaram com sucesso à ECA-2;
- A concentração de 10 ng do peptídeo E7wt apresentou a melhor ligação com a ECA-2;
- A concentração de 1 ng do peptídeo E7mut apresentou a melhor ligação com ECA-2;
- O peptídeo E7mut apresentou maior afinidade pela ECA-2 do que o peptídeo E7wt;
- A ligação dos peptídeos com a ECA-2 aumentou a atividade enzimática;
- A concentração de 25 μ M do peptídeo E7wt apresentou o maior aumento da atividade da ECA-2;
- A concentração de 50 μ M do peptídeo E7mut apresentou o maior aumento da atividade da ECA-2;
- O peptídeo E7mut aumentou mais a atividade da ECA-2 do que o peptídeo E7wt.

6. Perspectivas futuras

Continuar os estudos com estes peptídeos e possíveis derivados deles para sua possível utilização em doenças relacionadas ao mau funcionamento da ECA-2.

7. Benefícios à sociedade

Tendo em vista a calamidade gerada por doenças causadas por patógenos virulentos, como a COVID-19, a necessidade de estudar a interação entre patógeno-hospedeiro é vital para a contenção da doença e novos tratamentos. Logo, a proposta deste trabalho foi um novo método para o estudo da ligação de vírus com o seu receptor no hospedeiro, um método simples e de fácil reprodução. Além disso, o uso de uma tecnologia simplificada pode ser uma vantagem adicional, uma vez que não seríamos tão dependentes de outros países. Pois, como visto durante o auge da pandemia, a falta de insumos foi um problema a mais. (HOMMA et al., 2022; VALÉCIO, 2023) Portanto, o desenvolvimento de uma tecnologia rápida, barata e específica é a aposta para o futuro. (COSTA, 2019)

REFERÊNCIAS

- ABID, S. A.; SUHAIL, A.; AL-KADMY, I. M. S.; et al. Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. **Life Sciences**, p. 119117, 2021.
- AGUILAR, M. I. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. **Methods in Molecular Biology**, vol. 251, p. 3–8, 2004.
- AKRAM, A.; MANNAN, N. Bangladesh Journal of Infectious Diseases Molecular Structure , Pathogenesis and Virology of SARS-CoV-2 : A Review. **J Infect Dis**, v. 7, p. 536–540, jul. 2003.
- AMIN, M.; SOROUR, M. K.; KASRY, A. Comparing the Binding Interactions in the Receptor Binding Domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, 2020.
- AMORIM FILHO, L. et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 54, p. 1–10, 2020.
- ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, p. 450–452, abril. 2020.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. (Ed.). **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- BITTAR, C. et al. The Emergence of the New P.4 Lineage of SARS-CoV-2 With Spike L452R Mutation in Brazil. **Frontiers in public health**, v. 9, p. 745310, 1 out. 2021.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Coronavírus Brasil**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em 31 mar. 2023a.

BRASIL, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Coronavírus**. Disponível em: <https://coronavirus.saude.mg.gov.br/blog/70-pcr-rt-para-coronavirus>. Acesso em 31 mar. 2023b.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos#:~:text=Medicamentos%20aprovados%20para%20tratamento%20da,emergencial%2C%20al%C3%A9m%20do%20registro%20sanit%C3%A1rio..> Acesso em 31 mar. 2023c.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Overview of COVID-19 Vaccines. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/overview-COVID-19-vaccines.html#mrna>. Acesso em 31 mar. 2023a.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>. Acesso em 31 mar. 2023b.

CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020.

CHENG, H.-Y. et al. Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods Before and After Symptom Onset. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 9, p. 1156–1163, 1 Sep. 2020.

CHENG, V. et al. Two Years after Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, abr. 2012.

CHUNG, J. Y.; THONE, M. N.; KWON, Y. J. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 1–25, mar. 2021.

CILLI, E. M.; et al. "Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo", p. 175 -196. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

COLOMBO, F. C. et al. COVID-19, Renin-Angiotensin System, Angiotensin-Converting Enzyme 2, and Nicotine: What is the Interrelation? **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 115, n. 4, p. 708–711, out. 2020.

COSTA, J. Portable Laboratory Platform With Electrochemical Biosensors for Immunodiagnostic of Hepatitis C Virus. **IEEE Sensors Journal**, v. 19, n. 22, p. 10701-10709, nov. 2019.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Rev Microbiol.** v. 17, p. 181-192, 2018.

CUNHA, B. Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 1, p. 141-155, mar. 2004.

FENG, W. et al. Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 15, p. 10196–10209, 2020.

- FIOCRUZ. Quais exames são usados para o diagnóstico da COVID-19?. 2020. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1785-quais-exames-sao-usados-para-o-diagnostico-da-covid-19>. Acesso em 31 mar. 2023.
- GASPAROTTO, G. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, n. 1, p. 1240-1247, jul. 2017.
- GLATTER, K.; FINKELMAN, P. History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. **The American Journal of Medicine**, v. 134, n. 2, p. 176-181, fev. 2021.
- GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v.5, n. 4, p. 1–9, 2 mar. 2020.
- GRAHAM et al. Impact of the B.1.1.7 variant on neutralizing monoclonal antibodies recognizing diverse epitopes on SARS-CoV-2 Spike, fev. 2021.
- GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n.7, p. 1017–1032, jul. 2020.
- HARAPAN, H. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 5, p. 667-673, maio. 2020.
- HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, jul. 2021.
- HAO, W. et al. Binding of the SARS-CoV-2 spike protein to glycans. **Science Bulletin**, 2021.
- HOMMA, A. et al. A Crise das Vacinas e de Insumos e a Produção Local para Enfrentar a Pandemia. **Diplomacia da Saúde - Fiocruz**, v. 11, p. 165–184, 2022.
- HOUGHTEN, R. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 82, n. 15, p. 5131-5135, ago. 1985.
- HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250-256, jun. 2020.
- HUANG, L et al. Novel Peptide Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme 2. **The Journal of Biological Chemistry**. n. 278, n. 18, 2003.
- JAMISON, D.A. et al. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. **Eur J Hum Genet**, 2022.
- KHANDAKER, G. et al. Systematic review of clinical and epidemiological features of the pandemic influenza A (H1N1) 2009. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 5, n. 3, p. 148-156, mar. 2011.
- KENT, S. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 957-989, 1988.

- KRISHNAN, A. et al. A narrative review of coronavirus disease 2019 (COVID-19): clinical, epidemiological characteristics, and systemic manifestations. **Internal and Emergency Medicine**, v. 16, n. 4, p. 815–830, Jun. 2021.
- LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, maio. 2020.
- LI, P. et al. From Diagnosis to Treatment: Recent Advances in Patient-Friendly Biosensors and Implantable Devices. **ACS Nano**, v. 15, n. 2, p. 1960-2004, fev. 2021.
- LU, J.; SUN, P. D. High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 52, p. 18579–18588, 25 dez. 2020.
- MERCK. Espectrometria de massa. Sigmaaldrich. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/mass-spectrometry>. Acesso em 27 mar. 2023.
- MERRIFIELD, R. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, jul. 1963.
- METKAR, S.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271-283, jan. 2019.
- MORENS, D. et al. Pandemic COVID-19 joins history’s pandemic legion. **mBio (American Society for Microbiology)**, v. 11, n. 3, p. 1-9, jun. 2020.
- MUKHERJEE, S.; CHOUDHURY, A. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. **J Med Virol**, 2020.
- NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 7a ed. Porto Alegre: Artmed. 2019.
- NIELSEN, M; MARCATILI, P. Prediction of Antibody Epitopes. Springer Science+Business Media. Gunnar Houen (ed.), Peptide Antibodies: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**. New York, v. 1348, 2015.
- PAIZS, B.; SUHAI, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 4, p. 508–548, jul. 2005.
- PASSARINHO, N. “É como soco no estômago”: anestesista teme cenas de guerra com falta de sedativos para pacientes intubados. **BBC News Brasil**, 25 mar. 2021. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-56457568>. Acesso em: 31 mar. 2023.
- PATEL, M. et al. Pandemic (H1N1) 2009 influenza. **British Journal of Anaesthesia**, v. 104, n. 2, p. 128-142, jan. 2010.
- PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 4 ed. EUA: editora Brooks/Cole CENGAGE Learning. 2009.
- PINHEIRO, A. A. **Determinação, síntese e aplicação de peptídeos imunogênicos da proteína estrutural S do vírus SARS-CoV-2**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2022.

PIRET, J., BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-16, jan. 2021.

POTTER, C. A history of influenza. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 572-579, jul. 2008.

RAMADAN, N.; SHAIB, H. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. **Germes**, v. 9, n.1, p. 35-42, mar. 2019.

RICCARDI, C. et al. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, maio. 2002.

SIGMAALDRICH. Sigma Aldrich Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/chemistry-and-synthesis/peptide-synthesis>. Acesso em 01 mar. 2023.

SIN, M. et al. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. **Expert Review of Molecular Diagnosis**, v. 14, n. 2, p. 225-244, mar. 2014.

SOARES, J. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Instituto de Física de São Carlos; Instituto de Química de São Carlos; Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, p. 127, 2011.

SOUZA, L. et al. SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: uma revisão narrativa dos principais coronavírus do século. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1., p. 1419-1439, jan. 2021.

SUN, P. et al. Clinical characteristics of 50 466 hospitalized patients with 2019-nCoV infection. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, 11 mar. 2020.

TRIER, N.; HANSEN, P.; HOUEN, G. Peptides, antibodies, peptide antibodies and more. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 1–22, 2019.

TRIER, N. H.; HOUEN, G. **Peptide Antibodies in Clinical Laboratory Diagnostics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 81, 2017.

UFJF (Universidade Federal de Juiz de Fora). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Disponível em: <https://www2.ufjf.br/quimica/files/2016/08/AULA-HPLC.pdf>. Acesso em 31 jan. 2023.

VALÉCIO, M. de. **Covid-19: faltam medicamentos para intubação**. Disponível em: <https://ictq.com.br/farmacia-hospitalar/1814-covid-19-faltam-medicamentos-para-intubacao>. Acesso em: 31 mar. 2023.

WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report 51. Geneva: World Health Organization. Disponível em: https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10. Acesso em 31 mar. 2023.

WRAPP, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 19 fev. 2020.

WYSOCKI, V. H.; RESING, K. A.; ZHANG, Q.; CHENG, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 211–222, mar. 2005.

XIAO, F.; BURNS, K. D. Measurement of angiotensin converting enzyme 2 activity in biological fluid (ACE2). **Methods in Molecular Biology**, v. 1527, p. 101–115, 2017.

YANG, J. et al. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4541, 11 set. 2020.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.; **Biologia Molecular Básica**. 5ª edição. Porto. Alegre: Artmed, 2014.

ZIETZ, B.; DUNKELBERG, H. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, n. 2, p. 165-178, out. 2004.

ZHOU, P. et al. Context contribution to the intermolecular recognition of human ACE2-derived peptides by SARS-CoV-2 spike protein: implications for improving the peptide affinity but not altering the peptide specificity by optimizing indirect readout. **Molecular Omics**, 2020.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

ZOST, S. J. et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 443–449, 15 jul. 2020.