

**UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

**Potencial antimicrobiano do peptídeo RP1
conjugado com ferroceno**

Natália Caroline Silva Costa

**Dissertação de mestrado
2018**

Natália Caroline Silva Costa

**“Potencial antimicrobiano do peptídeo RP1
conjugado com ferroceno”**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

**Araraquara/SP
2018**

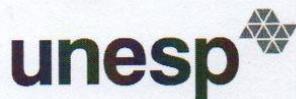
FICHA CATALOGRÁFICA

C837p Costa, Natália Caroline Silva
Potencial antimicrobiano do peptídeo RP1 conjugado
com ferroceno / Natália Caroline Silva Costa. –
Araraquara : [s.n.], 2018
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 2. Ferroceno.
3. Atividade antifúngica. 4. Produtos de ação
antimicrobiana. 5. Agentes anti-infecciosos. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Potencial antimicrobiano do peptídeo RP1 conjugado com ferroceno"

AUTORA: NATÁLIA CAROLINE SILVA COSTA

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

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

Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - AraraquaraProfª. Drª. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - AraraquaraProf. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE
Departamento Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã

Araraquara, 20 de julho de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, família, noivo e amigos

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por ter guiado o meu caminho neste dia, por não ter me desamparado em momentos de dificuldade e por me dar muitas vezes a confiança e a coragem que precisava para vencer este desafio.

A meus pais Sonia e Severino por me apoiarem na decisão do ingresso ao mestrado, após quase 2 anos de formada. Por me dar tanto carinho e amor, acreditar em mim e me mostrar que mesmo em dificuldades deveria lutar pelos meus sonhos, a vocês dedico todo o meu amor.

Aos meus irmãos Magda, Bruna e Vitor pelo companheirismo, por estarem sempre presentes e por sempre me mostrar o quanto nossa família é a base e que com ela podemos alcançar qualquer coisa.

Ao meu noivo Heberton por esses quase 9 anos juntos, por estar ao meu lado, por todo o amor, incentivo, por sempre me ouvir e também me aconselhar e por ser meu parceiro de vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli pela orientação, ensinamentos, por me acolher em uma fase turbulenta da minha vida, por acreditar em meu trabalho e sempre me incentivar.

Aos meus amigos de Matão, graduação e Pós Graduação por todo o carinho e parceria, em especial a Ana Claudia por ser minha companheira de vida, por me ouvir, incentivar e pela amizade em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos companheiros do Lasebio Júlia, Matheus Miranda, Mateus Ferreira, Norival, Paulo, Jaff, Carol, Thaína, Milena, Teresa, João Vitor pelo apoio, ensinamentos e companheirismo do dia-a-dia.

A Júlia por ter se tornado uma grande amiga e por todo o apoio, ensinamentos e pela ajuda durante todo o mestrado.

A Unesp e ao Instituto de Química, pela oportunidade, espaço e por todo o aprendizado, Capes pela bolsa e ao CIBFar pelo financiamento.

“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos (Clarice Lispector).”

Resumo

Doenças fúngicas e parasitárias representam grandes riscos para a saúde pública. A importância global das doenças fúngicas vem aumentando, dado o número crescente de pacientes vulneráveis para essas infecções, incluindo pacientes com AIDS, transplantados, imunocomprometidos, com câncer, recém-nascidos e idosos. As principais doenças são ocasionadas por *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis*, no entanto os tratamentos usados são pouco eficientes devido à resistência dos patógenos aos medicamentos e da alta toxicidade e efeitos colaterais dos fármacos utilizados. Além das doenças fúngicas, as parasitárias também são problemas de saúde pública, principalmente em países pobres e em desenvolvimento. Neste caso, os tratamentos também precisam ser melhorados. Diante dessa problemática há a necessidade de se buscar novas terapias, entre as alternativas estão os peptídeos antimicrobianos. O peptídeo RP1 da classe de quimiocinas apresenta atividade contra bactérias, vírus, alguns tipos de câncer e ação antiparasitária. Além disso, o composto organometálico ferroceno ($\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$) também mostrou atividade antiparasitária. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da conjugação do peptídeo RP1 com o ferroceno em termos de estrutura, atividade biológica e toxicidade. Os peptídeos foram sintetizados usando a técnica de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS). A estrutura foi avaliada por espectroscopia de CD. A atividade dos peptídeos foi avaliada por estudos de permeabilização em vesículas, ensaios antimicrobianos, além de avaliar a citotoxicidade dessas moléculas. Os ensaios de CD em PBS mostraram que os peptídeos apresentavam um espectro típico para estruturas desordenadas. Na presença de micelas, ambos os peptídeos apresentaram alta incidência de estrutura α -helicoidal. Ensaios de CD também foram realizados com vesículas unilamelares de POPC e POPC:POPS, em ambos os casos os peptídeos não apresentaram estrutura secundária definida. Os dados da permeabilização demonstraram a baixa ação do peptídeo RP1 sobre a membrana, pois este apresentou baixa porcentagem de liberação de CF, enquanto o Fc-RP1 apresentou alto valor de liberação de CF, mostrando que o ferroceno aumenta a capacidade de permeabilização do peptídeo. Os ensaios antileishmania, demonstraram que o peptídeo RP1 não apresentou atividade como descrito na literatura. O peptídeo Fc-RP1 apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, antimalárica, com baixa toxicidade em linhagens celulares de Hacat, HepG2 e U87. Além disso os peptídeos demonstraram atividade contra bactéria gram-positiva, destacando que o peptídeo conjugado Fc-RP1 foi seletivo. Em conclusão, a conjugação do ferroceno com peptídeos mostrou-se interessante para a obtenção de novos compostos biológicos com atividade antifúngica e antiparasitária.

Palavras chaves: atividade antifúngica, atividade antiparasitária, peptídeo, ferroceno, atividade antimicrobiana.

Abstract

Fungal and parasitic diseases are major health problems globally. Around the world, 800 million people are affected with a type of fungal disease; the main ones are caused by *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* and *Pneumocystis*. Standard treatments can be inefficient due to the resistance, high toxicity and side effects in patients. In addition, parasites are causing a large number of deaths, especially in poor and developing countries, as example malaria causes around 660 million people per year. Alternatives to standard treatments are urgently needed. Among them, antimicrobial peptides are the most widespread. The RP1 peptide of the chemokine class showed activity against bacteria, viruses and antiparasitic action. In addition, the organometallic compound ferrocene ($\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$) also exhibited antiparasitic activity. The objective of this study was to evaluate the effect of the conjugation of the peptide with ferrocene in terms of structure, biological activity and toxicity. The peptides were synthesized using the solid phase peptide synthesis technique (SPPS). The structure was evaluated by circular dichroism (CD) spectroscopy, peptide activity was evaluated by vesicle permeabilization studies, antimicrobial assays and cytotoxicity was evaluated. CD assays in PBS showed that the peptides presented a typical spectrum for disordered structures. In the presence of micelles, both peptides presented high incidence of α -helical structure. CD assays were also performed with unilamellar vesicles of POPC and POPC: POPS, in both cases the peptides did not present a defined secondary structure. The permeability data showed that the RP1 peptide release low percentage of Carboxyfluorescein (CF), indicating no good interaction between the peptide and the membrane, while ferrocene conjugated peptide presented high CF release value, showing that ferrocene increases the permeability of the peptide. Antileishmania assays showed that RP1 peptide showed no activity as described in the literature. The Fc-RP1 peptide showed antifungal against *Cryptococcus neoformans* and antimalarial activity with low toxicity in Hacat, U87 and HepG2 cell lines. In addition, the peptides demonstrated activity against gram-positive bacteria, noting that the conjugated peptide Fc-RP1 was selective. In conclusion, the ferrocene conjugated in the antimicrobial peptide RP1 was interesting to obtain new biological compounds against fungal and parasitic diseases.

Key words: fungal and parasitic diseases, peptide, ferrocene, antimicrobial activity.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i> | 17 |
| Figura 2: Estruturas secundárias dos peptídeos antimicrobianos: alfa hélice, folha beta e estruturas randômicas | 23 |
| Figura 3: Estrutura do ferroceno ácido carboxílico utilizada no trabalho | 28 |
| Figura 4: Ciclo de oxidação/redução completo do ferroceno: ferroceno/ Íon ferrocênio . | 29 |
| Figura 5: Ilustração da reação que ocorre durante o acoplamento do aminoácido..... | 31 |
| Figura 6: Protocolo da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida utilizada neste trabalho...33 | |
| Figura 7: Esquema da placa do experimento de citotoxicidade..... | 41 |
| Figura 8: Espectro de massas referente ao peptídeo ALYKKFKKKLLKSLKRLG-COOH massa molar de 2162 g mol ⁻¹ | 45 |
| Figura 9: Espectro de massas referente ao peptídeo Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG-COOH massa molar de 2374 g mol ⁻¹ | 45 |
| Figura 10: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto RP1, com tempo retenção de 10,45 minutos..... | 46 |
| Figura 11: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Fc-RP1, com tempo retenção de 14 minutos..... | 46 |
| Figura 12: Perfil cromatográfico do peptídeo RP1 puro, com pureza de 93%..... | 46 |
| Figura 13: Cromatogramas das frações puras do peptídeo Fc-RP1, mostrando as três purificações realizadas..... | 48 |
| Figura 14: Gráficos representando o perfil de degradação dos compostos RP1, Fc-RP1 e Ferroceno Ácido carboxílico, nos intervalos de 0,6,8,12 e 24 horas: a) PBS, b) TFA..... | 51 |
| Figura 15: Espectros de absorção em luz UV dos compostos RP1, Fc-RP1 e Ferroceno ácido carboxílico..... | 52 |
| Figura 16: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em LPC: a) RP1, b) Fc-RP1..... | 54 |
| Figura 17: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em vesículas unilamelares de POPC..... | 56 |
| Figura 18: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em vesículas unilamelares de POPC:POPS (9:1) | 57 |

| | |
|--|---------|
| Figura 19: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína para as moléculas RP1 e Fc-RP1 com vesículas de POPC..... | 59 |
| Figura 20: Ensaio de permeabilização de vesícula com carboxifluoresceína com vesículas POPC:POPS (9:1) | 60 |
| Figura 21: Estrutura do ferroceno ácido carboxílico (a) utilizado nos ensaios antileishmania e o fármaco ferroquina (b). | 61 e 62 |
| Figura 22: Ensaio antibacterianos com os peptídeos (a) RP1, e (b) FcRP1 em <i>Aeromonas hydrophila</i> pelos peptídeos..... | 63 |
| Figura 23: Ensaio antibacterianos com os peptídeos (a) RP1, e (b) FcRP1 em <i>S. agalactiae</i> | 65 |
| Figura 24: Ensaio de MIC com <i>C.neoformans</i> frente as normas do CLSI, todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental com triplicata de cada ponto. | 66 |
| Figura 25: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> sem tratamento (controle negativo) com marcação de PI por 10 minutos..... | 67 |
| Figura 26: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> tratadas com RP1 na concentração de MIC e marcadas com PI..... | 70 |
| Figura 27: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> tratadas com RP1 em concentração inferior ao MIC marcadas com PI | 71 |
| Figura 28: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> tratadas com Fc-RP1 na concentração de MIC marcadas com PI..... | 72 |
| Figura 29: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> tratadas com Fc-RP1 na concentração inferior ao MIC marcadas com PI..... | 73 |
| Figura 30: Citometria de fluxo de células de <i>C.neoformans</i> tratadas com Ferroceno na concentração de 250 µg mL ⁻¹ marcadas com PI..... | 74 |
| Figura 31: Porcentagem de células <i>C. neoformans</i> PI positivas, frente aos tratamentos com RP1, Fc-RP1 e ferroceno ácido carboxílico..... | 75 |
| Figura 32: Morfologia do parasito <i>P. falciparum</i> ao longo do ensaio de estágio de ação (0, 7 e 24 horas de incubação) para os compostos enviados e o controle..... | 77 |
| Figura 33 Testes de citotoxicidade com linhagem celular U-87 (linhagem celular de glioblastoma primário humano) | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 34: Testes de citotoxicidade com linhagem celular Hacat (linhagem celular de queranócitos imortalizadas) | 81 |
| Figura 35: Testes de citotoxicidade com linhagem celular HepG2(linhagem celular de hepatocarcinoma humano) | 82 |
| Figura 36: Atividade citotóxica e hemolítica dos peptídeos em hemácias de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) | 83 |

Lista de tabelas e Quadros

| | |
|--|----|
| Quadro 1: Peptídeos antimicrobianos com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas... .. | 26 |
| Tabela 1: Dados da síntese dos peptídeos RP1 e Fc-RP1..... | 44 |
| Tabela 2: Rendimentos da clivagem dos peptídeos RP1 e Fc-RP1..... | 44 |
| Tabela 3: Condições de purificação do peptídeo RP1 e quantidade de material puro... .. | 47 |
| Tabela 4: Condições utilizadas no processo de purificação do peptídeo Fc-RP1 e massas de frações puras obtidas. | 49 |
| Tabela 5: Ensaio antimaláricos com concentrações superiores a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e concentração máxima de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ | 76 |
| Tabela 6: Avaliação da concentração hemolítica de 50% (HC50) contra hemácias humanas O+..... | 76 |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 15 |
| 1.1. Leishmaniose | 15 |
| 1.2. Doenças Fúngicas | 18 |
| 1.3. Malária | 20 |
| 1.4. Infecções bacterianas | 21 |
| 1.5. Peptídeos antimicrobianos | 22 |
| 1.6. Peptídeos antifúngicos e antiparasitários | 25 |
| 1.7. Molécula de ferroceno | 28 |
| 2. Objetivos | 31 |
| 3. Materiais e métodos | 31 |
| 3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida | 31 |
| 3.2. Reação de clivagem | 33 |
| 3.3. Purificação e caracterização dos peptídeos | 34 |
| 3.4. Espectro de Luz em UV | 34 |
| 3.5. Dicroísmo Circular | 35 |
| 3.6. Permeabilização em vesículas | 35 |
| 3.7. Teste de estabilidade | 36 |
| 3.8. Testes biológicos | 36 |
| 3.8.1. Testes antibacterianos | 37 |
| 3.8.2. Testes antifúngicos | 37 |
| 3.8.3. Ensaio de dano de membrana por citometria de fluxo | 37 |
| 3.8.4. Testes antimaláricos | 38 |
| 3.8.5. Testes antileishmania | 39 |
| 3.8.6. Testes de citotoxicidade | 40 |
| 4. Resultados e discussão | 43 |
| 4.1. Síntese dos peptídeos | 43 |
| 4.2. Teste de estabilidade | 49 |
| 4.3. Espectro de absorção em luz UV | 50 |

| | | |
|---------------|---|----|
| 4.4. | Dicroísmo circular | 53 |
| 4.5. | Permeabilização de vesículas | 58 |
| 4.6. | Ensaio biológicos | 60 |
| 4.6.1. | Ensaio antileishmania..... | 61 |
| 4.6.2. | Ensaio antibacterianos..... | 62 |
| 4.6.3. | Ensaio antifúngicos | 66 |
| 4.6.4. | Ensaio de dano de membrana por citometria de fluxo..... | 68 |
| 4.6.5. | Ensaio antimaláricos | 75 |
| 4.6.6. | Testes de citotoxicidade | 77 |
| 5. | Conclusões | 83 |
| 6. | Referência | 84 |

1. Introdução

1.1. Leishmaniose

Doenças negligenciadas são endêmicas em muitas populações pobres e em países subdesenvolvidos, dos quais a maioria dos indivíduos e comunidades tem menos acesso a recursos financeiros e aos sistemas de saúde, podendo viver em condições sanitárias precárias e ter uma nutrição inadequada (Mackey *et al.*, 2014; Hofstraat e Van Brakel, 2016)

Cerca de 1,4 bilhões de pessoas são atingidas por essas doenças, as quais causam entre 500 mil e 1 milhão de óbitos anualmente (Mackey *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) esse grupo de enfermidades compreende cerca de 17 patologias, compostas primariamente por infecções virais, por protozoários, helmínticas e bacterianas, entre as principais estão: dengue, chikungunya, raiva, úlcera de Buruli, lepra, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana (HAT ou doença do sono), leishmaniose; equinococoses, filariose linfática (LF), esquistossomose e teníase/cisticercose.

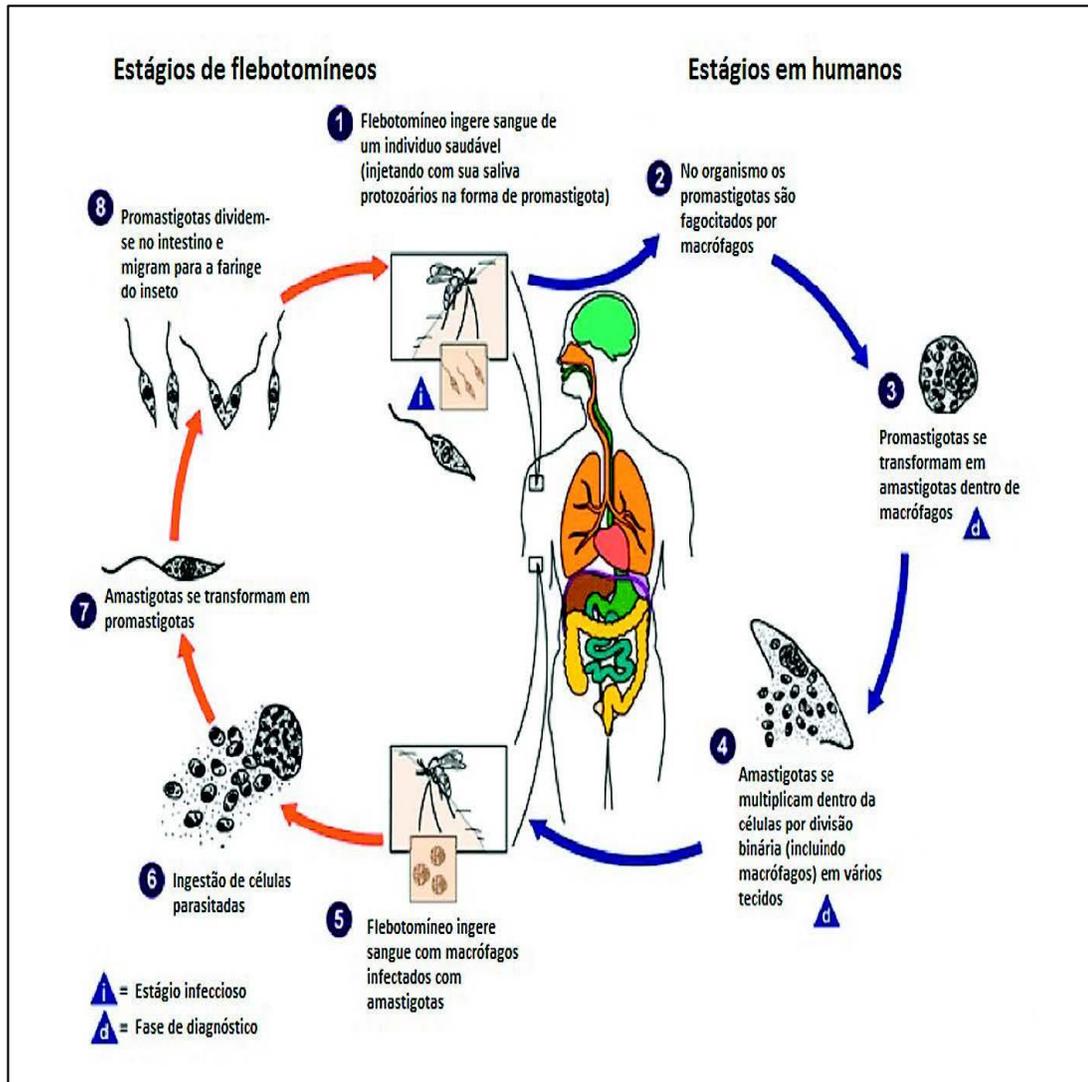
A leishmaniose, um dos focos de estudo desse trabalho, refere-se a um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastidia (Sundar e Chakravarty, 2015). Essa doença representa um problema global, concentrando-se em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, principalmente no Sudeste Asiático, África Oriental, América Latina e em países do Mediterrâneo. Atualmente a leishmaniose é a 3ª doença parasitária que mais causa mortes. Além disso, o número de casos de Leishmaniose vem aumentando devido aos indivíduos imunossuprimidos, como os que apresentam HIV, órgãos transplantados e os que são submetidos a quimioterapia (Dawit *et al.*, january, 2013). Dados mostram que entre 12 e 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e 350 milhões estão em risco de adquirir a doença. Estima-se ainda que, 700.000 a 1 milhão de novos casos ocorrem a cada ano e causam 20.000-30.000 mortes por ano (OMS, 2018).

Essa doença parasitária é transmitida aos seres humanos pela picada dos vetores infectados de insetos fêmeas, dípteros flebotomíneos que compreendem o gênero *Lutzomyia* (no continente americano) e *Phlebotomus* (na Europa, África e Ásia).

Além disso, cães e roedores também podem ser hospedeiros da doença (Dutra *et al.*, 2014).

Nos insetos hematófagos flebotomíneos o desenvolvimento do parasita ocorre no tubo digestivo com a formação de uma forma móvel, flagelada e alongada denominado promastigota, a qual amadurece à promastigota metacíclicos infectantes. Durante a picada, a fêmea inocula as formas promastigotas metacíclicos provenientes da região anterior do trato digestivo. A presença na saliva de neuropeptídeos vasodilatadores facilita a infecção e ao mesmo tempo imunossuprime a resposta do hospedeiro, inibindo a ação de antígenos (Dawit *et al.*, January, 2013). A forma promastigota se liga por receptores específicos aos macrófagos ou leucócitos, neutrófilos e células dendríticas presentes na pele, pelos quais são fagocitadas. Estes parasitas são imunes aos ácidos e enzimas dos lisossomos com os quais os macrófagos tentam digeri-las, e transformam-se nas formas amastigotas após cerca de 12 h. Nesta fase o parasita assume uma forma ovoide, com um curto flagelo, daí o termo “amastigota”. Então começam a multiplicar-se por divisão binária, saindo para o sangue ou linfa por exocitose, e por fim conduzem à destruição da célula, invadindo mais macrófagos (Alberola *et al.*, 2004). O ciclo de vida do parasita *Leishmania* é mostrado na figura 1.

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*.



Fonte: CDC, Centro de controle e prevenção de doenças, disponível em < <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> >, acesso em julho de 2018.

Existem três tipos de leishmaniose: visceral, cutânea e mucocutânea. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e é conhecida como Leishmaniose sistêmica, a qual danifica órgãos internos, principalmente fígado e baço, podendo ser fatal se não for tratada. A forma cutânea da doença geralmente se apresenta como lesões cutâneas autocicatrizantes, sendo este o tipo mais comum da doença. A Leishmaniose mucocutânea pode ocorrer vários meses após as úlceras da pele cicatrizarem, afetando especialmente as membranas mucosas do nariz (Dawit *et al.*, January, 2013).

A primeira linha de tratamento da leishmaniose se realiza com os antimoniais pentavalentes (antimoniato de metilglucamina e estibogluconato de sódio) desenvolvidos em 1945, a segunda linha de tratamento é feita com anfotericina B e a pentamidina, com longos cursos de administração parenteral (Tiuman *et al.*, 2011; Elmahallawy e Agil, 2015).

A escolha do tratamento adequado também depende do tipo de espécie causadora da doença, pois dosagens incorretas e tratamentos descontínuos contribuíram para o aumento das formas resistentes de parasitas, reduzindo a eficácia das medicações convencionais. Além disso os tratamentos convencionais apresentam elevada toxicidade podendo acarretar efeitos colaterais como: mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos, além de toxicidade para células hepáticas e renais (Sundar e Chakravarty, 2015).

Desta forma, há necessidade de novas formas de tratamento da leishmaniose com menor toxicidade e mais seletivos.

1.2. Doenças fúngicas

Além das doenças parasitárias, as doenças fúngicas são responsáveis por levar a óbito mais de 1,5 milhão de pessoas e afetam mais de um bilhão de indivíduos em todo o mundo. No entanto, eles ainda são um assunto negligenciado pelas autoridades de saúde pública, embora a maioria das mortes sejam evitáveis (Bongomin *et al.*, 2017).

Existem cerca de 100.000 espécies de fungos, das quais apenas 300 espécies são conhecidas por causar infecção animal ou humana. Dependendo da virulência e da patogenicidade, eles são classificados em verdadeiros fungos patogênicos e fungos oportunistas. A virulência fúngica pode ser atribuída a capacidade dos fungos em crescer e se adaptar ao ambiente dentro dos tecidos do hospedeiro (especialmente os fungos dimórficos), e pela presença de enzimas, toxinas e outros compostos que auxiliam neste processo.

As infecções por fungos invasivos podem envolver qualquer parte do corpo e são comuns em pacientes imunocomprometidos, o que normalmente resulta em alta mortalidade. AIDS, tuber-

culose, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, crescente incidência de câncer e terapias de corticosteroides são os principais fatores de infecções fúngicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Cowen *et al.*, 2014). Entre os principais fungos que têm potencial para causar essas enfermidades estão incluídos: as leveduras (*Candida spp*, *Cryptococcus spp*) e os fungos filamentosos (*Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Scedosporium prolificans*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Rhizomucor Absidia*) (Kumar *et al.*, 2014).

Nos últimos anos foram relatados mais de 3.000.000 de casos de aspergilose pulmonar crônica, 223.100 casos de meningite criptocócica, 700.000 casos de candidíase invasiva, 250.000 casos de aspergilose invasiva, 100.000 casos de disseminação histoplasmoze, e mais de 10.000.000 casos de asma fúngica (Bongomin *et al.*, 2017).

O reconhecimento da importância das infecções por fungos levou a um aumento de agentes para o tratamento e prevenção das doenças fúngicas, infelizmente, as opções de tratamento ainda são limitadas e não são efetivas, pois o uso incorreto desses medicamentos promoveu a existência de linhagens fúngicas resistentes.

As classes de medicamentos antifúngicos incluem: 1) Azoles (por exemplo, fluconazol, voriconazol) e alilaminas (por exemplo, terbinafina), que inibem a biossíntese de ergosterol; 2) os polenenos (por exemplo, anfotericina B) se ligam ao ergosterol na membrana plasmática, onde formam poros grandes que perturbam a função celular; 3) flucitosina (5-fluorocitosina), que inibe o metabolismo de pirimidina e a síntese de DNA; 4) as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), que são agentes que inibem a biossíntese de β -1,3-d-glicano, componente estrutural da parede celular fúngica (Shapiro *et al.*, 2011) e que atualmente são a primeira linha de tratamento (Cowen *et al.*, 2014).

O desenvolvimento da resistência antifúngica é complexo e depende de múltiplos fatores que envolvem o hospedeiro e o agente microbiano. O status imunológico do hospedeiro é um fator crítico, pois os fármacos fungistáticos devem trabalhar sinergicamente para controlar e diminuir a infecção (Cowen *et al.*, 2014).

Além dos mecanismos de resistência, os fármacos atuais apresentam graves efeitos colaterais e de toxicidade; e podem ser hepatotóxicos, alterar níveis dos hormônios (testosterona e cortisol), podem ser bioacumuladores no interior das células adiposas, o

que leva a sérios danos nos rins, náuseas e diarreias, entre outros sintomas (Shapiro *et al.*, 2011).

Portanto, doenças fúngicas representam uma problemática de saúde global, a qual exige tratamentos mais efetivos e com menores efeitos colaterais.

1.3. Malária

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS 2015), mais de um bilhão de indivíduos vivem em áreas de risco de transmissão da malária, com incidência anual de 214 milhões de novos casos. Protozoários do gênero *Plasmodium* são os agentes etiológicos da malária (Buffet *et al.*, 2011), sendo a espécie *Plasmodium falciparum* o agente etiológico da forma mais grave da doença (Crompton *et al.*, 2014). O ciclo de vida deste protozoário no hospedeiro vertebrado se inicia pela inoculação de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Após um ciclo tecidual nos hepatócitos, merozoítos liberados após o rompimento de hepatócitos invadem hemácias, desenvolvendo-se de forma assexuada. Fatores do hospedeiro, como variações nos níveis de lysophosphatidilcolina no sangue, induzem a expressão diferencial de genes importantes para a diferenciação dos parasitos a gametócitos, garantindo o sucesso da transmissão do parasito a outros hospedeiros (Cowman *et al.*, 2016; Brancucci *et al.*, 2017).

Os sintomas mais comuns da doença são febre (paroxismo), náusea, dor de cabeça (Cowman *et al.*, 2016). Nos casos de malária grave, poderá haver comprometimento de órgãos vitais, devido à alteração na microcirculação do paciente, e destruição de hemácias sadias e infectadas pelo baço, ocasionando comprometimento cerebral, respiratório, entre outros, agravado por grave anemia, podendo evoluir ao quadro de óbito (Cowman *et al.*, 2016).

Os fármacos para o tratamento da malária, diferem em estrutura química e mecanismo de ação, podendo ser classificados, de acordo com a OMS, em 2017:

- esquizonticidas sanguíneos (inibem o desenvolvimento de esquizontes): amodiaquina, cloroquina, quinina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina, artemisi-nina e derivados, tetraciclina, proguanil, pirimetamina, sulfas e sulfonas (OMS, 2017);
- esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas: primaquina;
- gametocidas (eliminam os gametócitos): primaquina e derivados da artemisinina;

- Profiláticos causais (impedem que merozoítas invadam hemácias): cloroquina, mefloquina, proguanil, pirimetamina e doxiciclina)

No entanto, esses tratamentos são geralmente ineficazes e tóxicos, sendo assim, relevante a identificação de novas drogas para ampliar o arsenal terapêutico para controle da malária.

1.4. Infecções bacterianas

Um dos grandes desafios atuais na área de saúde é a alta incidência de infecções microbianas que representam uma das principais causas de morte nos países em desenvolvimento. Uma forma de infecção microbiana é a causada por bactérias patogênicas que podem infectar e persistir dentro de seus hospedeiros por longos períodos de tempo (Vouga e Greub, 2016). Isto pode ser devido à imunossupressão do hospedeiro, evasão imune pelo patógeno e / ou morte ineficaz por antibióticos. Bactérias podem sobreviver ao tratamento com antibióticos se forem resistentes ou tolerantes a um medicamento.

Muitos patógenos vêm se tornando resistentes a vários tipos ou classes de antibióticos. A falta de tratamentos eficazes contra infecções bacterianas pode acarretar complicações em diversos quadros clínicos que são comuns em pacientes submetidos a quimioterapia, diálise por insuficiência renal ou cirurgia, e especialmente transplante de órgãos, para o qual a capacidade de tratar infecções é muito importante (Thaver *et al.*, 2009).

Segundo a OMS (2018), existem cerca de seis diferentes bactérias mortais que têm cepas resistentes a todos ou praticamente todos os antibióticos comerciais: *Enterobacteriaceae* (especialmente *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

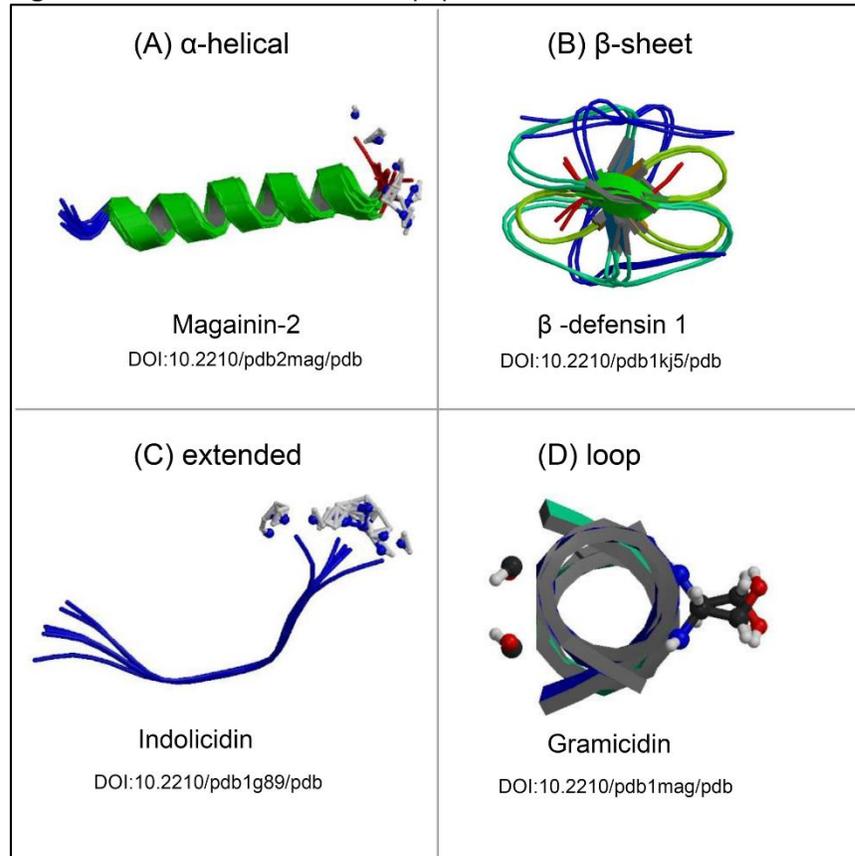
A ineficiência dos fármacos atuais para matar os organismos resistentes, enfatiza a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, sendo uma alternativa os peptídeos antimicrobianos.

1.5. Peptídeos Antimicrobianos

A ineficiência das drogas atuais para matar os organismos resistentes, enfatiza a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Diante desta problemática, uma classe de compostos vem sendo estudada: os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Esses atuam como componentes importantes da imunidade inata de diversos organismos, protegendo o hospedeiro contra infecções e se encontram presentes em bactérias, fungos, plantas, invertebrados, vertebrados e mamíferos (Mahlapuu *et al.*, 2016). Os PAMS possuem além da atividade antimicrobiana, uma ampla gama de atividades, tais como, anticancerígena, espermicida, quimiotática e antiviral (Seo *et al.*, 2012; Aoki e Ueda, 2013; Lewies *et al.*, 2015).

Os PAMs são oligopeptídeos com um número de cinco a 50 de resíduos de aminoácidos, sendo que, mais de 5.000 peptídeos antimicrobianos já foram isolados ou sintetizados (Seo *et al.*, 2012). Esses também exibem uma carga positiva global que pode variar de +2 a +11 e contêm uma proporção substancial (aproximadamente 50%) de resíduos hidrofóbicos (Mahlapuu *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2017).

Estas moléculas são comumente classificadas com base na sua estrutura secundária: folha- β , α -hélice e os não estruturados (random coil). Os contendo α -hélices e folha- β são os mais comuns (Seo *et al.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura secundária de peptídeos antimicrobianos

Fonte: (Peters *et al.*, 2010)

Os peptídeos com estrutura secundária em α -hélice muitas vezes não se estruturam em solução, assumindo uma estrutura helicoidal anfipática em contato com uma membrana biológica (Mahlapuu *et al.*, 2016).

Os peptídeos folha β são organizados para criar uma molécula anfipática, além disso, por possuírem uma estrutura mais rígida, são mais ordenados em solução aquosa e não sofrem mudança conformacional drástica após a interação com membrana biológica (Aoki e Ueda, 2013; Mahlapuu *et al.*, 2016).

Uma pequena porção de PAMs naturais pertence à classe dos não estruturados (random coil), esses contêm um alto teor de resíduos de arginina, prolina, triptofano e/ou histidina, podendo apresentar dobras e estruturas anfipáticas após contato com uma membrana (Mahlapuu *et al.*, 2016).

Outra vantagem desses compostos é a fácil capacidade de se modificar a estrutura dessas moléculas, seja através da síntese química ou ainda utilizando sistemas de

expressão recombinantes. As modificações realizadas têm como objetivo mudar a especificidade e melhorar a estabilidade das moléculas contra proteases, entre outros (Yang *et al.*, 2016).

Ainda existem alguns desafios para a aplicação dessas moléculas, tais como a toxicidade para os seres humanos, susceptibilidade às proteases, falta de seletividade contra cepas específicas, altos custos de produção, atividade reduzida quando utilizados para revestimento de superfícies, e, apesar de incomum, a resistência de alguns microrganismos (Bahar e Ren, 2013).

O mecanismo de ação dessas moléculas está vinculado na capacidade das mesmas em interagir, permear e desestruturar as membranas celulares, sendo dependente de diversos fatores, tais como a estrutura secundária, a carga líquida total, o tamanho e o equilíbrio entre as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Lewies *et al.*, 2015). A interação com a membrana é um fator chave para a sua atividade antimicrobiana, a atração entre as forças eletrostáticas dos PAMs catiônicos e a superfície bacteriana carregada negativamente são determinantes para essa interação (Mahlapuu *et al.*, 2016). A membrana celular bacteriana é rica em fosfolipídios carregados negativamente como fosfatidilglicerol e fosfatidilserina (Bechinger e Gorr, 2017). Além disso, a presença de ácido teicóico na parede celular de bactérias Gram-positivas e de lipopolisacarídeos (LPS) na membrana externa de bactérias Gram-negativas fornecem cargas negativas adicionais para a superfície bacteriana, o que facilita ainda mais a interação dos PAMs (Bechinger e Gorr, 2017). A constituição da membrana celular de mamíferos é diferente da bacteriana e menos negativa, o que permite que os PAMs tenham uma ação mais seletiva com as linhagens bacterianas.

O mecanismo de ação dos PAMs com estrutura helicoidal ocorre principalmente na membrana e os mais aceitos estão descritos a seguir (Bechinger e Gorr, 2017).

A) Modelo barril: os PAMs são inicialmente orientados paralelamente à membrana, mas, eventualmente, inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, onde a face apolar interage com os lipídios e os resíduos hidrofílicos formam os canais.

B) Modelo de poro toroidal: os peptídeos também se inserem paralelamente na membrana, mas interações peptídeo-lipídeos induzem uma curvatura local da bicamada

lipídica, formando poros constituídos em parte por peptídeos e em parte pelos grupos polares da cabeça fosfolipídica.

C) Carpete, os PAMs se colocam paralelamente à bicamada lipídica formando assim um "carpete". Ao atingir uma concentração limiar na superfície da membrana a integridade da membrana é perdida, produzindo um efeito semelhante ao detergente, que eventualmente desintegra a membrana formando micelas (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Outro ponto importante, é que os peptídeos antimicrobianos possuem outros mecanismos de ação além dos que se baseiam na interação com a membrana celular, sendo que eles podem atravessar a membrana e agir em alvos intracelulares. Da mesma forma que os antibióticos convencionais, os PAMs também podem inibir a síntese da parede celular, afetar a síntese proteica e atuar especificamente sobre o DNA/RNA durante os processos de replicação ou transcrição (Bechinger e Gorr, 2017; Kumar *et al.*, 2018).

Existem inúmeros peptídeos com efeitos antimicrobianos comprovados em diversos tipos de linhagens bacterianas, inclusive em linhagens resistentes a antibióticos (Quadro 1).

1.1. Peptídeos Antifúngicos e antiparasitários

Os peptídeos antimicrobianos como já mencionado anteriormente possuem um amplo espectro de ação, dos quais um dos alvos podem ser os fungos, já que doenças fúngicas são um problema de saúde pública.

Peptídeos antifúngicos provêm das mais diversas origens: de insetos, mamíferos e reptéis; e possuem diferentes mecanismos de ação. Algumas moléculas, por exemplo a classe de peptídeos catelicidinas de origem bovina e ovina, podem permear a membrana celular de fungos, levando a morte do patógeno, tais como *C. albicans* e *C. neoformans* (Bondaryk *et al.*, 2017). Outros peptídeos possuem a capacidade de se ligar a componentes da parede celular e da membrana citoplasmática como um passo para a sua permeabilização, como por exemplo a Cecropina B e dermaseptina que se ligam ao ergosterol de espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* (De Lucca e Walsh, 1999; Lorenzón *et al.*, 2013). Outros peptídeos da classe das defensinas são capazes de permear a membrana devido a ligação com as proteínas glicosiladas da parede celular ou

ainda agem na síntese da parede celular (Bondaryk *et al.*, 2017) e da parede lipídica. O stress oxidativo também é um mecanismo de ação que acarreta lise de células fúngicas, um exemplo disso é a defensina de planta PvD1 que por permeabilização da membrana ou por danos causados por estresse oxidativo via produção de EROS e óxido nítrico, leva a morte de linhagens de *C.albicans* (Kang *et al.*, 2017).

Quadro 1: Peptídeos antimicrobianos com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

| Peptídeos | <i>S. enterica ser. Typhimurium LT2</i> | <i>E. coli ATCC25922</i> | <i>S. aureus ATCC29213</i> | <i>E. faecalis ATCC29212</i> |
|---------------------------|---|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | | |
| Cap18 | 4 | 4–8 | ≥ 32 | 8 |
| Cap11 | 8 | 8–16 | 16–32 | 16–32 |
| Cecropin P1 | ≥ 128 | 16–32 | >256 | >256 |
| Cecropin B | 32 | 16–32 | >256 | >256 |
| Bac2A-NH ₂ | 128 | 64 | 128 | 16–32 |
| Bac2A | >256 | 256 | >256 | 64 |
| Sub5-NH ₂ | 8 | 4 | 8 | 4–8 |
| Melittin | 32–64 | 16 | 2–4 | 2–4 |
| Indolicidin | 64 | 32 | 32 | 32 |
| Myxinidin-NH ₂ | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pyrrhocoricin | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Apidaecin IA | 64 | 32 | >256 | >256 |
| Metalnikowin I | >256 | >256 | >256 | >256 |

Fonte: (Ebbensgaard *et al.*, 2015), modificado pelo autor.

Dentre os PAMs que possuem alvos intracelulares, destaca-se a Histatina-5 (Hst-5), presente na saliva humana, com atividade em diferentes espécies de fungos. O mecanismo de ação da Hst-5 baseia-se na ligação à β -glicanas, sendo translocado para o citosol, associando à mitocôndria e afetando a respiração celular e como consequência, aumentando a produção de EROS, o que culmina na morte celular por estresse oxidativo (Bondaryk *et al.*, 2017).

Outros alvos de ação dos PAMs são os protozoários causadores de doenças parasitárias graves e que não possuem tratamentos efetivos. O mecanismo de ação dessas moléculas em parasitas pode ocorrer por múltiplos mecanismos:

- i) Perturbação direta da membrana plasmática;
- ii) Interação com alvos internos
- iii) Modulação da resposta imune

A membrana celular de eucariontes inferiores, como os protozoários é composta por fosfolipídios de carga negativa, o que faz com os PAMs sejam mais específicos à células do parasita do que as do hospedeiro (Lewies *et al.*, 2015). Os peptídeos antiparasitários também causam uma instabilidade da integridade da membrana, o que leva a alterações morfológicas, um rápido colapso do potencial de membrana e queda intracelular dos níveis de ATP (Pretzel *et al.*, 2013). Como exemplos, temos os peptídeos Temporina A e B e Cecropina A, que são catiônicos e possuem estrutura alfa hélice em contato com membrana, atuando em espécies de *Leishmania*, levando a sua desestabilização e lise celular (Pretzel *et al.*, 2013). Outra molécula com efeito antiparasitário é a magainina, também com ação na membrana (Lewies *et al.*, 2015).

Outras possíveis formas de ação dos PAMs, inclui a interação com proteínas da membrana e alteração de suas funções (Lewies *et al.*, 2015), bem como a ação com alvos internos. Dentre os PAMs que utilizam esse mecanismo podemos destacar a Histatina 5 (Hst5), já citada anteriormente, e que age sobre a mitocôndria (Lewies *et al.*, 2015). Nesse mecanismo ocorre diminuição na taxa de respiração mitocondrial e no potencial eletroquímico dessa organela, levando a um colapso bioenergético.

Alguns PAMs também podem induzir a liberação de hidrolases que perturbam a membrana e levam a morte, ou ainda que promovem processos apoptóticos, geralmente por via de caspases (Pretzel *et al.*, 2013; Lewies *et al.*, 2015).

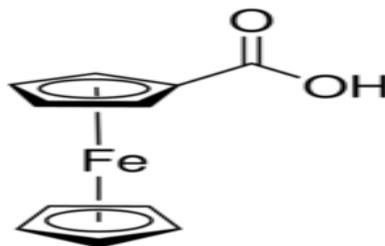
Este projeto também avaliou um PAM como composto antiparasitário, tendo em vista que, doenças causadas por parasitas pertencem ao grupo que denominamos doenças tropicais negligenciadas. Apesar de as doenças negligenciadas serem uma problemática global, não há um investimento efetivo por parte das indústrias farmacêuticas e poder público na pesquisa e produção de medicamentos para estas enfermidades. Os tratamentos existentes são poucos eficazes, exigindo assim novas e mais eficientes estratégias de tratamento.

O peptídeo de escolha para esse trabalho foi o derivado da quimiocina humana CXCL4 (Erfe *et al.*, 2012). A estrutura básica dessa quimiocina é um domínio N-terminal prolongado, uma região nuclear estrutural, e a região C-terminal helicoidal, que é o responsável pela atividade microbica. O peptídeo sintético RP-1 (ALYKKFKKKLLKS-LKRLG) foi modelado em parte nos domínios helicoidais da quimiocina CXCL4 de mamíferos. O RP1 exerce potente atividade microbica com baixa citotoxicidade contra eritrócitos e células endoteliais (Erfe *et al.*, 2012). Somado a isso, para melhorar a eficácia deste PAM iremos conjugar uma molécula com diferente mecanismo de ação. A molécula escolhida foi o ferroceno, composto organometálico que mostra resultados promissores como agente anticâncer, antiparasitário e antimicrobiano.

1.2. Molécula de ferroceno

O ferroceno é um composto organometálico de fórmula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ pertencente à classe dos metallocenos. Consiste de dois anéis aromáticos presos a lados opostos de um metal de transição, neste caso o ferro. A investigação sobre esta classe de compostos começou em 1952. Essa molécula tem uma estrutura simétrica, sendo frequentemente referido como "complexo sanduíche" (Saleem *et al.*, 2015), como mostrado na figura 3.

Figura 3: Estrutura do ferroceno ácido carboxílico, utilizado neste trabalho.



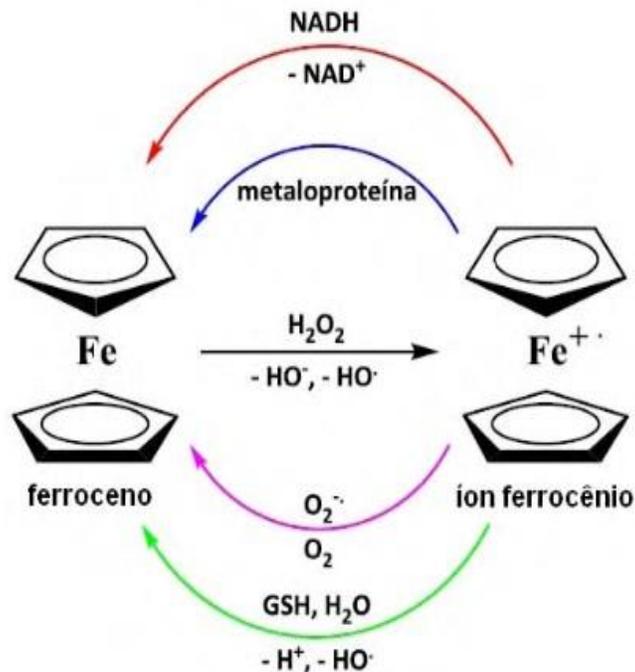
Fonte: Sigma Adlrich, 2017

A molécula de ferroceno vem se tornando uma plataforma para o desenho de novas drogas, em virtude de sua propriedade redox, alta lipofilicidade, estabilidade em meio aquoso e em alguns casos seletividade (Janka *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2017).

As propriedades medicinais deste composto mostraram propriedades antiproliferativas e não tóxicas, podendo ser injetado, inalado ou ingerido por via oral. A hidroxilação de ferroceno é efetuada por enzimas do citocromo P450, de forma semelhante ao benzeno e muitos outros hidrocarbonetos promovendo a degradação no fígado (Wang *et al.*, 2015). Outro ponto importante é que a molécula de ferroceno é facilmente reconhecida por aminoácidos, proteínas, DNA e carboidratos, podendo ser direcionada para seus alvos (Santos *et al.*, 2017)

Acredita-se que, no meio biológico o ferroceno seja oxidado ao cátion-radical ferrocênio pelo peróxido de hidrogênio na presença da enzima peroxidase (Wang *et al.*, 2015). A redução do íon ferrocênio ao ferroceno no meio biológico pode ocorrer por diversos caminhos, como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Ciclo de oxidação e redução do composto ferroceno/ferrocênio.



Fonte: Adaptado de (Velásquez *et al.*, 2014).

O íon ferrocênio forma radicais hidroxila que causam danos no DNA, pois este liga ao grupo fosfato do DNA, levando assim a um mecanismo de morte celular (Jaouen *et al.*, 2015). As espécies reativas de oxigênio formadas pela redução do grupo ferrocenil, podem também acarretar o colapso da mitocôndria, através da sua despolarização, levando a uma diminuição nos níveis de ATP e bloqueio da cadeia respiratória, o que leva a morte celular por necrose ou apoptose (Podolski-Renić *et al.*, 2017).

O ferroceno possui ação contra células cancerígenas, principalmente câncer de mama, ovário e próstata (Janka *et al.*, 2015; Jaouen *et al.*, 2015). O principal mecanismo de ação desse composto em células cancerígenas se dá pela inibição da topoisomerase II durante o processo de replicação do DNA, devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio que ativam proteínas específicas e afetam essa enzima, além de afetar a estabilidade da molécula de DNA (Santos *et al.*, 2017).

Estudos comprovaram que o íon ferrocênio apresenta atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*; antiviral contra o vírus da AIDS, pois a molécula de ferroceno interfere no mecanismo de replicação do vírus (Santos *et al.*, 2017); e antiparasitária, por exemplo ação antimalárica contra *Plasmodium spp* (Lynn *et al.*, 2011) e contra *Trypanossoma brucei* e *Trypanossoma cruzi* (Velásquez *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigênio formadas por esse composto podem causar danos a membrana do parasita, além do processo de peroxidação dos lipídios, ocasionando a morte celular (Wani *et al.*, 2015).

Um dos medicamentos empregados no tratamento da malária é a cloroquina que é o medicamento esquizonticida. Com bases no potencial do ferroceno como antimalárico, esse foi acoplado a estrutura da cloroquina, originando o composto ferroquina que tem por ação inibir o crescimento do *Plasmodium falciparum*. Até o momento não foi observado o desenvolvimento de resistência do parasita por essa droga (Wani *et al.*, 2015).

Desta forma, a conjugação do peptídeo com o ferroceno pode trazer novas moléculas ativas contra a leishmaniose.

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi o de sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana e antiparasitária do peptídeo RP-1 e de seu conjugado contendo uma molécula de ferroceno em sua extremidade N-terminal.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

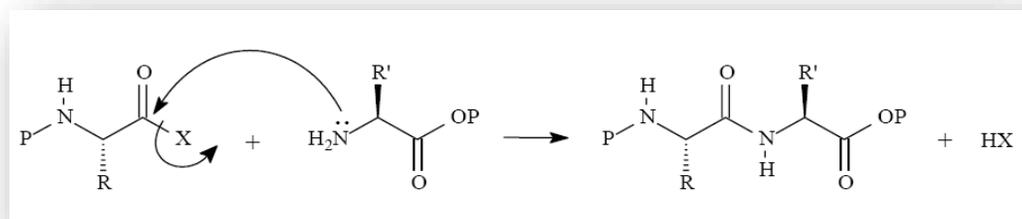
- Sintetizar, caracterizar e purificar o peptídeo RP-1;
- Acoplar a molécula de ferroceno ao peptídeo RP-1, caracterizar e purificar esse conjugado (RP-1-ferroceno);
- Avaliar as características Físico-Químicas dos peptídeos obtidos;
- Avaliar a interação com miméticos de membranas;
- Avaliar “in vitro” a atividade antimicrobiana e toxicidade destes compostos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese dos peptídeos

O peptídeo foi sintetizado utilizando a técnica denominada síntese peptídica em fase sólida (SPFS). Esse método de síntese encontra-se publicado em diversas revisões (Merrifield, 1964) e fundamenta-se no crescimento, resíduo por resíduo da cadeia peptídica, ligada covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina). O mecanismo resumido de acoplamento dos aminoácidos está mostrado na figura 5.

Figura 5: Ilustração da reação que ocorre durante o acoplamento do aminoácido.



(Fonte: LORENZÓN, E. N 2015)

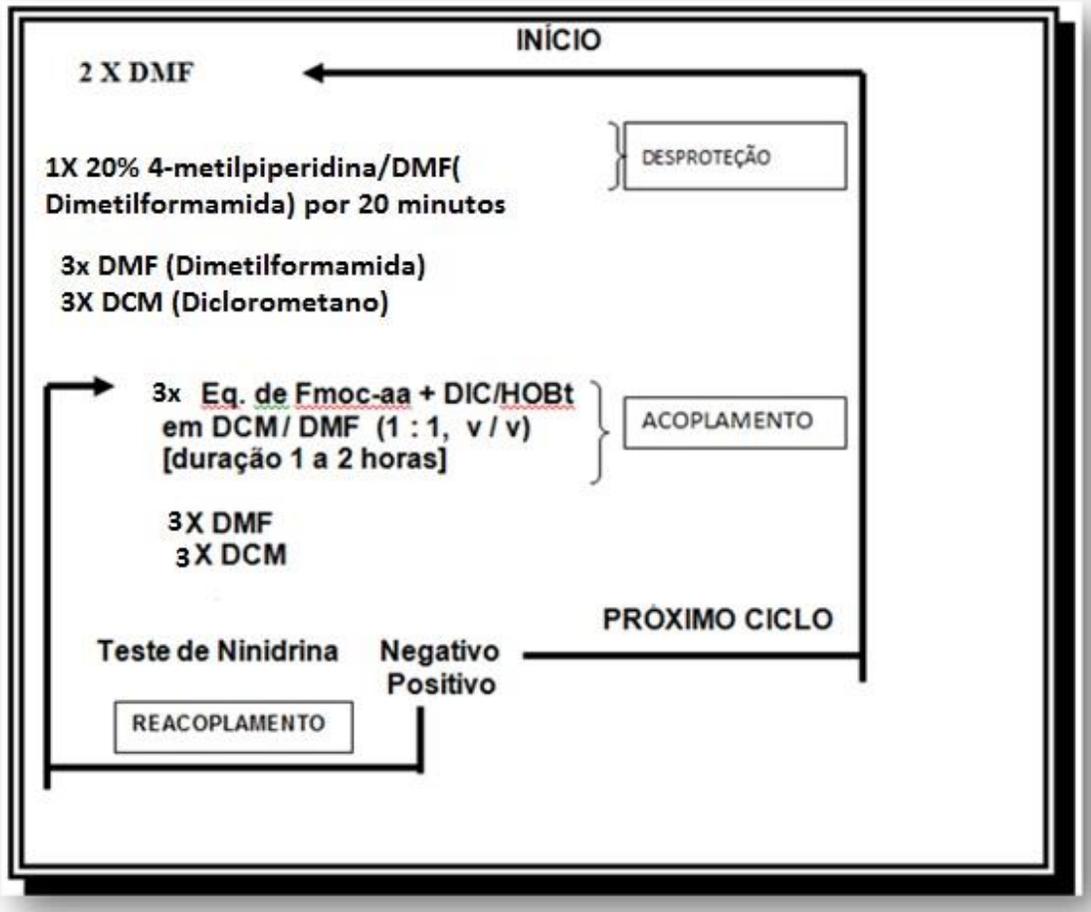
A ligação entre o carboxi-terminal do resíduo de aminoácido e o suporte polimérico é caracterizado por uma ligação do tipo éster para a obtenção de peptídeos com carboxilatos livres (exemplo: resina Wang), ou de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade alfa carboxamida (exemplo: resina Rink Amida).

No presente trabalho o peptídeo sintetizado foi o RP1 de sequência ALYKKFKKKLLKSLKRLG-COOH (Erfe *et al.*, 2012), sendo utilizada a resina FMOC-Gly-Wang, que já contém o primeiro aminoácido da síntese acoplado a resina.

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com diisopropilcarbodiimida (Dic) e N-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram usados com 3 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. O grupo Fmoc base-lábil foi retirado pela lavagem em 20% 4-metilpiperidina/DMF (dimetilformamida) durante 1 e 20 min.

Entre cada etapa foram realizadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Depois de cada etapa de acoplamento foi realizado o teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970). Este composto, em temperaturas elevadas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul, sendo apropriado para indicar a eficiência da síntese.

Figura 6: Protocolo da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida utilizada neste trabalho.



Após a síntese uma parte da resina foi separada para a obtenção do peptídeo RP1. No restante da peptidil-resina, a molécula de ferroceno foi acoplada à extremidade N-terminal do peptídeo, através do uso dos ativadores HCTU (hexafluorofosfato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il) N,N,N',N'-tetrametilurônio) e DIPEA (N,N,N-diisopropiletilamina).

3.2. Reação de clivagem

A clivagem do peptídeo ao final da síntese foi realizada pela adição do ácido trifluoracético - TFA, e supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) e água ultra-pura (95% de TFA, 2,5% de TIS e 2,5 % DE H₂O cada v/v); em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de peptidil-resina. Depois realizou-se a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado e o sobrenadante foi descartado, esse processo foi repetido por 3

vezes para retirada dos subprodutos e reagentes utilizados. No próximo passo, o peptídeo foi extraído com solvente A (água) contendo 0,045% de TFA (ácido trifluoracético) e solvente B (acetonitrila) contendo 0,036% de TFA, sendo centrifugado para separar o peptídeo da resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

3.3. Purificação e caracterização dos peptídeos

A purificação dos produtos obtidos foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H₂O) e solvente B (0,036% TFA em ACN), fluxo de 5 mL/min, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm). Para a purificação do peptídeo RP1 foi usado o gradiente de 10-40% solvente B em 90 min, já o peptídeo Fc-RP1 foi purificado com gradiente de 15-40% solvente B em 90 min.

Após a purificação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de CLAE em modo analítico, utilizando espectrômetro Shimadzu, com coluna Ultrasphere Phenomenex de fase reversa C18 (4,6 mm x 150 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm), detecção em 220 nm, utilizando método gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

As análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas com aparelho Bruker injeção ion trap, modo eletrospray positivo (M+H)⁺ na faixa de 200-2000 g/mol, para confirmar a obtenção do material desejado

3.4. Espectro de absorção em luz UV

Para os experimentos posteriores foi necessária a determinação da correta concentração das moléculas em estudo. O processo de quantificação foi realizado utilizando a espectrofotometria na região do UV, no entanto para a quantificação do peptídeo Fc-RP1 houve dificuldade para a obtenção deste dado. Essa dificuldade se deu pela presença da molécula de ferroceno neste peptídeo, sendo necessário assim obter qual era o comprimento de absorção deste composto. O espectro de absorção foi obtido

no espectrofotômetro de absorção na região do UV/Vis/NIR, Lambda 1050 da Perkin Elmer.

As moléculas de RP1, Fc-RP1 e ferroceno ácido carboxílico foram estudadas na concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, no comprimento de onda 200-400 nm.

3.5. Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para os estudos estruturais dos peptídeos. Os espectros de CD foram adquiridos 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. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm com controle de temperatura a 25° C. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos peptídeos em tampão PBS, para posterior diluição em 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As soluções de peptídeos foram tituladas com LPC, em concentrações de 1 e 5 mmol L^{-1} . Os experimentos de dicroísmo circular também foram realizados em vesículas unilamelares de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) e de POPC:POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-serina) (9:1) nas concentrações de 300 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

O cálculo da elipticidade molar $[\Theta]$ para converter os dados coletados inicialmente em milidegree foi realizado com a equação 1 (Casallanovo *et al.*, 2006):

$$[\Theta] = \frac{\text{valor (em milidegree)}}{(10 \cdot \ell \cdot [\text{peptídeo}] \cdot n^\circ \text{ de aa}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde no numerador é colocado o valor obtido em milidegree pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol.L^{-1} e n° de aa é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na molécula.

3.6. Permeabilização de vesículas

Foram preparados filmes lipídicos de POPC e de POPC:POPS (9:1) na concentração de 15 mmol L^{-1} .

Para elaboração dos filmes, os lipídios foram solubilizado em solução de metanol/clorofórmio (4:1, v:v) e exposto a um fluxo de nitrogênio para consequente

formação do filme lipídico. Os mesmos foram mantidos em bomba de vácuo durante 12 h para eliminação dos solventes. Após secagem no vácuo, foi adicionado uma solução aquosa contendo o fluoróforo carboxifluoresceína (CF-50 mmol L⁻¹). A solução passou por ciclos de aquecimento a 60°C seguida de sonicação e agitação por 5 min, durante 1 h para a formação das vesículas multilamelares. Após este período, a mistura foi submetida à um extrusor da Avanti Polar Lipids para obtenção de vesículas unilamelares de 100 nm.

Após a formação das vesículas unilamelares, a solução foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-20 para a separação da CF que não foi encapsulada no interior das vesículas. Os compostos foram testados sobre as vesículas e a sua ação foi acompanhada pela liberação do fluoróforo no equipamento espectrofluorímetro Fluorolog-3 FL3-122 da Horiba Jobin Yvon, com comprimento de onda ajustado em 495 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente. O peptídeo RP1 foi testado nas concentrações de 10 µmol.L⁻¹, 50 µmol.L⁻¹, o Fc-RP1 em 0,1 µmol.L⁻¹, 1 µmol.L⁻¹ e 10 µmol.L⁻¹. O Ferroceno também foi testado na concentração de 0,7 mmol.L⁻¹, todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.7. Teste de estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos compostos sintetizados, foram realizados ensaios de degradação em tampão PBS (tampão fosfato salino –pH 7,4) e em meio ácido (solução de água contendo 0,045% de ácido trifluoacético). Para os ensaios empregou-se uma solução com concentração de 1 mg.mL⁻¹ incubados a uma temperatura de 37°C por diferentes intervalos de tempo (0, 6, 8, 12 e 24 h).

Retiraram-se alíquotas em cada intervalo de tempo e essas foram avaliadas em CLAE analítico em corridas de 5-95 % solvente B em 30 min. Para avaliar estabilidade dos peptídeos e da molécula de ferroceno, foi calculado a porcentagem de material presente ao final de cada intervalo de tempo, com base nas áreas dos picos dos cromatogramas obtidos.

3.8. Testes biológicos

Foram realizados ensaios biológicos para verificar a atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antileishmania dos compostos RP1, Fc-RP1 e Ferroceno

Ácido Carboxílico, além de testes de hemólise para verificar a estabilidade dos compostos e toxicidade.

3.8.1. Testes antibacterianos

Para os ensaios antibacterianos utilizou-se apenas o peptídeo RP1 e seu conjugado. Foram usadas as cepas da bactéria gram-positiva *Streptococcus agalactiae* (número de acesso GenBank: MH359095.1) e da gram-negativa *Aeromonas hydrophila* (número de acesso GenBank: MH305534.1) isoladas de tilápias do Nilo naturalmente infectadas. Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Wayne et al., 2007). Os peptídeos foram diluídos em água destilada estéril e as concentrações dentre 0,2; 0,5; 1,1; 2,3; 4,6; 9,3; 18,7; 37,5; 75 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e adicionados na placa de 96 poços de fundo chato (Costar®) em triplicata juntamente com a concentração bacteriana pré-estabelecida e o controle positivo apenas (bactéria e meio de cultura). Na sequência a solução foi incubada por 24 h sobre agitação a temperatura de 28°C e a concentração de peptídeos que inibiu o crescimento visível de bactérias foi determinada em D.O 600. Os valores em triplicata foram processados e analisados.

3.8.2. Testes antifúngicos

Os testes antifúngicos foram realizados com a levedura: *Cryptococcus neoformans*, utilizando a técnica Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (M27-A3). A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos foram obtidas por meio de diluições seriadas de 250 a 0,49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 48 h, foi realizado a leitura visual de cada concentração das moléculas testadas a fim de identificar a concentração inibitória mínima e esta foi confirmada com o agente reducional Alamar blue, que foi adicionado para quantificar a porcentagem de morte das levedura por fluorescência.

3.8.3. Ensaios de dano de membrana por citometria de fluxo

A fim de avaliar o mecanismo de ação dos peptídeos e da molécula de ferroceno ácido carboxílico foram realizados ensaios de citometria de fluxo para contagem e

verificação de viabilidade celular. Para este ensaio utilizou-se o fluoróforo iodeto de propídeo (PI), que marca a molécula de DNA e emite fluorescência (Benaducci *et al.*, 2015). Para os ensaios, as células de *C. neoformans* foram incubadas com os três compostos, segundo o protocolo de MIC já descrito por 48 h e agitação a 37 ° C.

Após isso, 100 µL das suspensões de células contendo as moléculas testadas foram incubadas com 400 µL de tampão de citometria e 1 µg de iodeto de propídeo (PI; Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), por 10 min sem a presença de luminosidade. Após esse tempo, foi realizada a leitura no equipamento BD FACSCanto, e os dados analisados pelo programa BD FACSDiva *software*.

Um gráfico *dot plot* SSC (*Side SCatter*) versus FSC (*Forward SCatter*) foi construído para determinar a população de células analisadas que foi delimitada pelo quadrante P1, do qual foi construído um histograma para determinar a porcentagem de células PI positivas (P2). Todas as amostras analisadas foram diluídas em solução FACSFlow e foram adquiridos 10.000 eventos dentro do quadrante P1 no modo de aquisição médio, todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental com triplicata de cada ponto.

Os gráficos da intensidade de fluorescência do PI foram divididos em dois quadrantes, ou seja, esquerda compreendendo células PI negativas (células viáveis) e direita compreendendo PI células positivas (células não viáveis). Para estes experimentos foram utilizadas concentrações acima do MIC, a concentração de MIC e uma inferior ao MIC, avaliando assim se esses compostos estariam agindo na membrana fúngica.

3.8.4. Ensaio antimaláricos

Nos ensaios antimaláricos, foram realizados ensaios com o microrganismo *Plasmodium Falciparum* com a cepa 3d7-cloroquina sensível. O método utilizado foi SYBR GREEN I que se baseia na utilização do reagente SYBR para quantificação de parasitos viáveis a partir da marcação do DNA. As concentrações usadas para os ensaios foram 10 µmol.L⁻¹ a 100 µmol.L⁻¹. Neste ensaio, após 72 h de incubação dos parasitos, o reagente de SYBR foi adicionado e ocorreu marcação do DNA dos parasitos viáveis. O cálculo de redução da parasitemia foi feito a partir da viabilidade do grupo controle (sem

adição dos compostos).

Também foi realizado, ensaios de hemólise a fim de avaliar ação desses compostos frente ao alvo do parasita as hemácias. Os compostos foram diluídos em meio RPMI completo e foi feita diluição seriada de fator 2 para avaliar as doses entre 100 a 1,56 μM . Foi preparada uma suspensão de eritrócitos humanos O+ a 2% de hematócrito em meio RPMI, e esta foi dispensada em uma placa de 96 poços, com 180 μL por poço. A cada poço foram adicionados 20 μL dos compostos previamente diluídos, e a placa foi incubada a 37°C por 72h.

Em paralelo, foram feitos controles negativo e positivo de hemólise, o primeiro sem adição de compostos e o último com adição de 20 μL de uma solução de saponina 0,05% (m/v) para hemólise completa. Após incubação, foi feita a leitura em espectrofotômetro SpectraMax® Plus, em comprimento de onda 540 nm. A taxa de hemólise para cada poço foi calculada a partir das intensidades dos controles positivo e negativo de hemólise. O protocolo foi ajustado para o mesmo tempo de incubação que o ensaio de SYBR, objetivando simular as mesmas condições de ensaio.

Outro ponto avaliado, foi em qual estágio de desenvolvimento do parasita os peptídeos e a molécula de ferroceno poderiam estar agindo e levando assim a morte do parasita, Para estas análises cada composto foi adicionado a uma concentração de 100 μM , utilizou como controle positivo de crescimento a cultura de *P. falciparum*, sem adição de composto. A cada poço foi adicionado 180 μL de cultura de *P. falciparum* (cepa 3D7) a 2% hematócrito e 0,5% de parasitemia, sincronizada na forma de anel. Foram feitos esfregaços iniciais (t=0h), e após 7 e 24 horas de incubação. A morfologia e parasitemia foram observadas nesses períodos para avaliar a ação dos compostos sobre o parasito.

3.8.5. Ensaios antileishmania

Para os experimentos da atividade antileishmania foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis* (MPRO/BR/1972/m1841-LV-79) que estão conservadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCFAr-UNESP com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Graminha.

Os Promastigotas foram cultivados em meio LIT até a fase logarítmica tardia de crescimento para os bioensaios de atividade leishmanicida a 28°C com repiques semanais para a manutenção da cultura. Formas promastigotas de *L. amazonensis* no final da fase exponencial do crescimento foram plaqueadas à razão de 1×10^7 parasitos $m.L^{-1}$ em placas de 96 poços e testes realizados com os peptídeos RP1 e o Fc-RP1 as quais foram adicionados à suspensão de parasitos, a uma concentração final entre 100,00-1,56 $\mu g m.L^{-1}$. As placas permaneceram incubadas a 28°C por 72 h.

Após esse período, adicionou-se 10 μL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5-difenil tetrazólio) / PMS (metossulfato de fenazina) e realizou-se nova incubação por 75 min. Adicionou-se SDS 10%/HCl 1M para solubilizar os cristais de formazana, e após 30 min de incubação realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 490 nm (leitor de Elisa – Readwell Touch/robonik). A porcentagem de parasitos mortos foi expressa em porcentagem de citotoxicidade (%C).

3.8.6. Testes de citotoxicidade

Foram realizados testes de citotoxicidade com linhagens celulares HacaT (a fim de avaliar potencial do medicamento com uso utópico), U87 (um dos focos de infecção de *C.neoformans*) e HepG2. As linhagens HaCaT e U87 cresceram em meio DMEN e a HepG2 foi cultivada em meio RPMI 1640, ambos os meios foram suplementados com soro bovino fetal e continham o antibiótico ampicilina.

O protocolo do experimento foi baseado no procedimento da Thermo Fisher Scientific com AlamarBlue, este funciona como um indicador de saúde celular usando o poder de redução de células vivas para medir quantitativamente a proliferação de várias linhagens de células humanas e animais, bactérias, plantas e fungos, permitindo estabelecer a citotoxicidade relativa de agentes dentro de várias classes químicas.

As células foram inoculadas em garrafas de cultivo para permitir que as células aderissem e cresceram durante aproximadamente 24 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após isso, a cultura foi lavada com PBS e SDS para posterior contagem em câmara de Neubauer e a concentração ajustada a 5×10^4 células. mL^{-1} . As placas foram então inoculadas com 100 μL de inóculo, crescendo por mais 24 h para posterior adição dos peptídeos.

Os peptídeos foram diluídos em meio de cultura partindo de uma concentração estoque de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foram realizadas diluições a partir de uma concentração inicial de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até a concentração final de $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a adição dos compostos, depois das 24 h de crescimento das células, o meio de cultura foi retirado e um novo meio com os peptídeos foi adicionado e as linhagens cresceram a 37°C por 24 h. A placa do experimento foi montada conforme a figura 7. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica com duplicata de cada concentração de peptídeo utilizada.

Figura 7: Esquema da placa do experimento de citotoxicidade

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|-----------------|-------------------------|---|---|----|----|------------------------------|
| A | Peptídeo RP1- Concentrações de 500-0,48 $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | | | | | | Controle células Vivas |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | Peptídeo Fc-RP1 Concentrações de 500-0,48 $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | Ferroceno Ácido Carboxílico- Concentrações de 500-0,48 $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | Controle Células Vivas | | | | | Meio de cultura | | | | | | |
| H | Meio de cultura | | | | | | Controle células Mortas | | | | | |

Após 24 h de incubação das linhagens celulares com os compostos, foi adicionado o reagente alamarBlue®.

Quando as células estão vivas, elas mantêm um ambiente de redução dentro do citosol da célula. A resazurina, o ingrediente ativo do reagente alamarBlue®, é um composto não tóxico e permeável às células que é de cor azul e praticamente não fluorescente. Ao entrar em células, a resazurina é reduzida a resorufin, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente, aumentando a fluorescência geral e a cor dos meios que circundam as células.

O reagente alamarBlue® foi adicionado diretamente a cada poço, as placas foram incubadas a 37°C por 4 h para permitir que as células convertam a resazurina em resorufin. Nos experimentos de citotoxicidade realizados foi medida da emissão do alamarBlue® a 570 nm, usando 600 nm como um comprimento de onda de referência (normalizado para o valor de 600 nm) e a partir de disso foi calculado a porcentagem de

sobrevivência das células perante os compostos testados a fim de averiguar a toxicidade destes.

Também foram realizados ensaios de hemólise para verificar o potencial citotóxico frente a hemácias de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo usadas as mesmas concentrações do ensaio de MIC frente as mesmas. Resumidamente, as hemácias foram coletadas com heparina sódica da veia calda de tilápias do nilo e o plasma separado por centrifugação 350 g por 10 min à 28°C e a suspensão de hemácias lavada e ressuspendidas em PBS 0,15 M pH 7.2, na concentração de 4%. Os peptídeos previamente preparados nas concentrações desejadas foram incubados em igual volume de papa de hemácias a 4 % e a reação incubada por duas horas sobre agitação na temperatura de 28°C. Como controle positivo foi utilizada uma solução de Triton X-100 1% para obter o 100% de hemólise. O controle negativo foi realizado usando apenas PBS 0,15 M pH 7,2 e o nível de citotoxicidade foi mensurado pelo grau de hemólise na amostra (D.O 560nm).

4. Resultados e discussão

4.1. Síntese dos peptídeos

O peptídeo RP1 de sequência ALYKKFKKKLLKSLKRLG foi obtido através da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida. Partindo-se de uma massa inicial de resina 638 mg, obteve-se ao final da síntese 1086 mg de massa de resina, havendo um ganho de massa de 448 mg com um rendimento de síntese em massa de 68%. Para o acoplamento da molécula de ferroceno ao peptídeo RP1, um teste inicial foi realizado com escala 0,01 mmol (103 mg) da resina e com 5x de excesso de ferroceno e de agentes acoplantes (HCTU/DIPEA). A resina estava previamente desprotegida e 34,50 mg de ferroceno ácido carboxílico foi colocado para acoplar. Após 2 h de acoplamento, uma alíquota foi submetida ao teste de ninidrina, o resultado foi positivo, indicando que ainda havia aminas primárias livres, ou seja, nem todo o ferroceno havia sido acoplado. A partir disso, foi realizado um reacoplamento com aumento do excesso do ferroceno para 10x. O teste de ninidrina foi repetido após 2 h, e o resultado foi negativo, indicando que todos os grupos aminos disponíveis haviam reagido com o ferroceno. Ao final dessa primeira síntese obteve-se uma massa de 117 mg e rendimento de 57%.

O restante da peptidil-resina também foi utilizada para obtenção de mais material, e para isso foi usada uma escala de 0,045 mmol (150 mg) de resina e 10x de excesso. No final do processo de síntese foi obtido 233,80 mg com ganho de massa de 83,8 mg.

Para obtenção de mais material, foi sintetizado novamente o peptídeo RP1 para posterior acoplamento da molécula de ferroceno, como descrito anteriormente. Ao final dessa síntese obteve-se 1,7 g de massa de peptidil-resina, no qual para o acoplamento do ferroceno a escala foi aumentada para 0,1 mmol (572 mg) de resina. Após 2 h de acoplamento, o teste de ninidrina mostrou resultado positivo, indicando que havia grupamentos amins livre na peptidil-resina. Para solucionar esse problema foi realizado o reacoplamento do ferroceno nas mesmas condições descritas acima, e ao final do acoplamento o teste de ninidrina foi negativo, indicando o acoplamento efetivo da molécula de ferroceno. Ao final da síntese foi obtido 640 mg de Fc-RP1 com ganho de massa de 67,34 mg, o que equivale a um rendimento 74%.

A incorporação da molécula de ferroceno ao peptídeo mostrou-se difícil, no entanto, facilmente contornada por meio de reacoplamentos (Miklán *et al.*, 2007). Os

dados dos rendimentos de síntese dos peptídeos abordados neste trabalho, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Dados da síntese dos peptídeos RP1 e Fc-RP1

| Peptidil-Resina | Ganho de Massa (mg) | Ganho de massa Teórico (mg) | Rendimento (%) |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 1086 | 1609 | 68 |
| Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 117 | 207 | 57 |
| 2ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 234 | 305 | 77 |
| 3ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 640 | 918 | 75 |

Após as sínteses os materiais foram clivados com uma solução contendo TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5). As massas de peptídeo bruto obtidas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Rendimentos da clivagem dos peptídeos RP1 e Fc-RP1

| Peptidil-Resina | Massa de peptídeo bruto (mg) | Massa de Peptídeo bruto teórico (mg) | Rendimento de Clivagem (%) |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 245 | 324 | 75,5 |
| Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 35,1 | 71 | 49,3 |
| 2ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 95,6 | 107 | 89,5 |
| 3ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 115,6 | 237 | 48,7 |

A massa molar dos peptídeos sintetizados foi avaliada por espectrometria de massas, o que confirmou a obtenção dos materiais desejados: 2.162 g.mol⁻¹ (RP1) e 2.374 g.mol⁻¹ (Fc-RP1) (figura 8 e 9).

Figura 8: Espectro de massas referente ao peptídeo ALYKKFKKKLLKSLKRLG-COOH - massa molar de 2.162 g mol^{-1} .

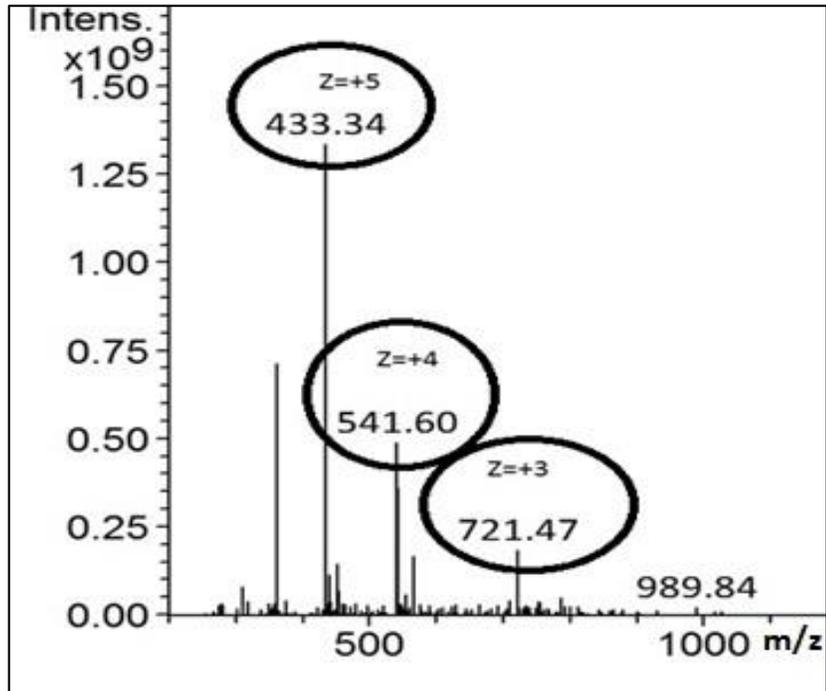
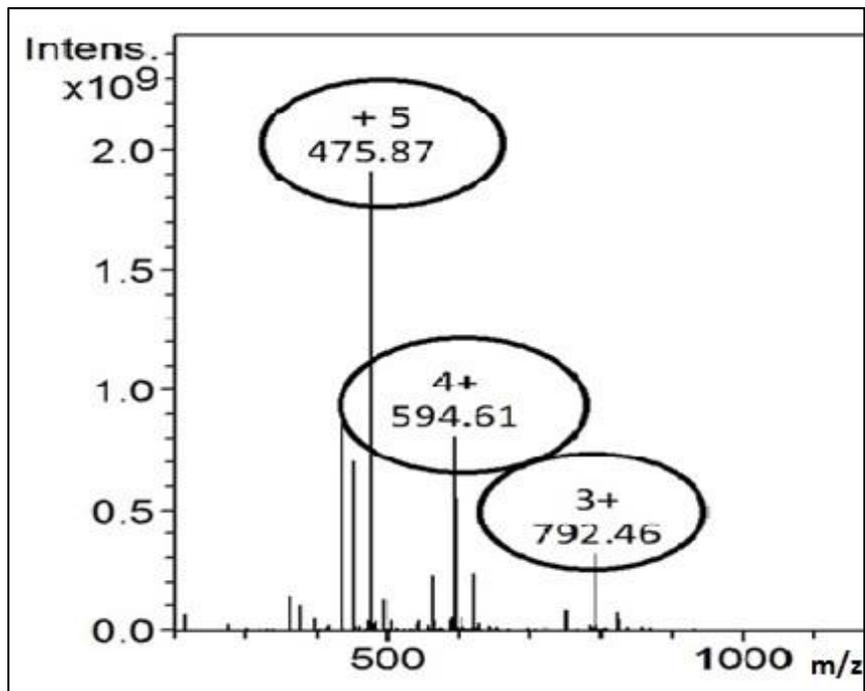


Figura 9: Espectro de massas referente ao peptídeo Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG-COOH - massa molar de 2.374 g mol^{-1} .



O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos foi obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL/min. O peptídeo RP1 apresentou tempo de retenção de 10,45 min como pode ser visto na figura 10, já o peptídeo Fc-RP1 apresentou um tempo de retenção de 14,0 min como o apresentado na figura 11. Podemos observar no cromatograma do peptídeo com ferroceno a presença de peptídeo sem ferroceno, comprovando a dificuldade de acoplamento desse observada pelo teste de ninidrina.

Figura 10: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto RP1, com tempo retenção de 10,45 minutos.

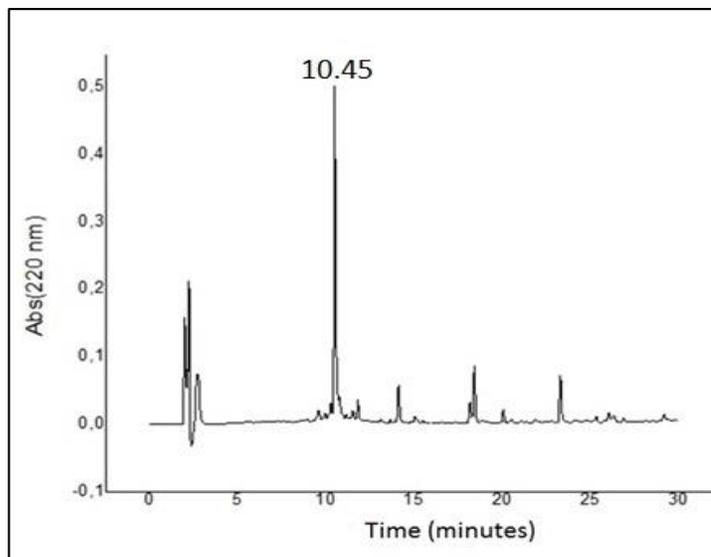
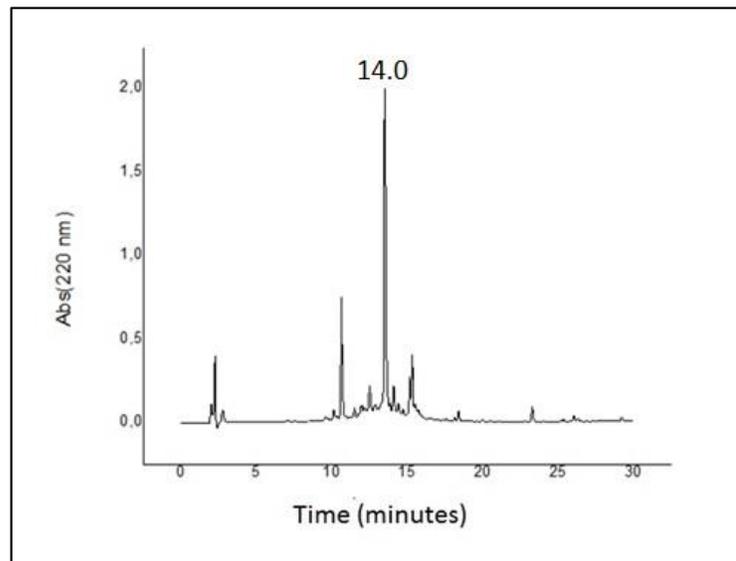


Figura 11: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Fc-RP1, com tempo retenção de 14 minutos.



O peptídeo RP1 foi purificado em um sistema CLAE semi-preparativo. As frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema CLAE analítico e as contendo o peptídeo puro foram juntadas. Foram realizadas duas purificações para obtenção do material puro, sendo obtidos 33 mg do peptídeo de interesse, com uma pureza de 93% (Tabela 3). O perfil cromatográfico do peptídeo puro pode ser visto na figura 12.

Figura 12: Perfil cromatográfico do peptídeo RP1 puro, com pureza de 93%.

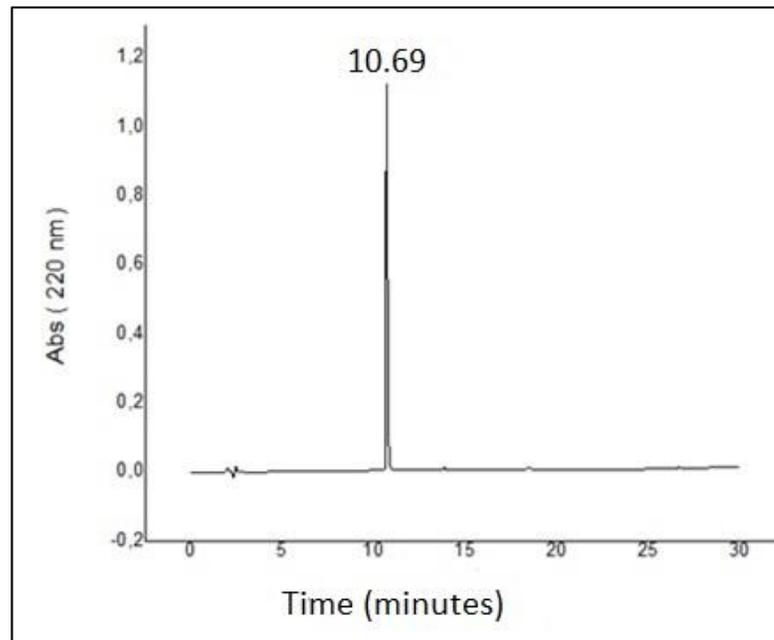


Tabela 3: Condições de purificação do peptídeo RP1 e quantidade de material puro.

| Peptídeo | Gradiente de purificação | | Frações Puras (mg) | Pureza (%) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|------------|
| | HPLC semi-preparativo | HPLC Analítico | | |
| ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 10-40% solvente B em 90 min | 5-35 % de solvente B em 15 min | 33,5 | 93% |

A purificação do peptídeo Fc-RP1 também foi realizada em sistema CLAE semi-preparativo. As condições utilizadas nas purificações e as massas injetadas e obtidas estão na tabela 4. A pureza final do material obtido foi verificada em CLAE analítico. Para

a separação dos tubos puros utilizou-se o programa 25-45 % em 15 min em sistema CLAE analítico.

Foram realizadas três purificações para a obtenção da massa necessária para os demais experimentos. Durante esse processo foi levantado a hipótese que o meio ácido estaria afetando a estabilidade do peptídeo, o que poderia acarretar a sua degradação. Alguns estudos já haviam demonstrado que o anel do grupo ferroceno poderia ser degradado em meio ácido. Para evitar que isto ocorresse, foi limitado o contato com o TFA, portanto o material puro foi rapidamente liofilizado após a purificação para não permanecer em solução. Os cromatogramas dos materiais obtidos se encontram na figura 13.

Figura 13: Cromatogramas das frações puras do peptídeo Fc-RP1, mostrando as três purificações realizadas.

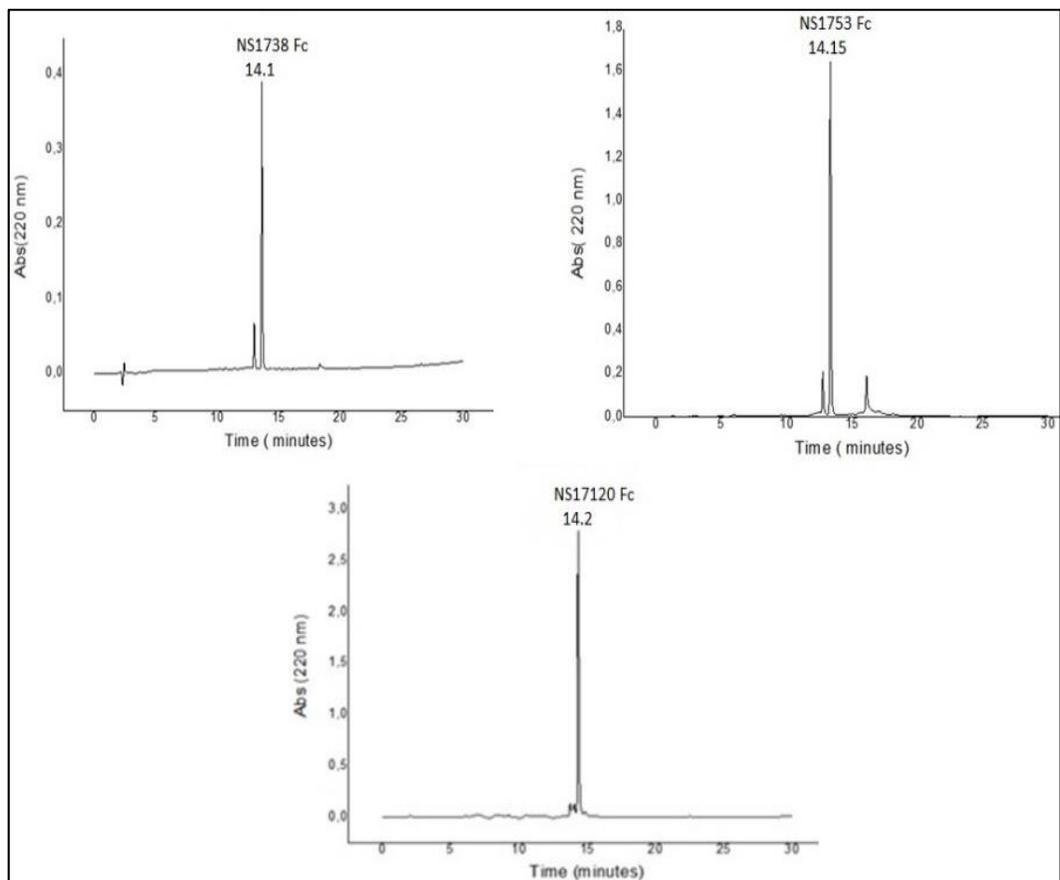


Tabela 4: Condições utilizadas no processo de purificação do peptídeo Fc-RP1 e massas de frações puras obtidas.

| Peptídeo | HPLC semi-preparativo | HPLC analítico | Frações Puras (mg) | Pureza (%) |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------|------------|
| Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 15-45% solvente B em 90 min | 25-45 % de solvente B em 15 min | 6,0 | 82 |
| 2ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 15-45% solvente B em 90 min | 25-45 % de solvente B em 15 min | 4,7 | 77 |
| 3ª síntese: Fc-ALYKKFKKKLLKSLKRLG | 15-45% solvente B em 90 min | 25-45 % de solvente B em 15 min | 18,1 | 91 |

4.2. Teste de estabilidade

Devido ao baixo rendimento de síntese, clivagem e purificação do composto Fc-RP1, resolvemos avaliar se este peptídeo estava apresentando algum tipo de degradação. Desta forma, os peptídeos RP1 e Fc-RP1 e a molécula de ferroceno ácido carboxílico foram incubados em tampão PBS e solvente A (Água contendo 0,045% de TFA - ácido trifluoracético), este último um meio ácido. Durante este estudo, alíquotas de 50 µL foram injetadas em sistema CLAE analítico, programa 5-95% solvente B em 30 min, para avaliar, de acordo com as áreas dos picos no sistema CLAE, a porcentagem de degradação desse peptídeo (figura 14). O tempo 0 foi nosso controle negativo. Em PBS, nos tempos 6, 8, 12 e 24 h foi comprovado que o peptídeo RP1 era estável, já que não houve uma diminuição muito grande das áreas dos picos ao longo dos intervalos experimentais. O peptídeo RP1 quando testado em meio ácido mostrou um comportamento ao longo do tempo, semelhante ao encontrado para o tampão PBS.

A molécula Fc-RP1, em PBS, se mostrou estável, evidenciando que essa não se degrada em solução de pH 7,4. No solvente A, a molécula sofreu degradação dependente do tempo, quanto maior o tempo de incubação maior foi a degradação do peptídeo. Em 24 h de incubação a porcentagem de peptídeo era de apenas 2% mostrando que essa molécula é instável em meio ácido, o que poderia explicar a dificuldade de obtenção do material puro.

A degradação em meio ácido também foi observada para o composto ferroceno ácido carboxílico. Em meio neutro esse composto se manteve estável. No entanto, sua degradação na solução de PBS foi maior do que as moléculas de peptídeos. Já em solução A, a molécula de ferroceno foi altamente instável, sendo facilmente degradada, chegando ao final de 24 horas com uma baixa quantidade de material inicial e semelhante ao encontrada para o peptídeo contendo esta molécula.

Com base nesses resultados conclui-se que o ferroceno acoplado a molécula RP1 é o responsável pela instabilidade da molécula em meio ácido. Estudos mostram que o anel aromático do ferroceno é instável e pode ser degradado em meio ácido (Miklán *et al.*, 2011). Portanto, para evitar que o peptídeo Fc-RP1 sofresse degradação em meio ácido foram traçadas novas rotas para a manipulação dessa molécula: durante o processo de clivagem o peptídeo foi rapidamente extraído e liofilizado, além disso, na purificação o peptídeo foi protegido da exposição à luz, e rapidamente as frações puras foram separadas e congeladas a fim de evitar a sua degradação.

Os experimentos para avaliação da degradação foram realizados em duplicata (figura 14).

4.3. Espectro de absorção em luz UV

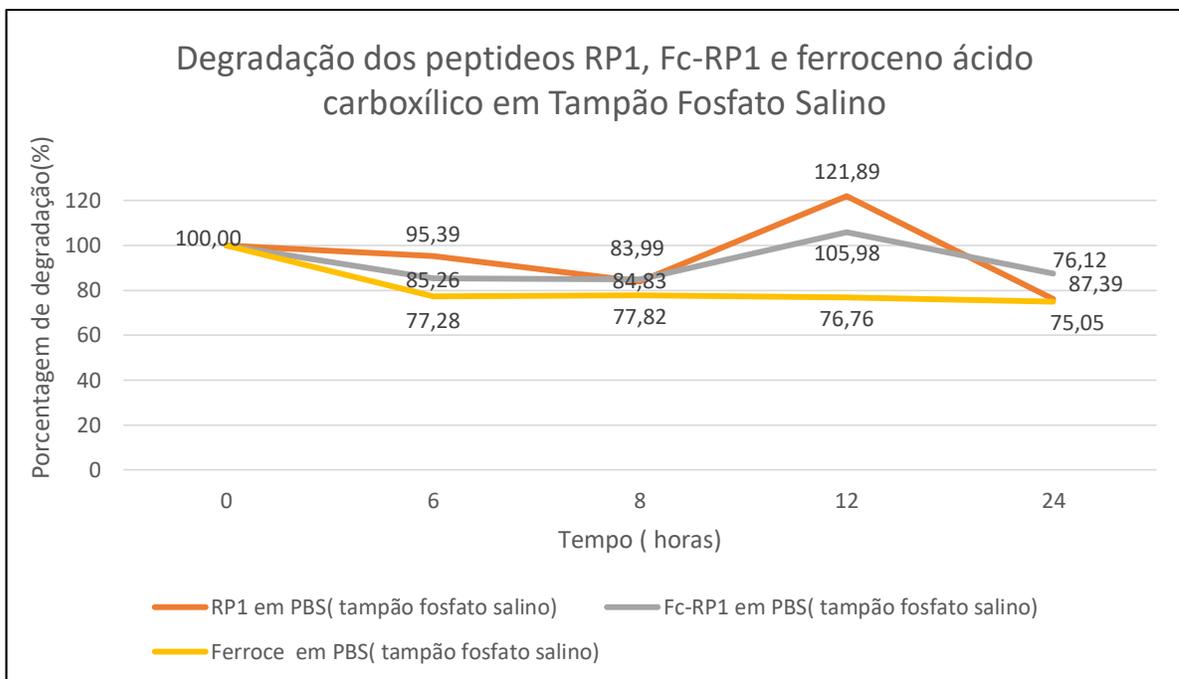
O espectro de absorção e a eficiência da absorção de uma molécula dependem tanto da estrutura quanto do meio em que se encontram. Alguns aminoácidos absorvem luz na região ultravioleta do espectro, sendo esses o triptofano, a tirosina e em menor extensão, a fenilalanina.

Para os ensaios biológicos e estruturais que foram realizados, foi necessário que os compostos fossem quantificados e isto foi feito a partir do método de absorbância de UV. A fim de descobrir qual o espectro de absorção do peptídeo Fc-RP1 e da molécula de ferroceno, foram feitas leituras na faixa de onda de 200-400 nm, na concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para o peptídeo RP1 foi usado o comprimento de onda de absorção de 280 nm, devido a presença do aminoácido tirosina em sua sequência.

O peptídeo Fc-RP1 e a molécula de ferroceno ácido carboxílico mostraram maior absorção em 260 nm como pode ser visualizado na figura 15.

Figura 14: Gráficos representando o perfil de degradação dos compostos RP1, Fc-RP1 e Ferroceno Ácido carboxílico, nos intervalos de 0, 6, 8, 12 e 24 h.

a) Em tampão PBS



b) Em Solução A

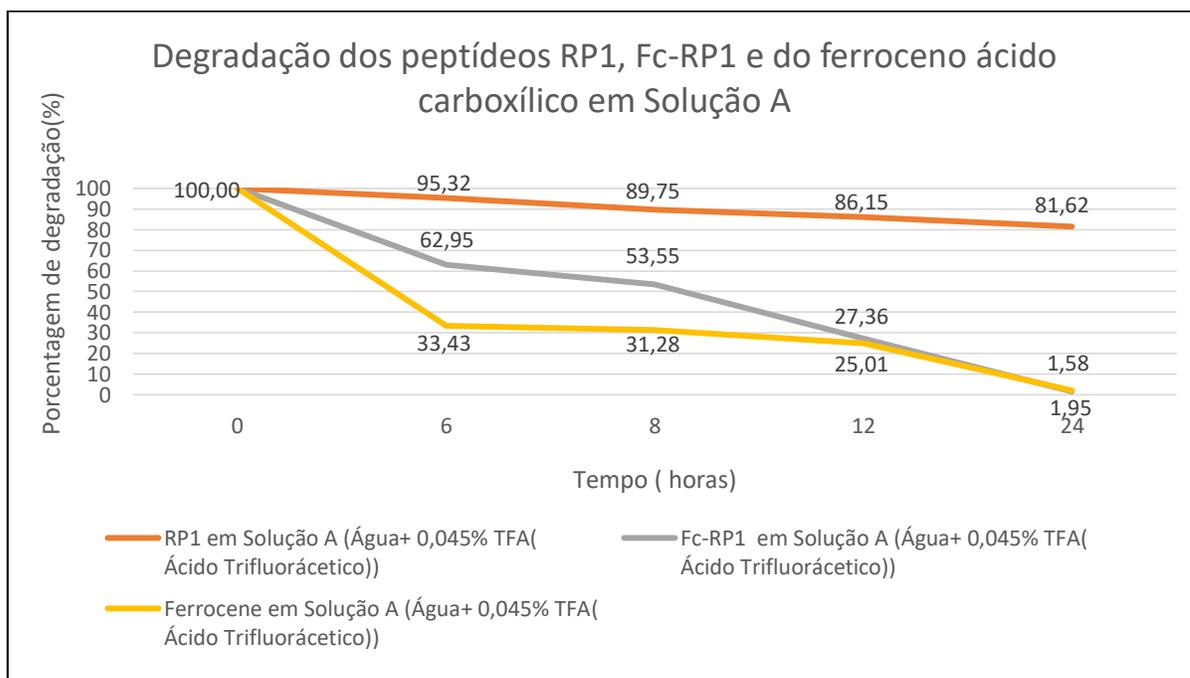
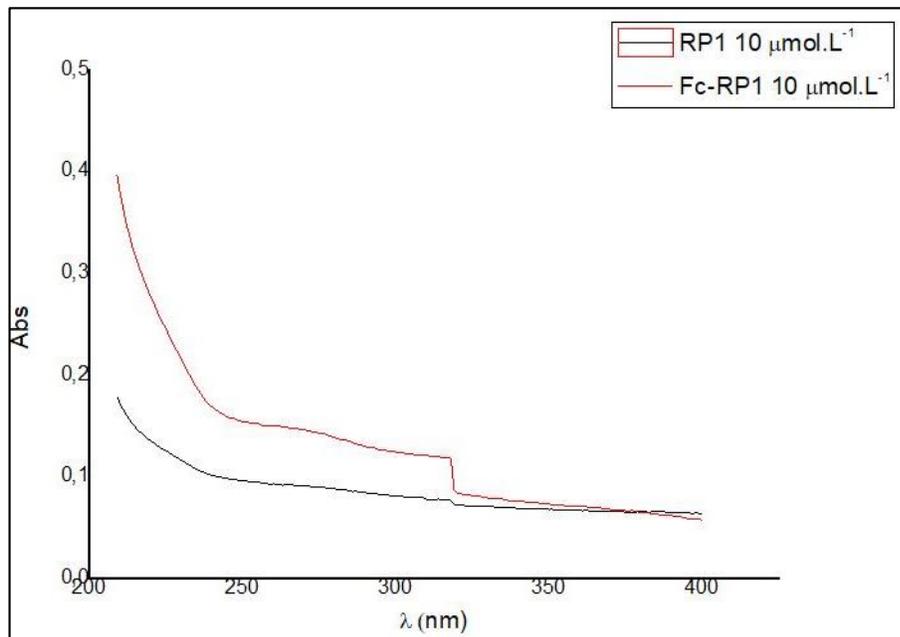
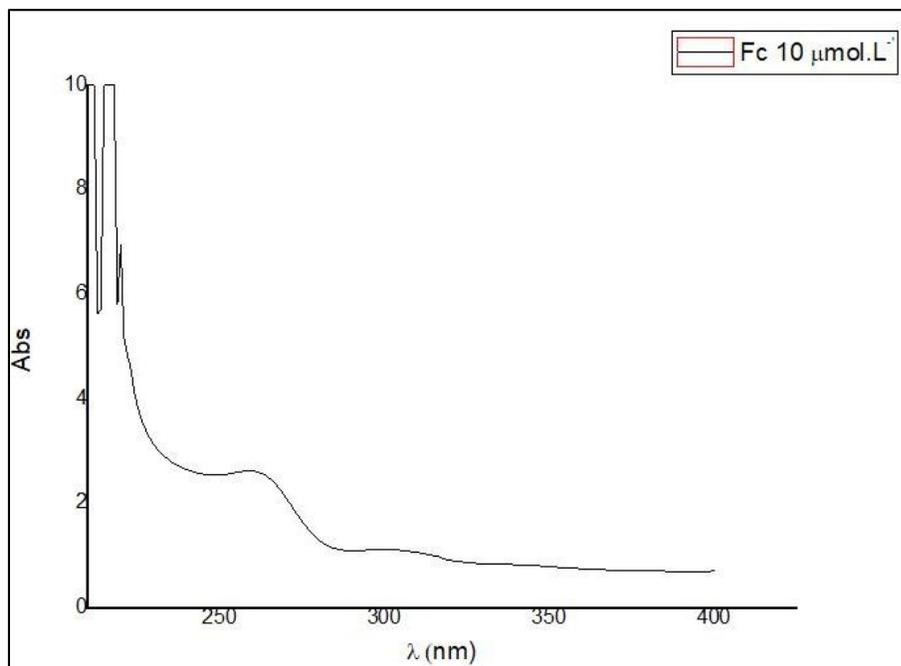


Figura 15: Espectros de absorção em luz UV dos compostos RP1, Fc-RP1 e Ferroceno ácido carboxílico.

a-) RP1 e Fc-RP1



b-) Ferroceno Ácido carboxílico



4.4. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica para determinação estrutural de biomoléculas. Por essa técnica é possível obter informações sobre a estrutura secundária de macromoléculas como proteínas, peptídeos, e ácidos nucleicos. Essas moléculas têm em sua composição muitos centros quirais que são unidades opticamente ativas que interagem com a luz incidente circularmente polarizada e alteram sua polarização (Avitabile *et al.*, 2014).

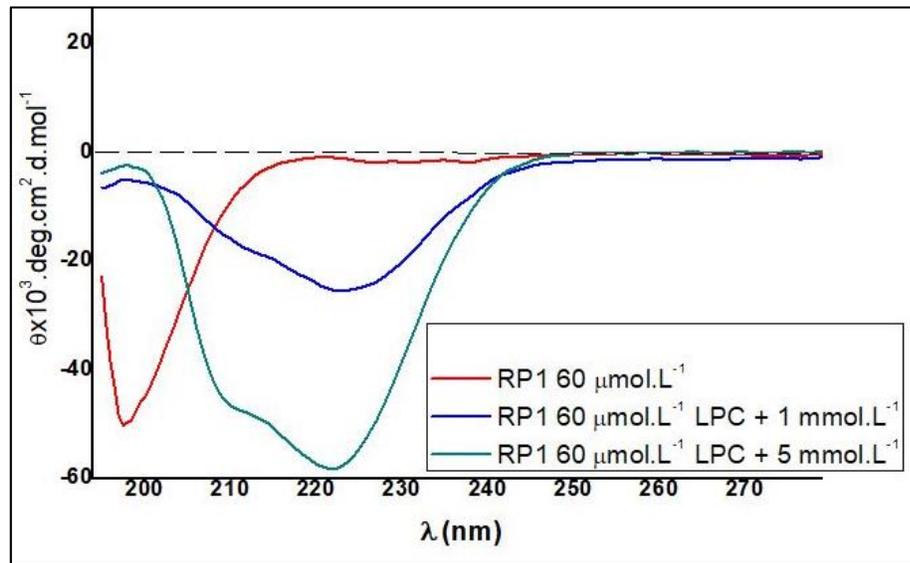
Para avaliar o efeito da adição do ferroceno na estrutura secundária do peptídeo utilizou-se a técnica de CD, na qual os peptídeos foram testados em solução tampão PBS e micelas de LPC (lisofosfatidilcolina). O LPC é um surfactante, que apresenta uma única cadeia de hidrocarbonetos, que podem se organizar na forma de micelas, que são estruturas esféricas compostas por grupos lipofílicos orientados para o interior da estrutura e grupos hidrofílicos para o exterior, mimetizando o ambiente existente em membranas. As soluções de peptídeos com concentração de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ tiveram sua estrutura avaliada em concentrações de LPC de 1 e 5 mmol.L^{-1} (Figura 15).

Os ensaios em PBS mostraram que os peptídeos RP1 e Fc-RP1 exibem um espectro típico de estruturas desordenadas. Na presença de micelas, ambas as moléculas apresentaram alta incidência de estrutura α -helicoidal. Este mesmo comportamento é encontrado em outros peptídeos antimicrobianos (Lorenzón *et al.*, 2013). No entanto, diferenças podem ser observadas entre os dois peptídeos. O peptídeo RP1 na concentração de 1 mmol.L^{-1} de LPC apresenta um espectro contendo mistura de estruturas, mas ainda com baixo teor de estruturas secundárias. Este fato pode ser atribuído provavelmente a ausência de micelas nesta concentração, talvez a CMC (concentração micelar crítica) ainda não tenha sido atingida. Mesmo em concentração acima da CMC, este peptídeo mostrou uma mistura de conformações, no entanto é possível verificar, que a alfa-hélice é a predominante. A ausência do pico positivo ao redor de 190, típico de α -hélice é um dos pontos que corrobora esta colocação.

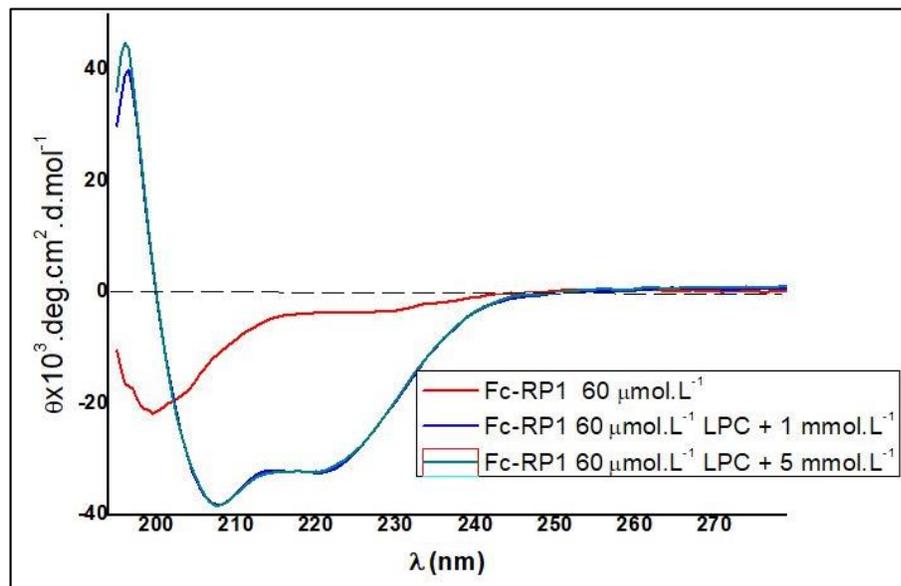
O acoplamento de ferroceno diminuiu a agregação do peptídeo e apresentou uma estrutura α -helicoidal muito bem definida, com as características bandas negativas em 208 e 222 nm e a positiva em torno de 195 nm. Também foi possível verificar a diminuição da agregação das cadeias peptídicas, que é observada comparando a intensidade dos

picos em 222 nm e 208 nm. Quando a razão $\theta_{222}/\theta_{208}$ é maior que 1, como a encontrada para o peptídeo RP1, a estrutura obtida é a denominada “coiled-coil”, isso é, duas α -hélices interagindo entre si, evidenciando agregação das cadeias peptídicas (Bromley e Channon, 2011; Vicente *et al.*, 2015). No peptídeo Fc-RP1, a banda em 208 nm possui intensidade maior que em 222 nm, indicando a ausência de agregação.

Figura 16: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em LPC.
a-) RP1



b-) Fc-RP1

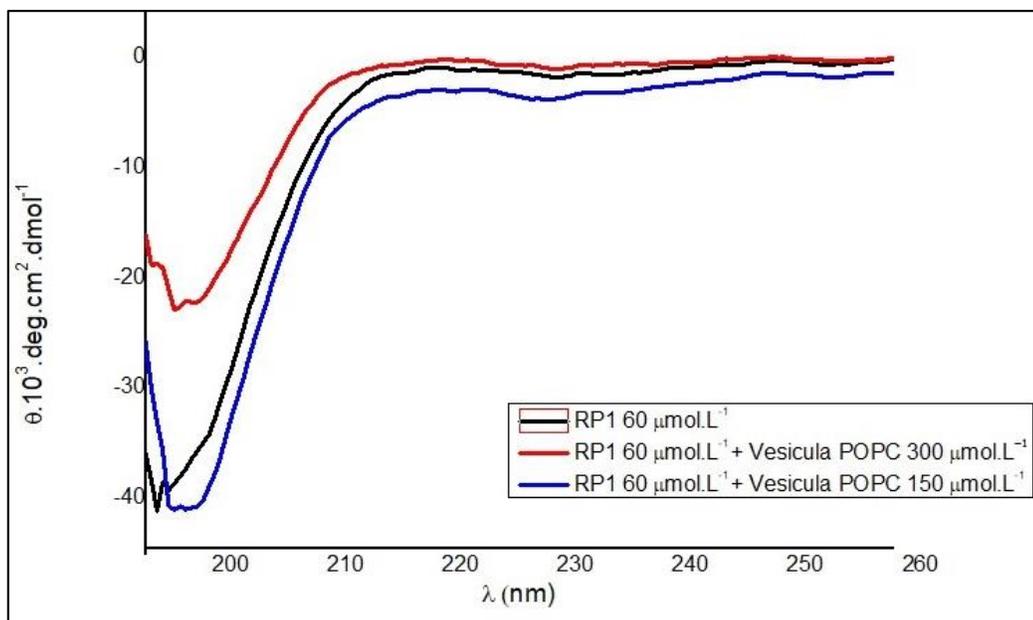


Tendo em vista que a maioria dos peptídeos antimicrobianos tem como principal alvo as membranas dos microrganismos e com intuito de esclarecer o mecanismo de ação dessas moléculas, os experimentos de dicroísmo circular também foram realizados em vesículas unilamelares a fim de mimetizar de forma mais fidedigna a membrana celular dos microrganismos. As vesículas ou lipossomos, se organizam em uma ou mais bicamadas lipídicas, com interior aquoso. Tais estruturas são semelhantes às membranas naturais, porém mais simplificada, pois não apresentam os demais componentes existentes na membrana, tais como as proteínas (Samad *et al.*, 2007; Pattni *et al.*, 2015)

Para isto foram usadas vesículas de POPC (lipídeos constituídos de íons dipolares – sem carga efetiva) representando a membrana celular de células eucarióticas humanas e POPC:POPS (9:1; m:m) mimetizando a membrana celular fúngica e parasitária, com a presença de fosfolipídios de carga negativa (Gow *et al.*, 2017; Pech-Canul *et al.*, 2017). Nos dois tipos de vesículas utilizadas, os peptídeos não apresentaram uma estrutura secundária definida (figuras 17 e 18), diferenciando-se do resultado apresentado com o LPC, dos quais ambas as moléculas conseguiram se estruturar em alfa hélice. Os resultados obtidos podem ser atribuídos a maior compactação das vesículas, o que dificulta a interação inicial com os peptídeos.

Figura 17: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em vesículas unilamelares de POPC.

a) RP1



b) Fc-RP1

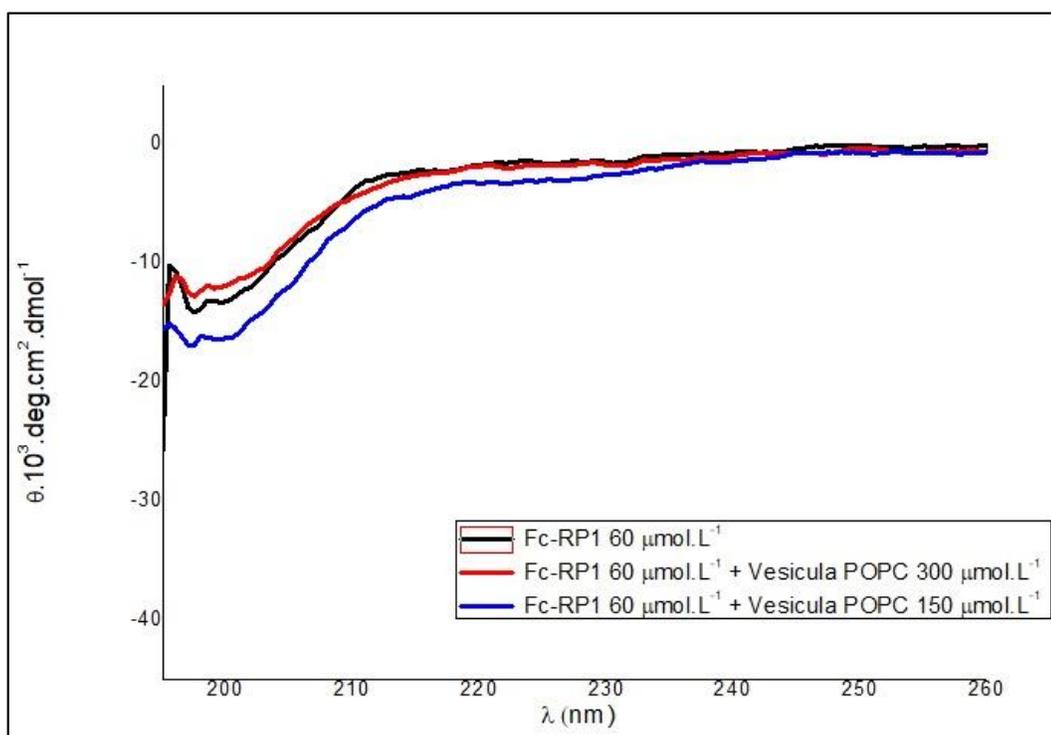
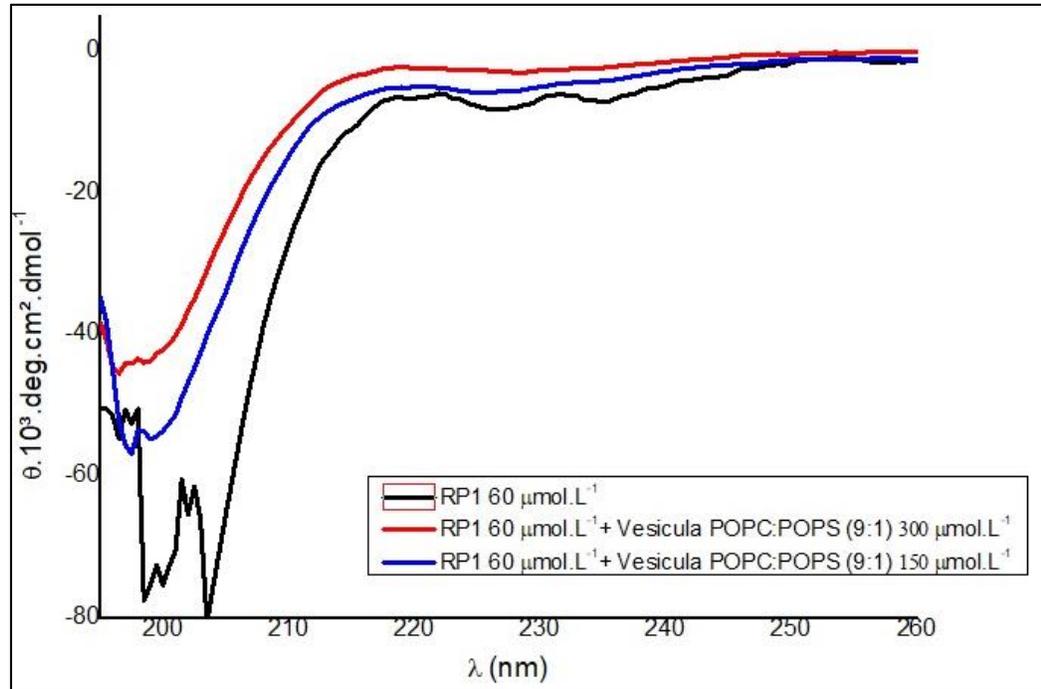
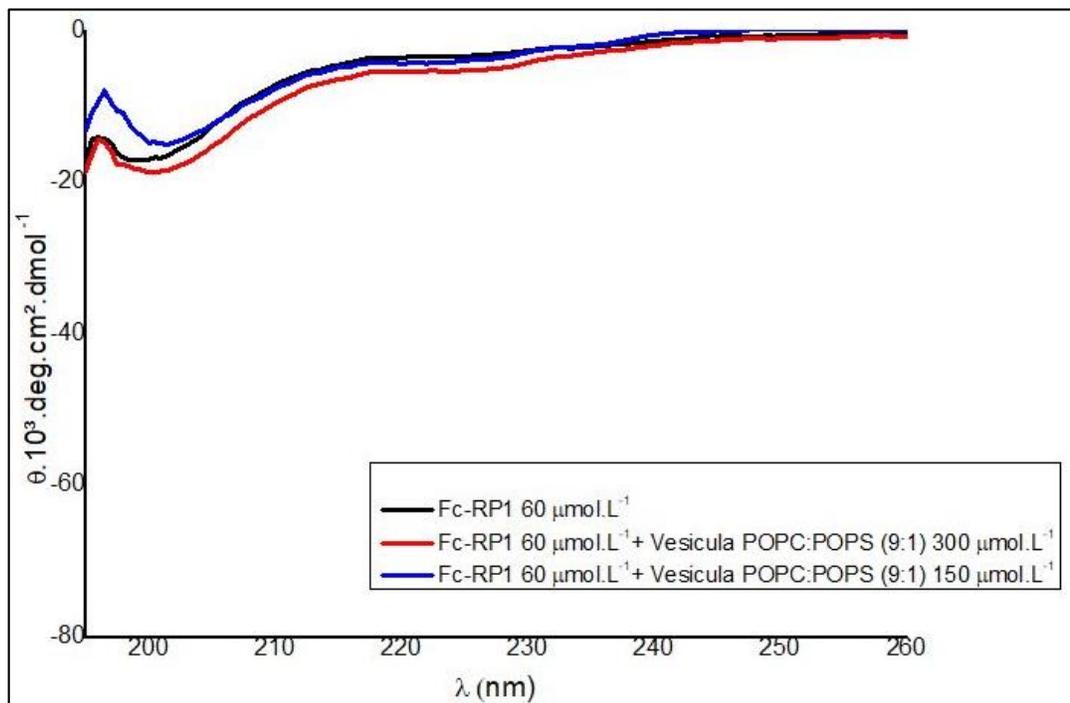


Figura 18: Espectros de CD dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em solução de PBS e em vesículas unilamelares de POPC:POPS (9:1).

a) RP1



b) Fc-RP1



4.5. Permeabilização de vesículas

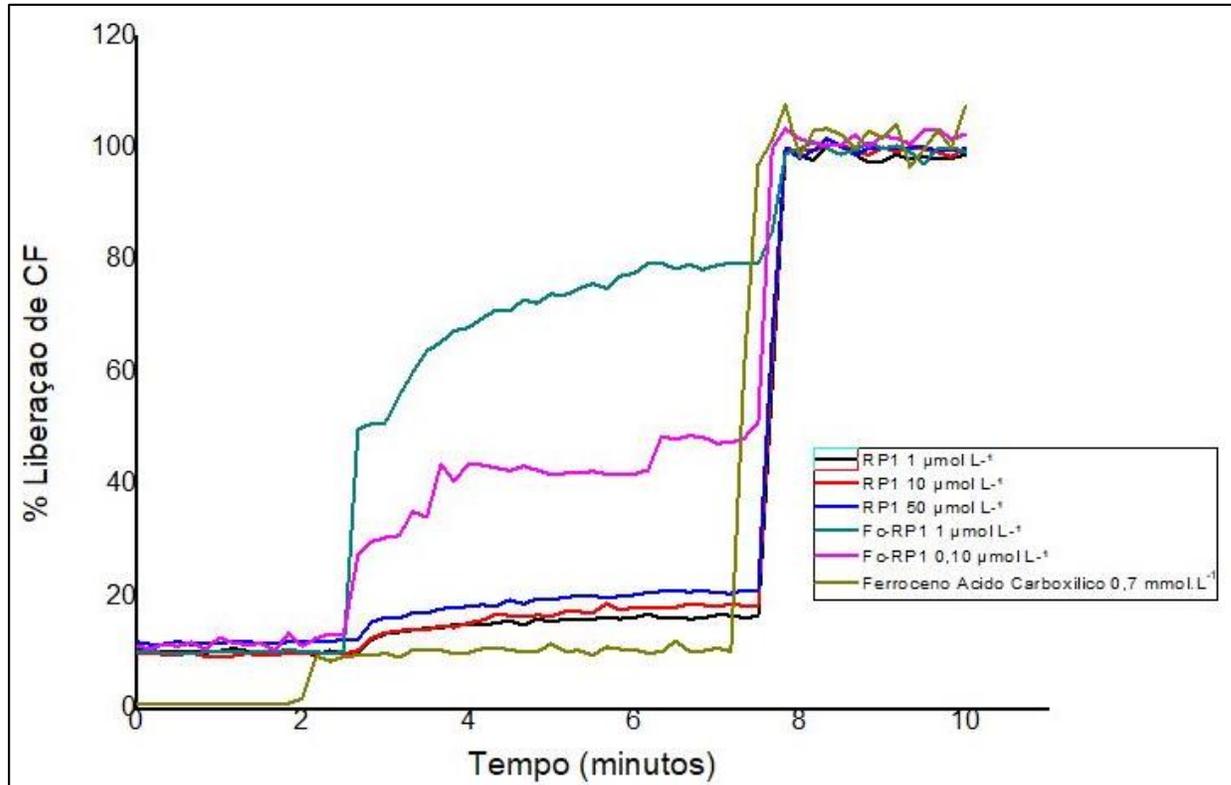
Para entender a ação dos peptídeos sobre a membrana lipídica, e relacionar com o seu mecanismo de ação, foram realizados ensaios com miméticos de membrana para avaliar a ação dos peptídeos na membrana. Neste ensaio foram utilizadas novamente vesículas de POPC e POPC:POPS (9:1), nesse experimento contendo em seu interior carboxifluoresceína (CF).

Os dados da liberação de CF podem ser vistos na figura 19. O peptídeo RP1 apresentou porcentagem de liberação de CF pequena até a concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O peptídeo Fc-RP1, em concentrações de 1 e $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, apresentou alto valor de liberação de CF, mostrando que o ferroceno aumenta a capacidade de permeabilização do peptídeo. Os resultados também mostraram uma dependência entre a concentração e a liberação de CF. Estudos indicam que essa dependência está associada com o mecanismo de ação (Russell *et al.*, 2010), sendo relacionada à formação de poros, quanto mais peptídeo – maior a quantidade de poros. No entanto, não conseguimos relacionar esse mecanismo a ausência de estruturação do peptídeo, como visto por CD.

Várias pesquisas mostraram que um dos mecanismos de ação do ferroceno é a desestabilização da membrana celular, além da peroxidação dos lipídios da membrana celular, o que acarreta lise celular (Santos *et al.*, 2017). Neste caso, a presença do ferroceno pode estar causando um efeito aditivo na ação sobre a membrana. Para comprovar que é a molécula de ferroceno responsável por esse efeito aditivo, foram realizados testes com $0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ferroceno ácido carboxílico, concentração a qual este apresentou baixa capacidade de permeação frente a bicamada da vesícula de POPC. Essa baixa atividade pode ser maximizada pelo acoplamento ao peptídeo, explicando a maior atividade do peptídeo contendo o ferroceno.

Outra explicação, é a possibilidade de a mudança da carga/estrutura da região N-terminal afetar a atividade do peptídeo, como foi observado por (Crusca *et al.*, 2011).

Figura 19: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos RP1 e Fc-RP1 em vesículas de POPC contendo CF em seu interior.

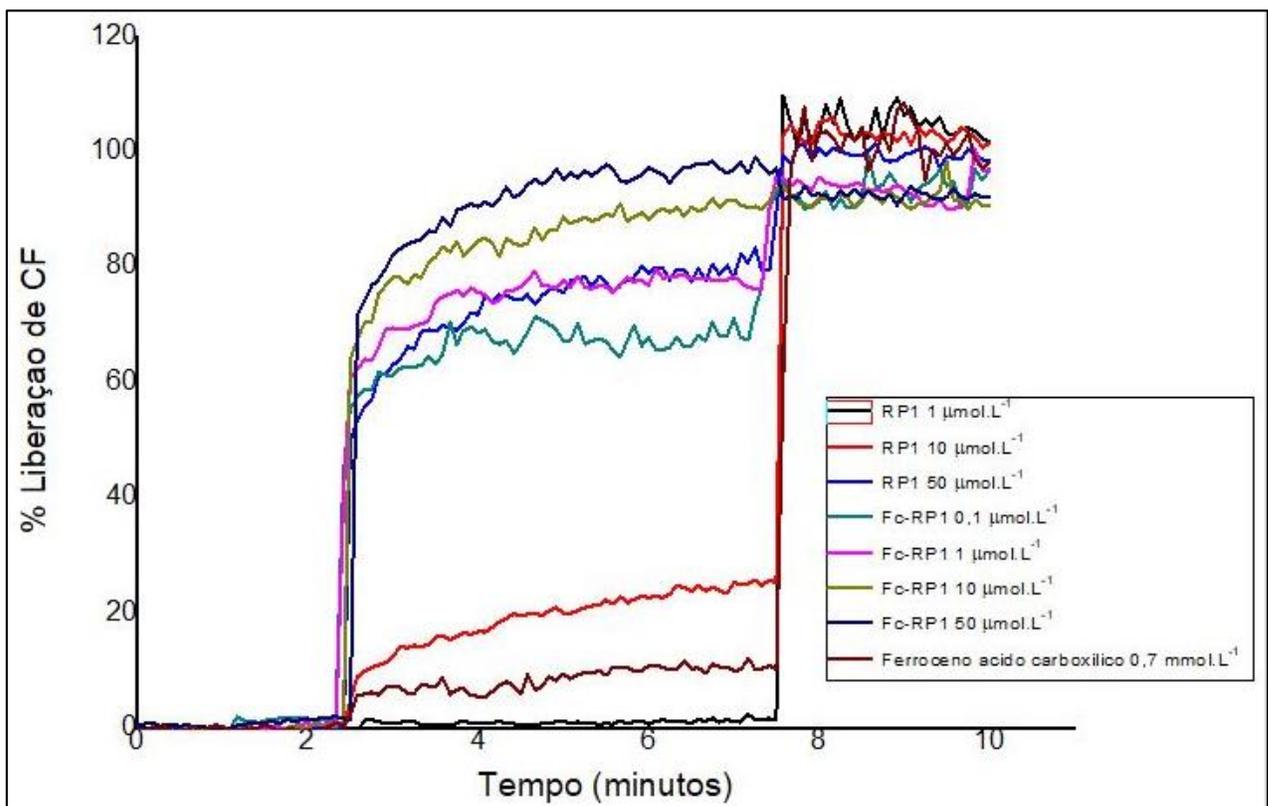


Os ensaios com vesículas de fosfolípidios com carga negativa mostraram que ambos os peptídeos mostraram maior atividade que em vesículas neutras. Esse resultado é o esperado, visto a alta carga positiva dos peptídeos em pH fisiológico (+8). O Fc-RP1 apresentou maior porcentagem de liberação de CF que o peptídeo RP1, chegando praticamente ao valor de 100% de permeabilização (figura 20), comprovando assim o grande potencial do conjugado peptídeo/ferroceno.

De acordo com os resultados, o peptídeo RP1 e o seu conjugado não apresentaram estrutura secundária definida em contato com LUVs, no entanto os experimentos de permeabilização indicam a ação dessas moléculas na membrana celular, essas moléculas devem formar poros ou ainda agregados hidrofóbicos que leva a desestabilização da membrana e consequente dano celular (Li *et al.*, 2017). Além disso o peptídeo pode interferir em algum mecanismo interno da célula, como a síntese de componentes da membrana celular o que também pode levar a sua desestabilização e/ou redução do potencial

de membrana, o que acarretaria em um acúmulo de espécies de oxigênio desencadeando um possível mecanismo de morte celular (Kumar *et al.*, 2018; Marquette e Bechinger, 2018). No entanto, devido a ação em vesículas, acreditamos que a ação direta na membrana seja a mais provável, somada da ação de formação de espécies ativas de oxigênio pelo ferroceno.

Figura 20: Ensaio de permeabilização de vesículas com carboxifluoresceína do peptídeo em vesículas POPC:POPS (9:1)



4.6. Ensaios biológicos

4.6.1. Ensaios antileishmania

Os dados da literatura mostraram que o peptídeo RP1 quando dissolvido em tampão PBS apresentou uma atividade antileishmania (Erfe *et al.*, 2012), no entanto, nossos experimentos (dados não apresentados) não mostraram atividade antiparasitária. Como nossas amostras foram diluídas em DMSO, levantamos a hipótese que este solvente

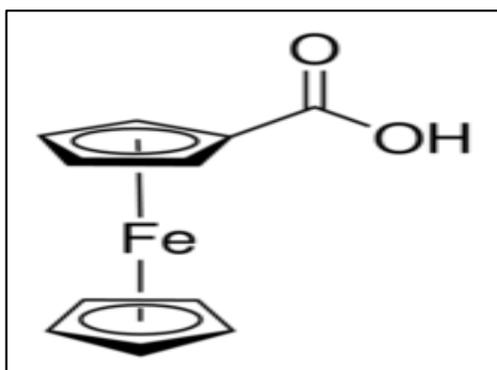
poderia estar interferindo na atividade da molécula, assim como na atividade do ferroceno. No entanto, achamos esta hipótese pouco provável.

Outra hipótese para ausência de atividade do peptídeo contra leishmaniose, é o tipo de *Leishmania* para qual este foi testado anteriormente, os trabalhos (Erfe *et al.*, 2012) foram realizados ensaios com espécies de *Leishmania brasilienses* e *Leishmania major* para os quais o peptídeo RP1 apresentou atividade antileishmania. Já os ensaios deste trabalho foram com a espécie *L. amazonensis*, para o qual o peptídeo RP1 e seu conjugado não apresentaram atividade antiparasitária, por se tratar de uma espécie diferente e uma forma de infecção diferente.

Outra hipótese seria o ferroceno usado, pois dados da literatura mostraram que o grupo ferrocenil de ácidos carboxílicos a base de ferroceno e outro grupo funcional ferrocenil de m-ferroceno ácido benzoico foram conjugados com antimoniais pentavalentes apresentando atividade contra *Leishmania tropica* (Rauf *et al.*, 2016). O ferroceno usado neste trabalho é o ferroceno ácido carboxílico, a qual há um ácido carboxílico (Figura 21), diferenciando este de outros compostos com ação antiparasitária, como por exemplo a ferroquina que é um fármaco derivado da cloroquina, o qual um íon cloro foi substituído pelo anel ferrocenil e esse conjugado tem uma ação antimalárica descrita. Experimentos adicionais são necessários, para entender essa divergências de dados.

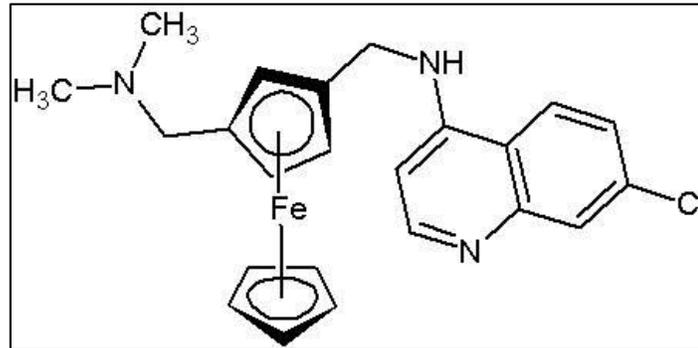
Figura 21: Estrutura do ferroceno ácido carboxílico (a) utilizado nos ensaios antileishmania e o fármaco ferroquina (b).

a) Ferroceno ácido carboxílico.



Fonte: Sigma Adlrch, 2017.

b) Ferroquina



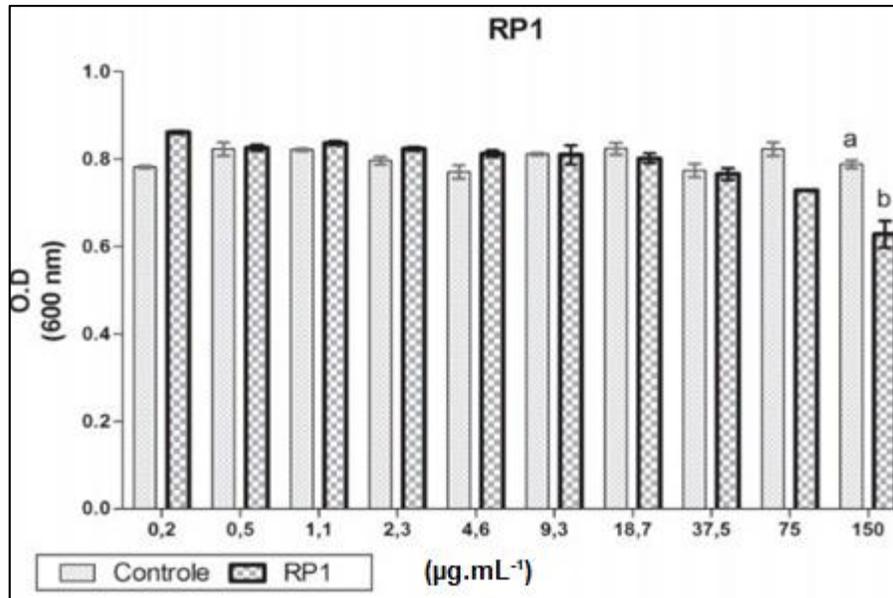
Fonte: Ferroquina JPG. Disponível em <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ferroquina.jpg>>, acesso em Agosto de 2018.

4.6.2. Ensaios antibacterianos

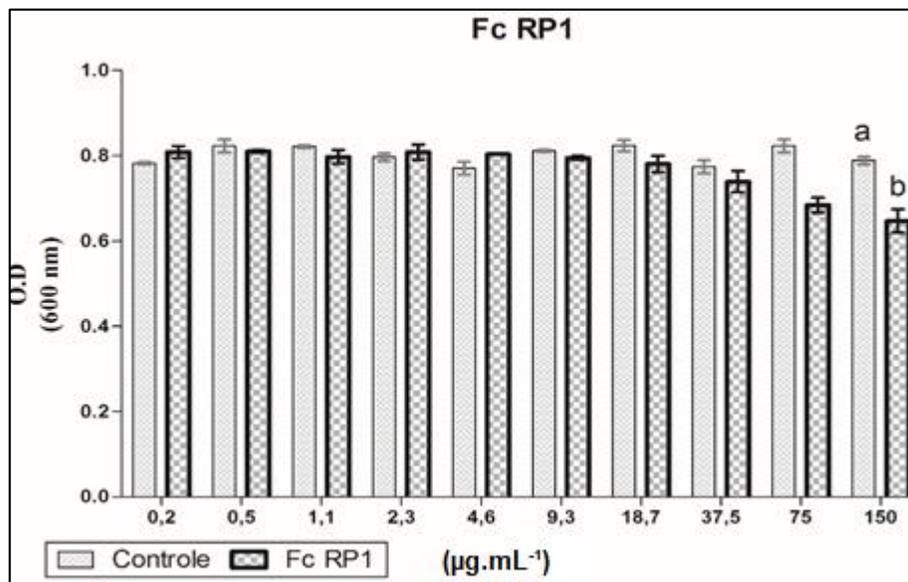
Os ensaios antibacterianos mostraram ação inibitória do peptídeo em uma das duas bactérias avaliadas. Para a *A. hydrophila* gram-negativa não foi observado efeito inibitório dos peptídeos testados (Figura 22), ao contrário da bactéria gram-positiva *S. agalactiae* que mostrou sensibilidade para ambos os peptídeos. Dados da literatura mostraram que o peptídeo Hy-a1 tem ação contra todas as bactérias, no entanto, quando sua extremidade N-terminal foi acetilada ou teve a carga anulada formando um íon dipolar, esse perdeu atividade contra bactérias gram negativas, mantendo a ação em bactérias gram positivas (Crusca *et al.*, 2011). Acreditamos que este mesmo processo possa estar ocorrendo com o peptídeo RP1, onde a adição do ferroceno anula a carga da extremidade N-terminal.

Figura 22: Ensaios antibacterianos com os peptídeos (a) RP1, e (b) FcRP1 em *Aeromonas hydrophila* (gram-negativa). Peptídeos diluídos em água ultrapura e controle positivo (bactéria e caldo Mueller Hinton). Média (n= 3) com respectivo desvio padrão, letras diferentes indicam que os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0.05$).

a) RP1



b) Fc-RP1

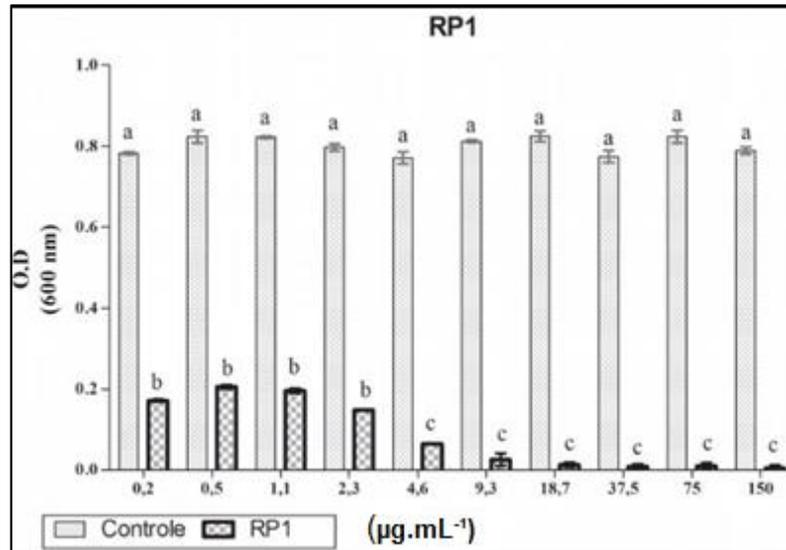


Na bactéria *S. agalactiae*, o peptídeo RP1 apresentou MIC de $9,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($4,52 \mu\text{mol L}^{-1}$), já o seu conjugado apresentou um MIC menor, de $2,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($1,13 \mu\text{mol L}^{-1}$). (Figura 23), mostrando que o acoplamento do ferroceno ao peptídeo potencializou a ação desse peptídeo. Como já mencionado a bactéria *S. agalactiae* é uma gram-positiva que possuem em sua parede celular ácidos teicóico e teichurônico que conferem uma carga negativa a superfície bacteriana fazendo com o peptídeo RP1 e seu conjugado sejam mais específicos para esse organismo devido a sua carga positiva, outro ponto importante é que esses podem interagir com a membrana celular dessa bactéria podendo assim interferir na estabilidade desta e levando a morte celular (Larock e Nizet, 2015).

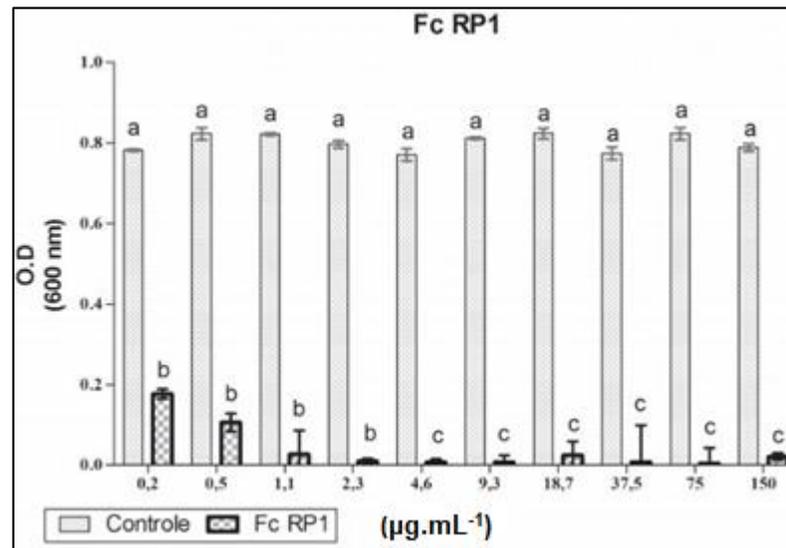
Neste trabalho o ferroceno foi a acoplado a um peptídeo, o que potencializou a sua ação, trabalhos indicam que o ferroceno tem ação sobre a membrana bacteriana, interferindo na sua permeabilidade pela formação de poros, translocação de íons, etc (Saleem *et al.*, 2015). Além disso acredita-se que o tratamento com compostos organometálicos podem diminuir os níveis de ATP celulares, podendo ser resultado da despolarização da membrana, inibição da síntese da ATP ou ainda da cadeia respiratória, levando a um colapso energético e levando a célula bacteriana a morte celular (Lippert *et al.*, 2017). A molécula de ferroceno vem sendo usada em diversas pesquisas para melhorar agentes antimicrobianos como por exemplo penicilinas e cefalosporinas (Lippert *et al.*, 2017).

Figura 23: Ensaios antibacterianos com os peptídeos (a) RP1, e (b) FcRP1 em *S. agalactiae* (gram-positiva). Peptídeos diluídos em água ultrapura e controle positivo (bactéria e caldo Mueller Hinton). Média (n= 3) com respectivo desvio padrão, letras diferentes indicam que os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0.05$).

a) RP1



b) Fc-RP1



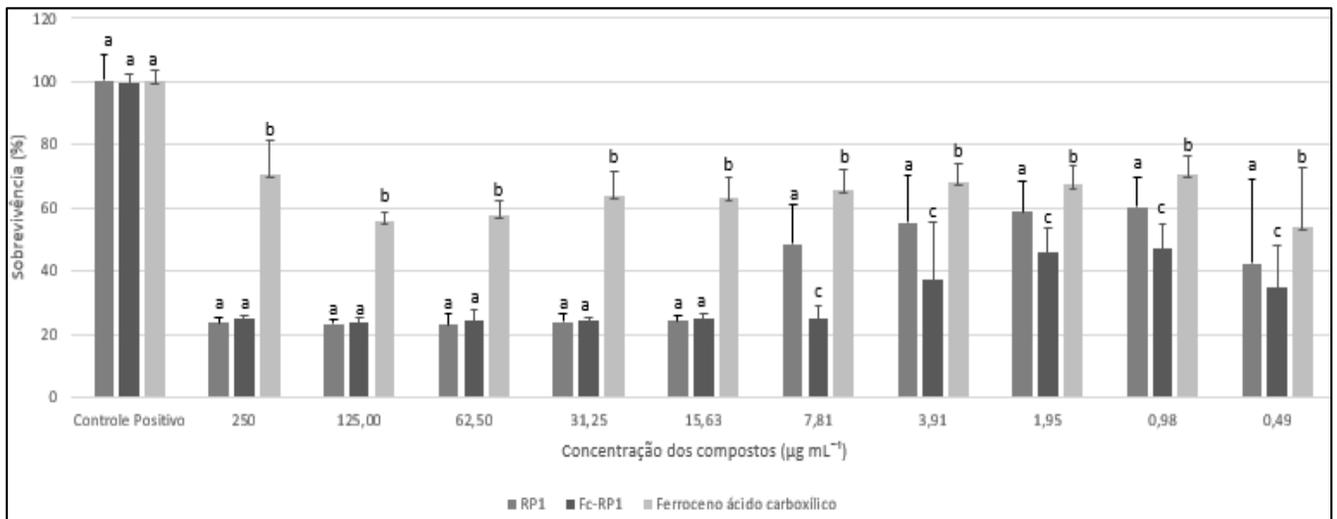
4.6.3. Ensaio antifúngicos

Ensaio antifúngicos também foram realizados. Os peptídeos RP1 e Fc-RP1 apresentaram valores de MIC frente a *C. neoformans* de 15,37 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (6,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 7,80 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (3,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente ambos as concentrações foram comprovadas por leitura visual e com agente reducional alamar blue. O ferroceno ácido carboxílico também diminuiu o crescimento do microrganismo, mas não foi possível obter um valor de MIC devido ao fato da inibição não atingir 50%. O antifúngico anfotericina b foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram feitos em triplicata experimental e com triplicata de cada ponto. A análise estática realizada, com um teste de Tukey com p-valor < 0,05, indicou diferença estatística significativa entre os peptídeos e a molécula de ferroceno ácido carboxílico em todas as concentrações testadas e entre o peptídeo RP1 e seu conjugado nas menores concentrações utilizadas. (Figura 24).

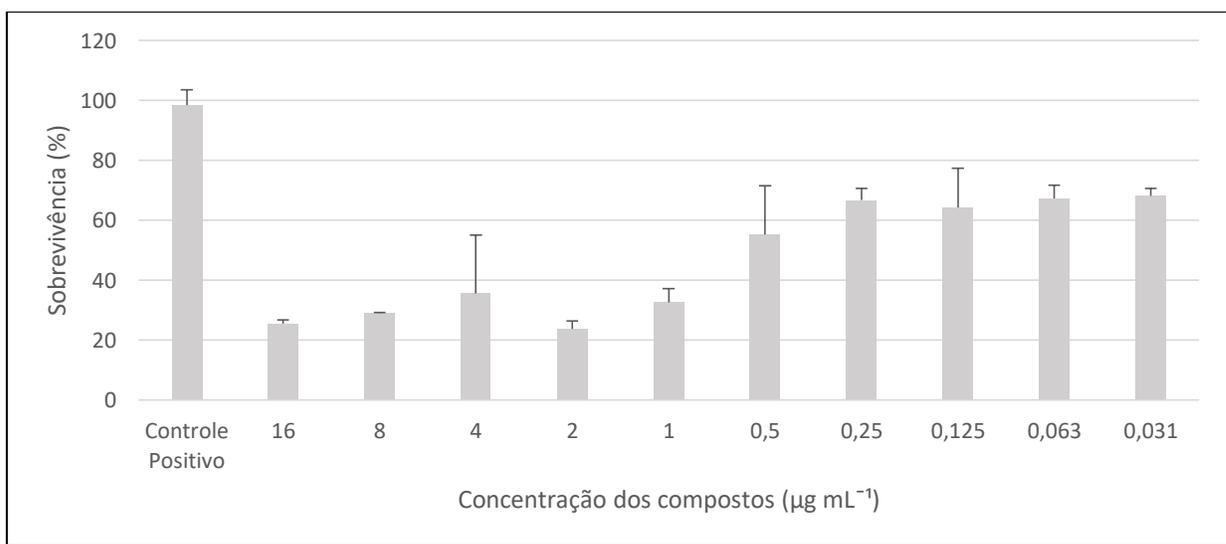
O acoplamento do ferroceno ao peptídeo potencializou a sua ação. Acreditamos que seu mecanismo de ação esteja relacionado com um dano a membrana celular fúngica, isto pode ser explicado pelo fato do íon metálico do ferroceno interagir com o peptídeo, aumentando a sua natureza lipofílica e sua capacidade de penetração a membrana. Além disso outros fatores podem influenciar esse mecanismo como solubilidade, condutividade e momento dipolo das moléculas (influenciado pela presença de íons metálicos) (Santos *et al.*, 2017).

Figura 24: Ensaios de MIC com *C.neoformans* frente as normas do CLSI, *todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental com triplicata de cada ponto e a análise estática realizada, com um teste de Tukey com p-valor < 0,05, dos quais não houve diferença estatística significativa entre as concentrações testadas.*

- a) MIC com as moléculas RP1, Fc-RP1 e ferroceno ácido carboxílico. Dados significativamente estatísticos, analise a partir do Teste de Tukey, dos quais letras diferentes representam dados significantes entre si.



- b) Ensaio de MIC com o antifúngico Anfotericina B



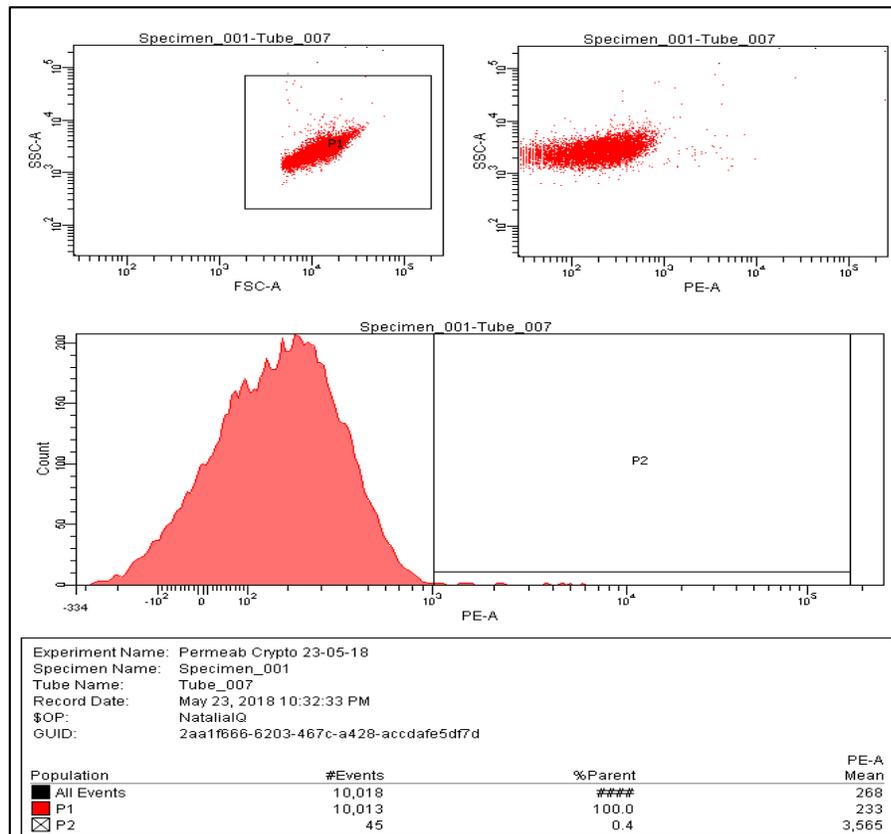
4.6.4. Ensaio de dano de membrana por citometria de fluxo

Para comprovar o mecanismo de ação dos peptídeos na membrana, ensaios de citometria de fluxo foram realizados utilizando iodeto de propídio (PI). A citometria de fluxo têm sido considerada mais confiável para estudos de suscetibilidade celular, pois fornece informações intrínsecas celulares, como tamanho e complexidade (Benaducci *et al.*, 2015). O uso de fluorocromos permite a avaliação de uma ampla gama de parâmetros fisiológicos ou morfológicos, como integridade da membrana, pH, potencial de membrana e viabilidade.

Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência de células de *C. neoformans* marcadas com PI, pois no momento que a célula fúngica sofre algum tipo de dano na membrana o iodeto consegue penetrar no interior da célula e ter acesso ao núcleo e se intercalar ao DNA, emitindo uma fluorescência que pode ser medida, sendo esta uma maneira de avaliar a viabilidade celular fúngica. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica com triplicata de cada ponto experimental.

Inicialmente foi realizado o controle negativo dos experimentos, para isso foram usadas inóculo de células que não receberam tratamento, dos quais foram computados cerca de 10.000 eventos. Os dados mostraram que não houve dano na membrana e o PI não se integrou ao DNA, pois somente foi captado pelo equipamento dados de tamanho e granulosidade das células viáveis. Os dados podem ser vistos na figura 25.

Figura 25: Citometria de fluxo de células de *C. neoformans* sem tratamento (controle negativo) com marcação de PI por 10 min.



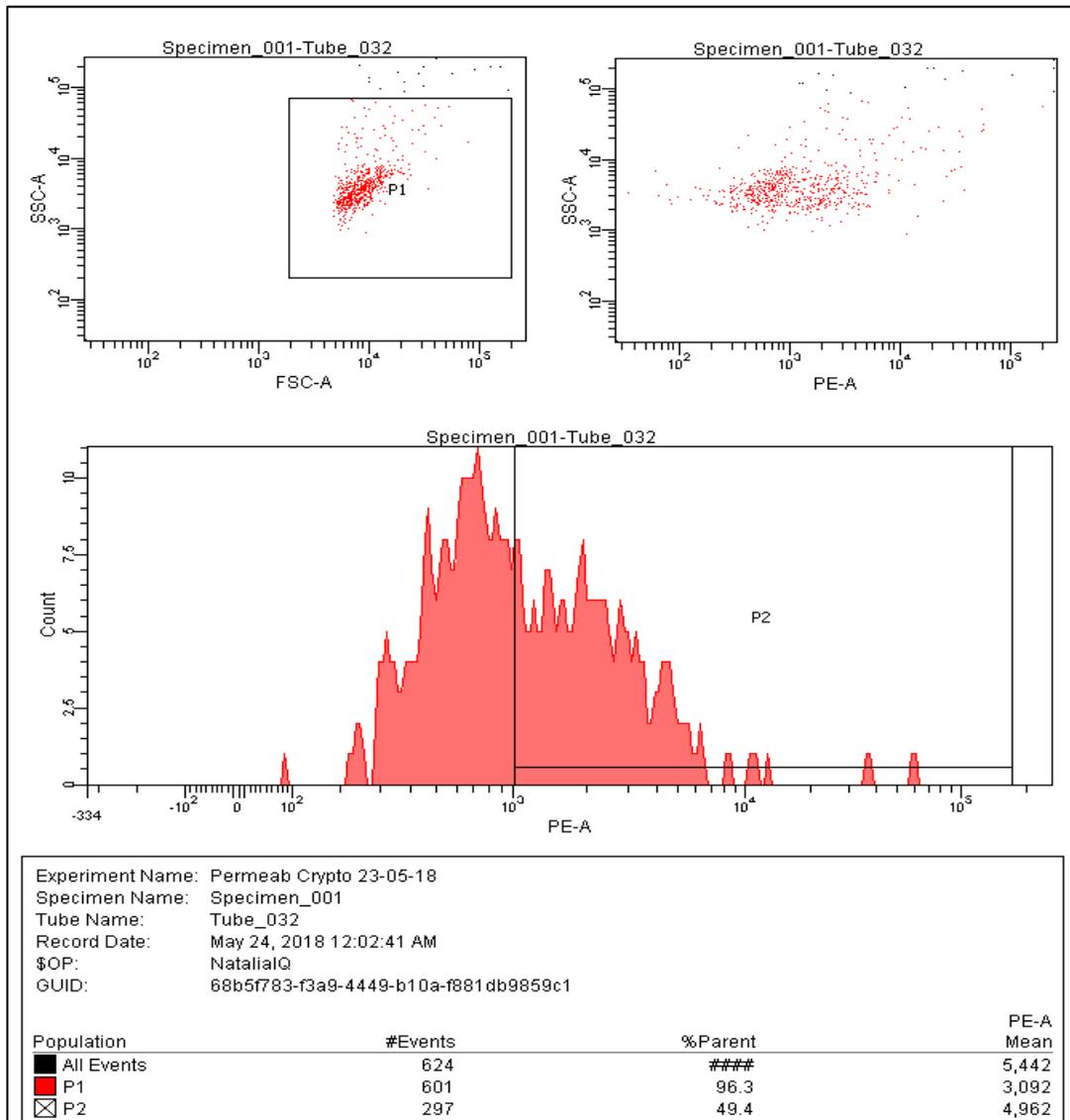
A adição dos peptídeos RP1, Fc-RP1 foi avaliada na concentração imediatamente superior ao MIC, concentração de MIC e em uma concentração inferior a esta. O ferro-ceno ácido carboxílico também foi avaliado, destacando que essa molécula foi estudada somente na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($110,4 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Como já mencionado anteriormente, um dos principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos é a sua ação na membrana celular. Os dados de permeabilização deste trabalho mostraram que o peptídeo RP1 e Fc-RP1 agem na bicamada lipídica levando a liberação de CF. Estes resultados foram reproduzidos nos ensaios de citometria de fluxo, pois ambos os peptídeos induziram a morte celular e danos à membrana após 48 h de incubação (Benaducci *et al.*, 2015).

Para o peptídeo RP1 na concentração imediatamente superior ao MIC ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $13,8 \mu\text{mol L}^{-1}$), cerca de 60 % das células foram PI positivas, isto também fica

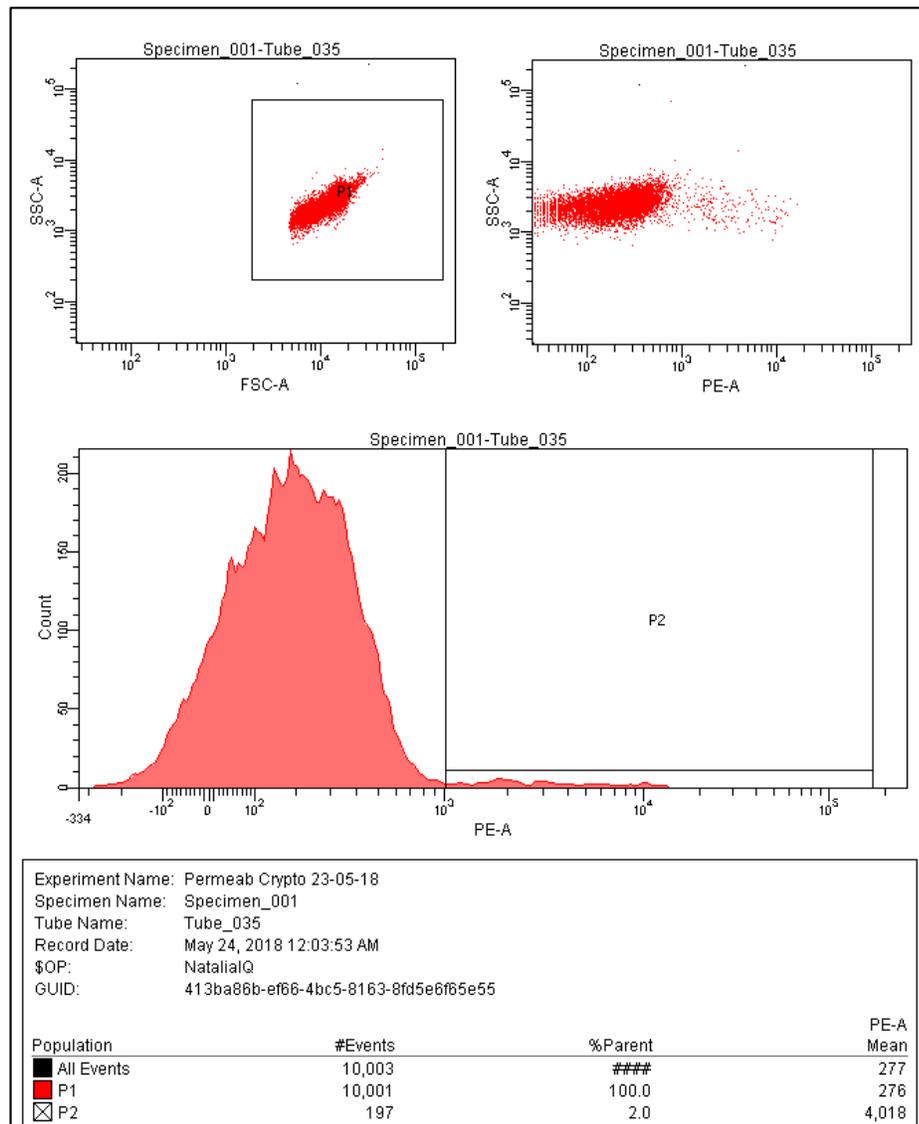
evidenciado pelo fato de menos aquisições terem sido realizadas pelo equipamento, mostrando assim que havia um menor número de células viáveis; na concentração de MIC ($15,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$), após 10 min de exposição ao PI, cerca de 49 % das células foram PI positivas, mostrando assim que este peptídeo tem ação na membrana (Figura 26).

Figura 26: Citometria de fluxo de células de *C.neoformans* tratadas com RP1 na concentração de MIC e marcadas com PI.



Na concentração inferior ao MIC ($7,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), o peptídeo RP1 induziu poucas células a morte celular, no entanto, mesmo que em número menor, as células que morreram foram marcadas por PI mostrando que este peptídeo ainda induz a morte celular e causa danos a membrana (Figura 27).

Figura 27: Citometria de fluxo de células de *C.neoformans* tratadas com RP1 em concentração inferior ao MIC marcadas com PI.



O peptídeo conjugado com ferroceno, como obtido nos estudos anteriores de permeabilização e de atividade antibacteriana, mostrou resultados mais expressivos nos testes de citometria, com um maior número de células com dano de membrana no MIC ($7,1$

$\mu\text{g.mL}^{-1}$) - cerca de 80 % (Figura 28). Na concentração inferior ao MIC, o Fc-RP1 obteve cerca de 30 % de células PI positivas, mostrando o grande potencial deste complexo mesmo em concentrações menores (Figura 29).

Figura 28: Citometria de fluxo de células de *C.neoformans* tratadas com Fc-RP1 na concentração de MIC marcadas com PI.

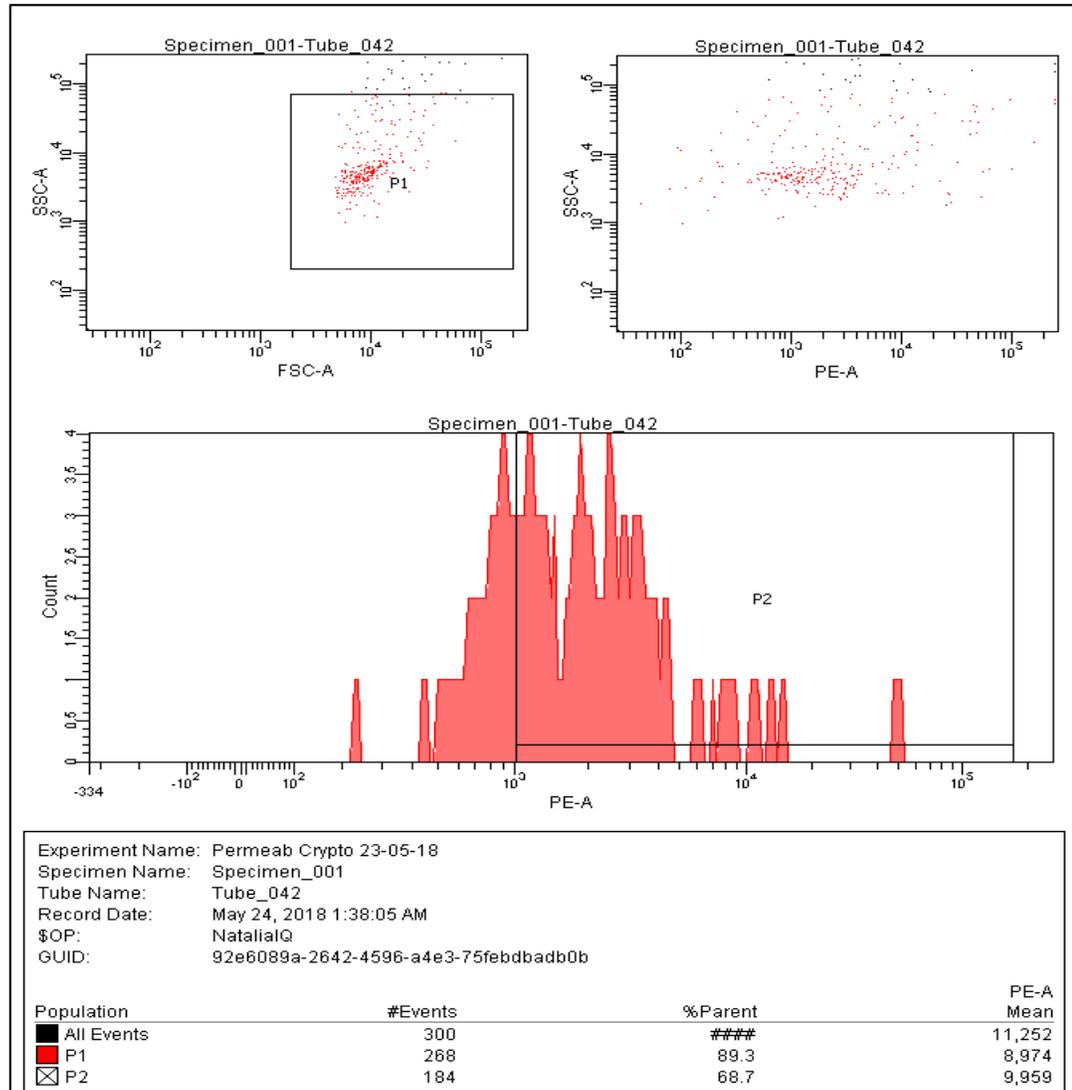
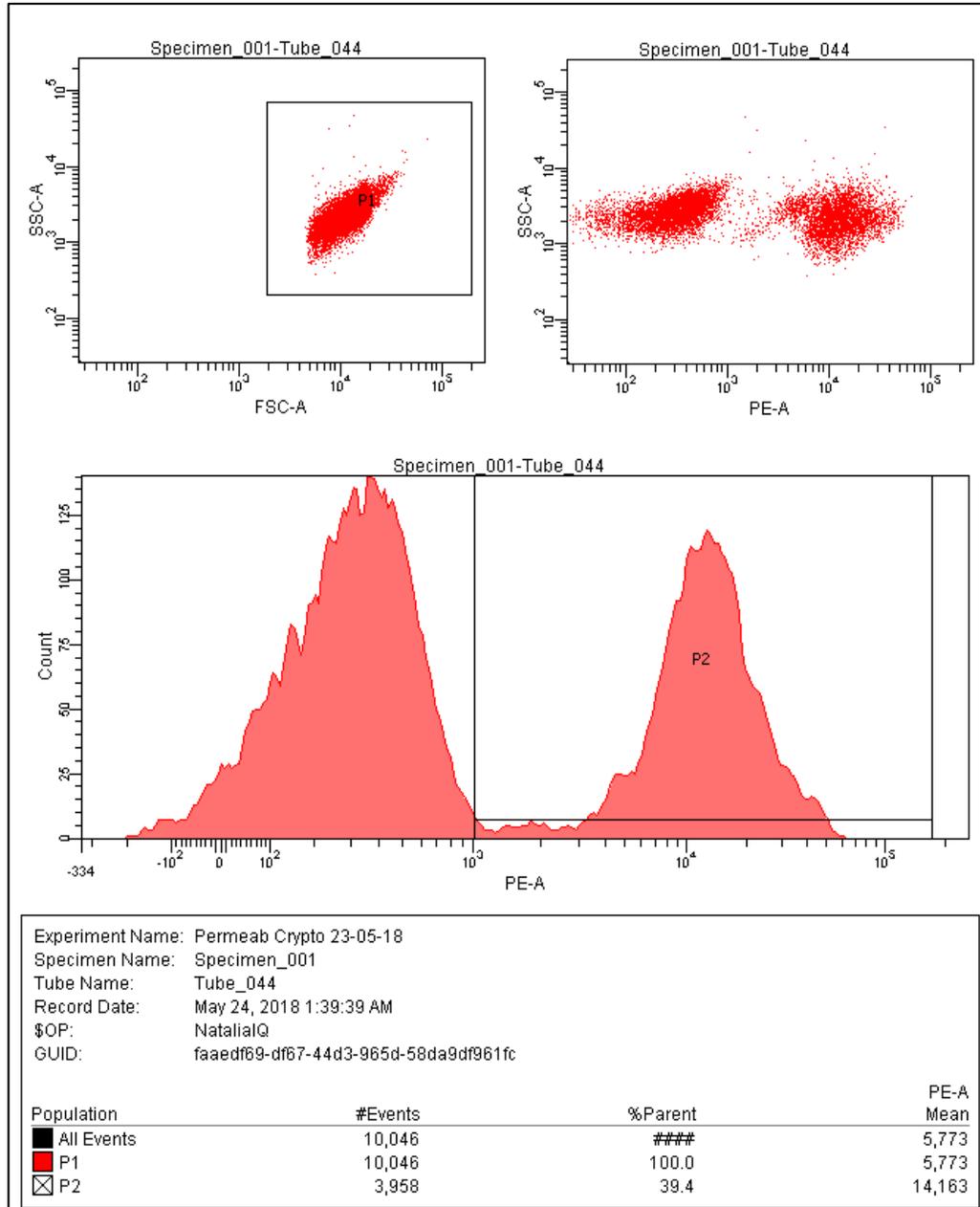
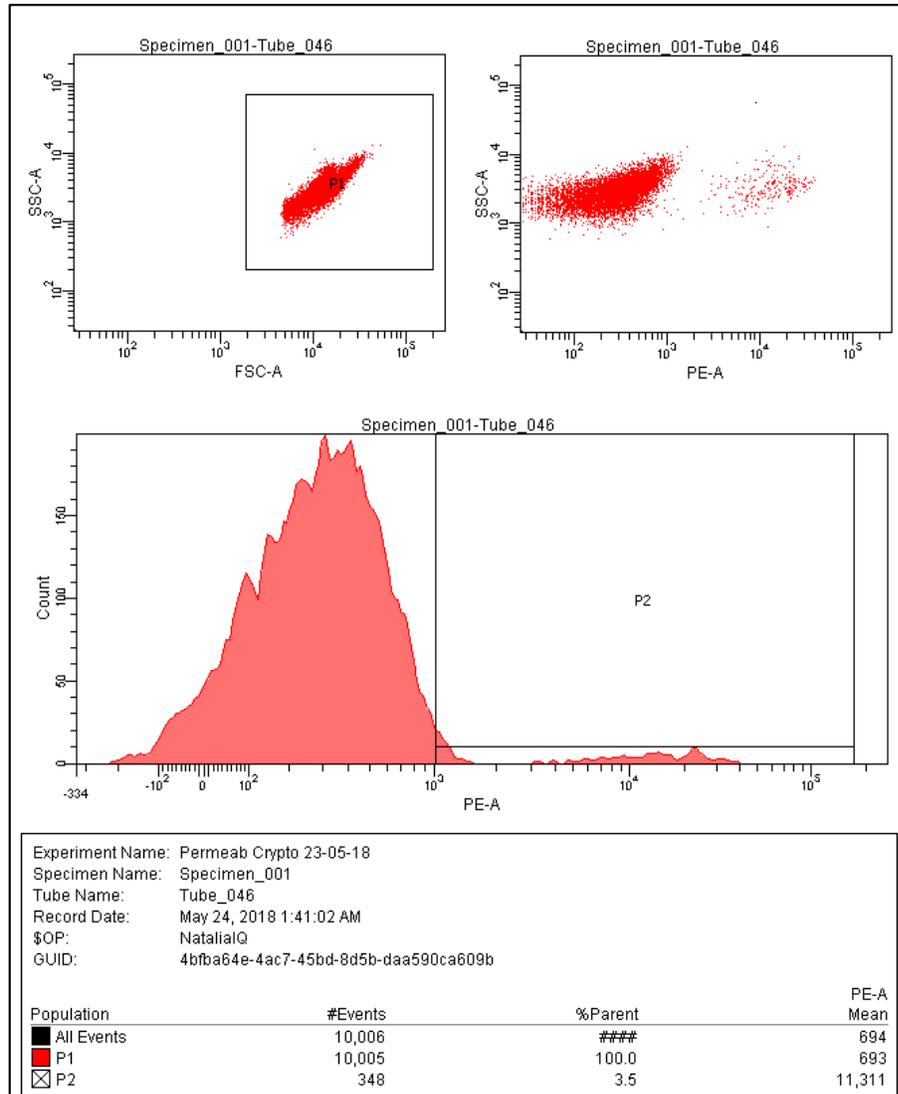


Figura 29: Citometria de fluxo de células de *C. neoformans* tratadas com Fc-RP1 na concentração inferior ao MIC marcadas com PI.



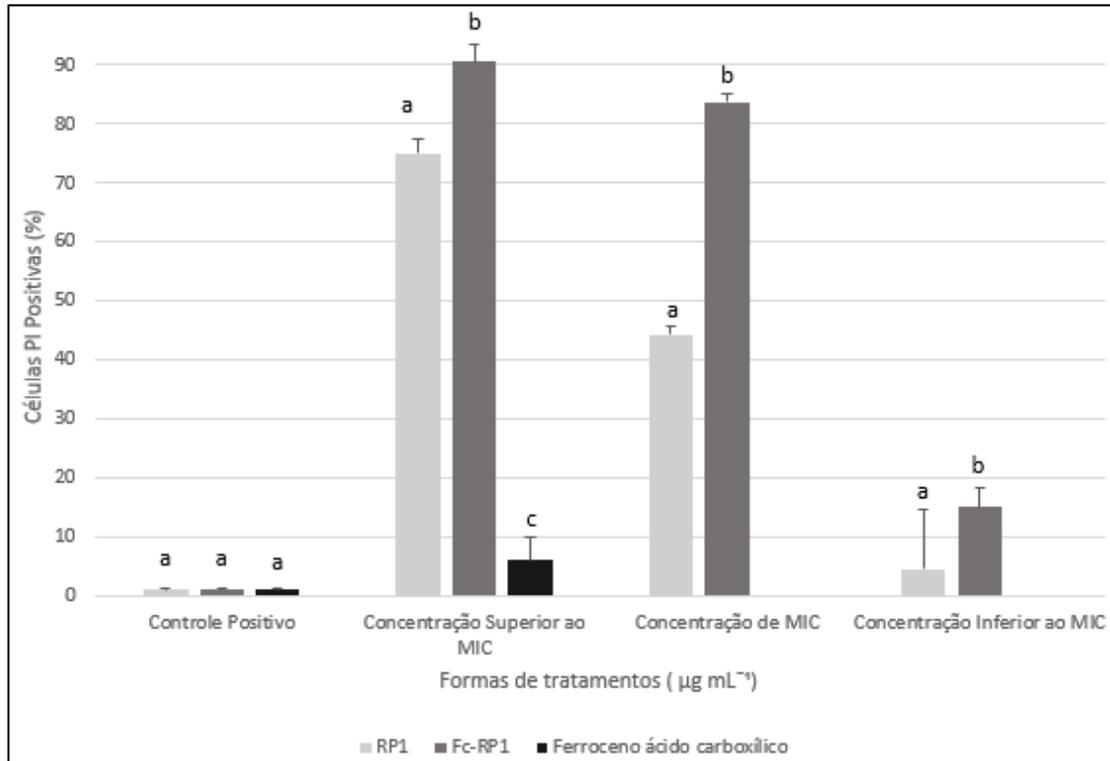
Nos ensaios com a molécula ferroceno ácido carboxílico livre na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($110 \mu\text{mol L}^{-1}$) apenas um número pequeno de células apresentou morte celular (Figura 30). Esses dados estão de acordo com os estudos de atividade biológica, onde a atividade desse composto foi menor que a do peptídeo.

Figura 30: Citometria de fluxo de células de *C. neoformans* tratadas com Ferroceno na concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e marcadas com PI.



Com os experimentos realizados, foi computado um gráfico de porcentagem de células PI positivas para as concentrações de MIC e inferior ao MIC (Figura 31), mostrando assim que o acoplamento do Fc ao peptídeo potencializou a sua ação, sendo esta uma boa estratégia para a criação de biconjugados antifúngicos. A análise estática realizada, com um teste de Tukey com p-valor < 0,05, indicou diferença estatística significativa entre os peptídeos e a molécula de ferroceno ácido carboxílico.

Figura 31: Porcentagem de células *C. neoformans* PI positivas, frente aos tratamentos com RP1, Fc-RP1 e ferroceno ácido carboxílico.



4.6.5. Ensaios antimaláricos

Os peptídeos RP1 e Ferroceno foram inativos *in vitro* contra *P. falciparum* ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). O peptídeo Fc-RP1 mostrou atividade (Tabela 5), no entanto, não foi possível determinar o valor exato de IC_{50} desse composto, pois nas duas maiores concentrações (100 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o composto causou atividade hemolítica considerável (Tabela 6).

Tabela 5: Ensaios antimaláricos dos peptídeos obtidos nesse trabalho.

| Moléculas | IC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-----------|---|
| RP1 | >100 |
| Fc-RP1 | >25 |
| Fc | >100 |

Os ensaios hemolíticos indicaram que todos os compostos apresentaram atividade hemolítica, tanto em hemácias infectadas como não infectadas (tabela 6), sendo calculada a concentração de peptídeo em que 50% das hemácias sofreram hemólise.

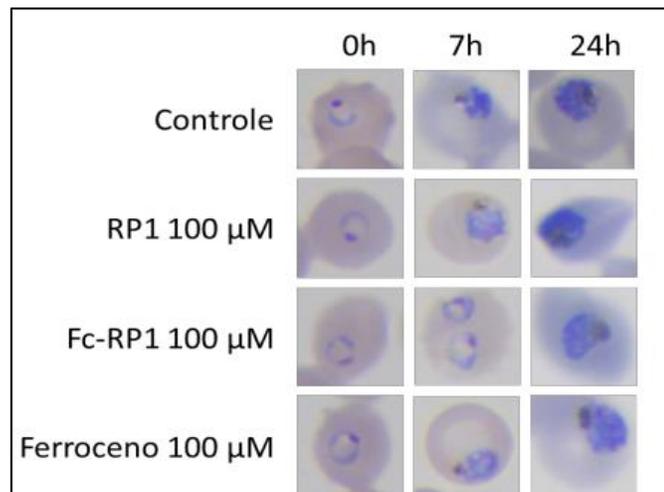
Tabela 6: Avaliação da concentração hemolítica de 50% (HC₅₀) contra hemácias humanas O+.

| Molécula | Hemácias parasitadas (+) ou não (-) | HC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) |
|-----------------------------|-------------------------------------|---|
| RP1 | + | 98.2 |
| | - | >100 |
| Fc-RP1 | + | >100 |
| | - | >100 |
| Ferroceno ácido carboxílico | + | >100 |
| | - | >100 |

Para os ensaios da ação do peptídeo RP1 e ferroceno em diferentes estágios da evolução do parasita, não foi possível verificar diferença na morfologia e parasitemia, em relação ao controle não tratado. Já para o FcRP1, houve um atraso no desenvolvimento do parasito em relação ao controle não tratado nas primeiras 7 h. O controle avançou para trofozoíto, enquanto o poço contendo o Fc-RP1 se manteve majoritariamente em anel. Após as primeiras 24 h, foi possível observar que o composto Fc-RP1 causou uma

redução considerável no número de parasitos, indicativo de atividade antiplasmodial na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No entanto, não foi possível monitorar a parasitemia e morfologia ao longo de mais tempo, uma vez que após esse momento começou a ocorrer hemólise (Figura 32).

Figura 32: Morfologia do parasito *P. falciparum* ao longo do ensaio de estágio de ação (0, 7 e 24 horas de incubação) para os compostos enviados e o controle.



É importante enfatizar que apesar de haver mais hemólise em hemácias infectadas (provavelmente devido a fragilização da membrana e alterações na permeabilidade da hemácia), ainda houve uma quantidade considerável de hemólise mesmo em hemácias não-infectadas (no período de incubação de 72 h). Além disso, a redução de parasitemia ocorreu independentemente da hemólise nas 24 h iniciais, dessa forma a hemólise causada foi de fato um efeito não desejado.

A partir desses resultados, concluímos que o composto RP1 não é tão eficiente quanto se acreditava e a molécula de ferroceno tem potencial como agente biológico, podendo ser acoplados a novos peptídeos antiparasitários e antifúngicos a fim de potencializar sua ação.

4.6.6. Testes de citotoxicidade

A fim de avaliar se o peptídeo era tóxico para linhagens celulares humanas foram realizados testes de toxicidade.

Os testes foram feitos com duas linhagens celulares diferentes: 1) HaCat (célula de queratinócito imortalizada). Essa foi avaliada por se tratar de célula epitelial e a infecção por *Candida* também atingem células epiteliais; 2) U87 (célula de glioblastoma humano). Essa linhagem foi usada por representar um tipo celular relacionado com o sistema nervoso humano, a qual é um dos modos de infecção do *Cryptococcus* é a meningite cefálica. Também foram realizados testes com uma linhagem cancerígena de hepatocarcinoma humano.

Os testes de citotoxicidade não demonstraram toxicidade para as linhagens celulares HaCat e U87, além disso não apresentou atividade para a linhagem tumoral HepG2 na maioria das concentrações testadas (Figuras 32,33 e 34), demonstrando uma grande vantagem desse composto para uso tópico em relação aos fármacos utilizados na clínica médica que na sua maioria são tóxicos.

As infecções fúngicas estão crescendo, e cerca de 300 milhões de pessoas são acometidas por essa enfermidade, resultando em mais de 1.350.000 mortes (Cowen *et al.*, 2014). Entre as principais infecções estão a criptococose e a candidíase vaginal e oral. A maior incidência das infecções fúngicas são consequência da imunossupressão que resulta de condições, como AIDS ou de tratamentos, como quimioterapia para câncer, terapia imunossupressora para transplante de órgãos e terapia com corticosteroides para inflamação.

O reconhecimento da importância das infecções por fungos levou a um aumento na aplicação de agentes antifúngicos para o tratamento e prevenção da infecção, infelizmente, as opções de tratamento são altamente limitadas, pois existem poucas classes químicas representadas por drogas antifúngicas existentes.

As classes de medicamentos antifúngicos incluem os azóis (por exemplo, fluconazol, voriconazol) e alilaminas (por exemplo, terbinafina) que inibem a biossíntese de ergosterol. Outra classe de compostos são os polienos (por exemplo, anfotericina B), que se ligam ao ergosterol na membrana plasmática, onde formam poros grandes que perturbam a função celular. A flucitosina (5-fluorocitosina) inibe o metabolismo de pirimidina e a síntese de DNA e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) são agentes de parede celular que inibem a biossíntese de β -1,3-d-glucano, componente estrutural da parede celular fúngica (Shapiro *et al.*, 2011).

O uso generalizado de agentes antifúngicos é considerado um fator que promove a resistência aos medicamentos. A resistência adquirida pelos patógenos fúngicos restringe as opções de tratamento. Atualmente, a primeira linha de tratamento utilizado são: azoles e equinocandinas (Cowen *et al.*, 2014). O desenvolvimento da resistência antifúngica é complexo e depende de múltiplos fatores hospedeiro e microbiano, o status imunológico do hospedeiro é um fator crítico, pois os fármacos fungistáticos devem trabalhar sinergicamente para controlar e limpar uma infecção.

Outra desvantagem dos fármacos convencionais, além dos mecanismos de resistência são os efeitos colaterais que estes apresentam: os fármacos podem interagir com células de mamíferos, ocasionando vários efeitos colaterais: podem ser hepatotóxicos, alterar níveis dos hormônios (testosterona e cortisol), podem ser bioacumuladores no interior das células adiposa, leva a sérios danos nos rins, náuseas e diarreias, entre outros sintomas.

Portanto como as moléculas estudadas nesse trabalho não se mostraram citotóxicas, está é uma grande vantagem aos fármacos convencionais, destacando ainda que nos testes de CIM os peptídeos RP1 e FcRP1 foram fungicidas para a linhagem testada e os fármacos administrados na clínica convencional possuem em sua grande maioria efeito fungistático sendo essa uma grande vantagem desses novos compostos.

Outro resultando importante que pode ser obtido a partir dos dados ensaios de MIC e citotoxicidade é o Índice de seletividade (IS), que é a razão entre a maior concentração do ensaio de citotoxicidade pelo valor do MIC, quanto maior o IS mais seguro e eficaz é a molécula. Para os peptídeos RP1 e Fc-RP1 o índice de seletividade é respectivamente 32,46 e 65,88 mostrando que ambas as moléculas são mais seletivas ao patógeno do que ao seu hospedeiro.

Figura 33: Testes de citotoxicidade com linhagem celular U-87 (linhagem celular de glioblastoma primário humano), todos os dados receberam tratamento estatístico (Anova e Teste de Tukey) e os resultados apresentados não são estatisticamente diferentes entre si, todos são representados pela mesma letra no Teste de Tukey.

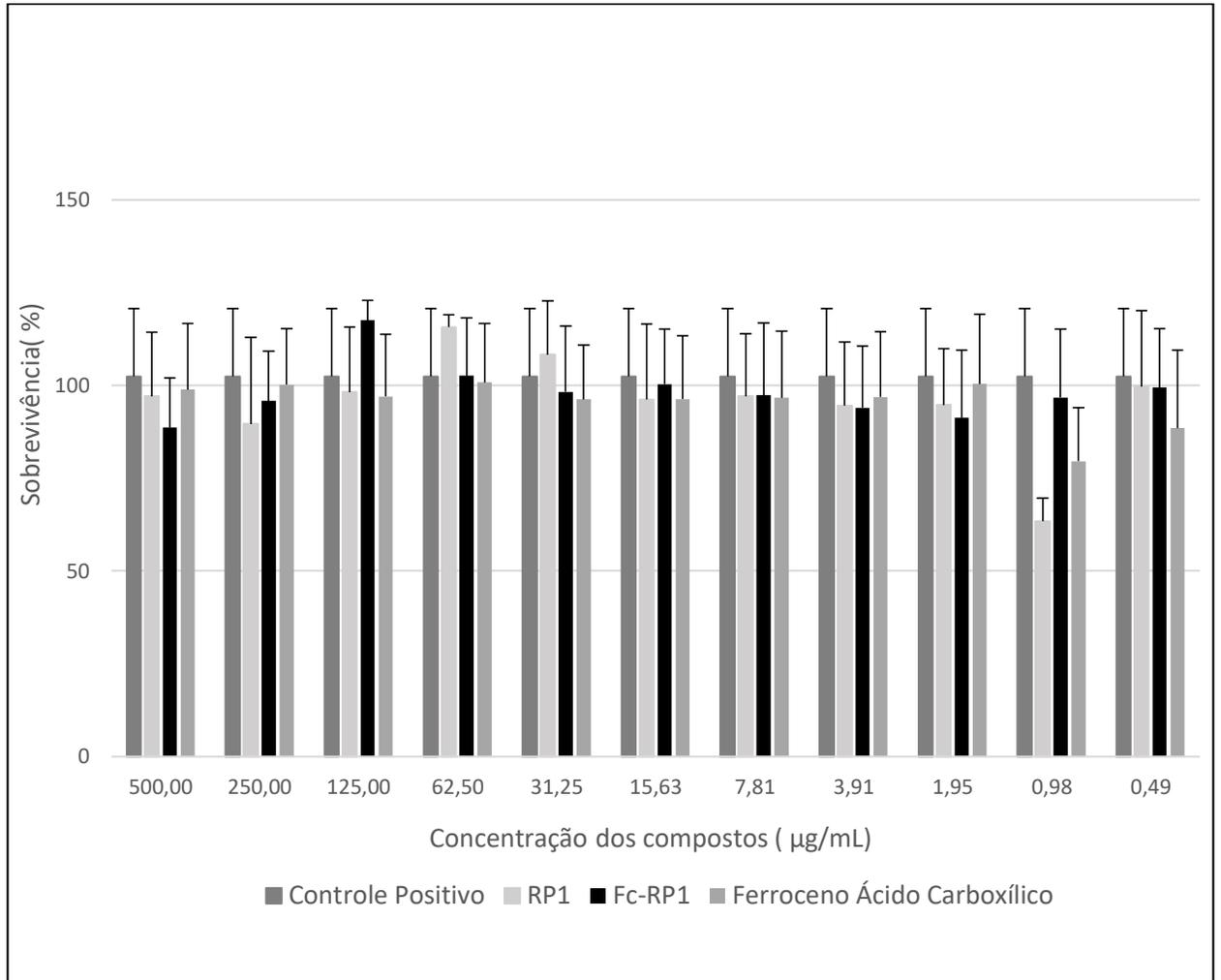


Figura 34: Testes de citotoxicidade com a linhagem celular Hacat (linhagem celular de queranócitos imortalizadas), todos os dados receberam tratamento estatístico (Anova e Teste de Tukey) e os resultados apresentados não são estatisticamente diferentes entre si, todos são representados pela mesma letra no Teste de Tukey.

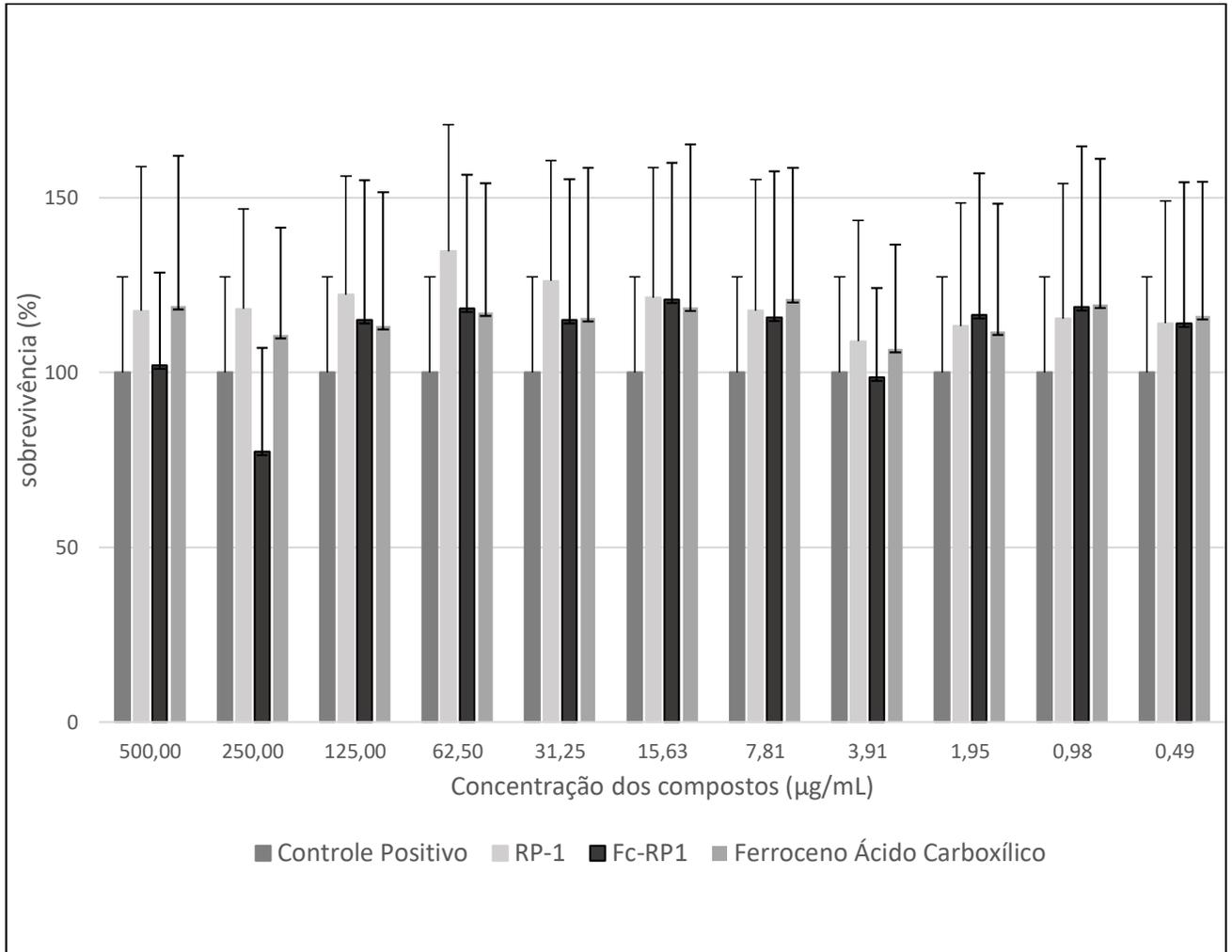
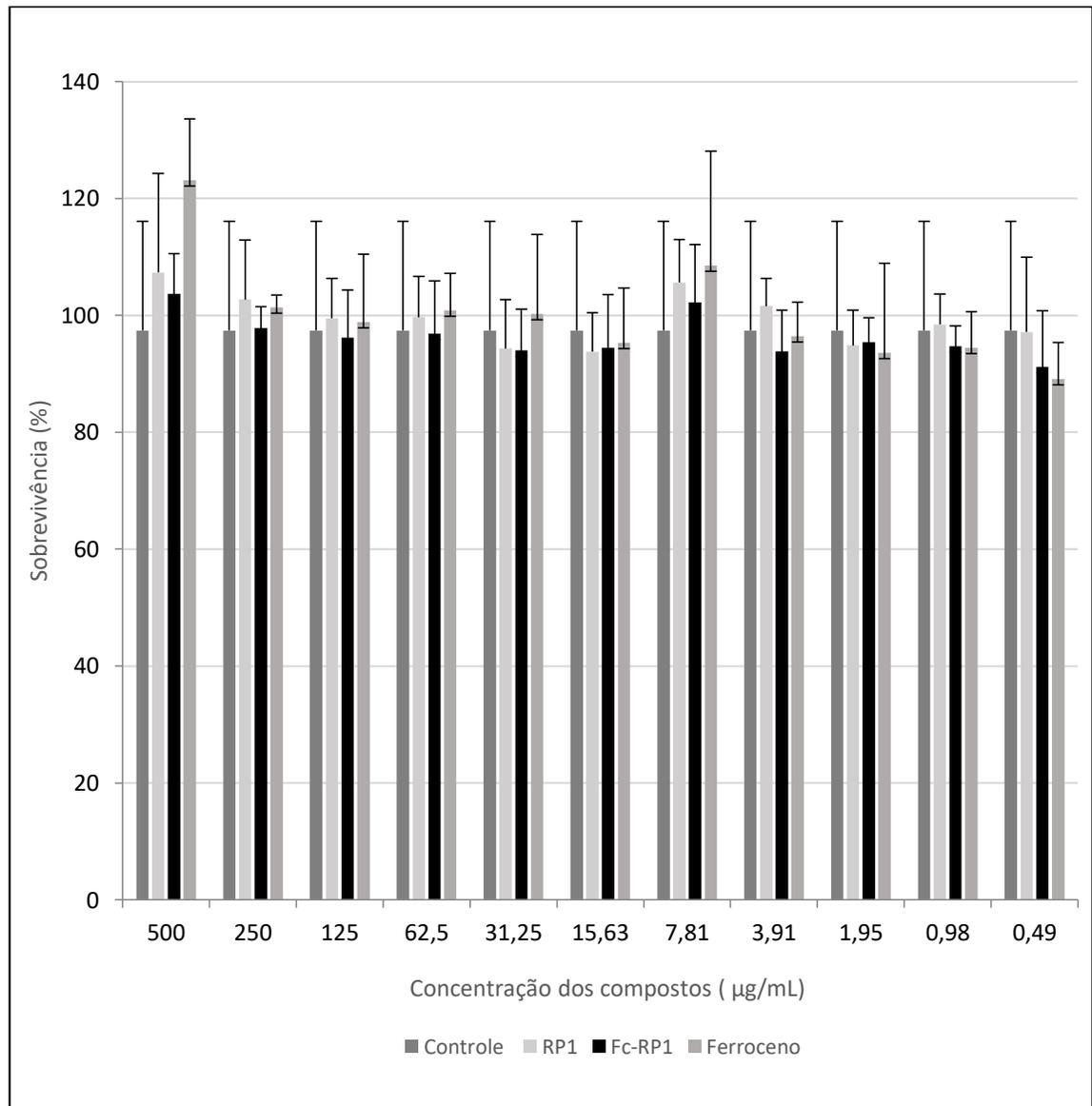


Figura 35: Testes de citotoxicidade com linhagem celular HepG2 (linhagem celular de hepatocarcinoma humano), todos os dados receberam tratamento estatístico (Anova e Teste de Tukey) e os resultados apresentados não são estatisticamente diferentes entre si, todos são representados pela mesma letra no Teste de Tukey.

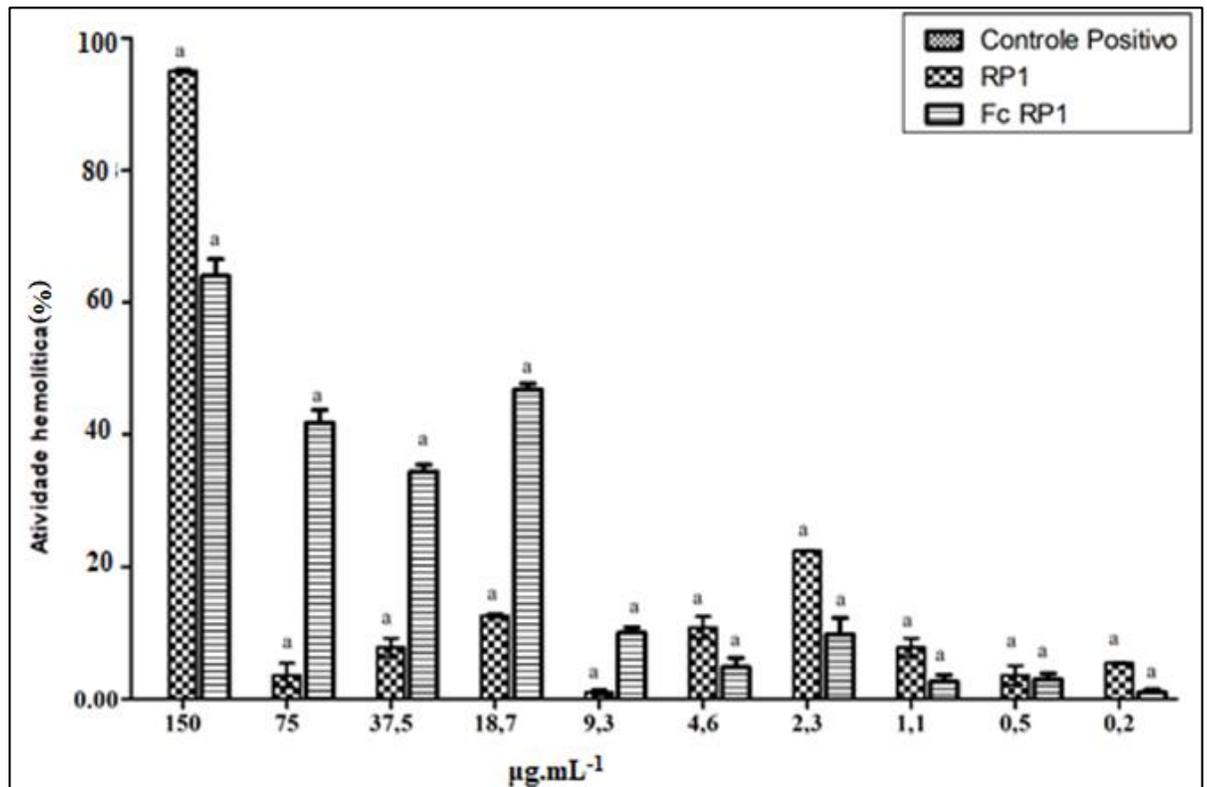


Para avaliar a segurança dos peptídeos em relação as células da tilápia, diferentes concentrações dos peptídeos foram testadas quanta a sua ação hemolítica nas hemácias da espécie homologa. Os peptídeos RP1 e Fc-RP1 apresentaram uma pequena ação hemolítica cerca de 20 % se comparado ao controle positivo do teste (Figura 35). Essas moléculas possuem um grande potencial biológico, pois na concentração considerada o

MIC dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 respectivamente (9,3 e 2,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a taxa de hemólise foi baixa (menos de 20%). Também foi calculado o índice de seletividade desses peptídeos, para o peptídeo RP1 e o Fc-RP1 o IS foi respectivamente de 15,48 e 61,94, mostrando que estão mais eficazes e sem tanta citotoxicidade.

Outro dado importante é que o IS evidenciou para todos ensaios antimicrobianos é que o peptídeo Fc-RP1 foi mais seletivo que o RP1 e o seu índice de seletividade é maior, mostrando o grande potencial dessa molécula.

Figura 36: Atividade citotóxica e hemolítica dos peptídeos em hemácias de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Testados em diferentes concentrações e os resultados expressos em médias (n= 3) com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0.05$).



5. Conclusões

A síntese de peptídeos em fase sólida possibilitou o desenvolvimento dos peptídeos com a presença da molécula organometálica de ferroceno.

Apesar das dificuldades encontradas durante a síntese do peptídeo contendo o ferroceno, essa mostrou ser possível. A caracterização das moléculas prosseguiu-se de forma eficiente obtendo-se o material puro.

Os testes de permeabilização mostraram que o peptídeo RP1 foi menos ativo que o peptídeo contendo o ferroceno. Os dados obtidos também indicaram que um dos mecanismos de ação dessa molécula é ação na membrana - bicamada lipídica.

Os peptídeos foram ativos em linhagens fúngicas de *C. neoformans* e em *P. falciparum* e mostraram baixo índice de toxicidade em queratinócitos, o potencial do bioconjugado Fc-RP1 em aplicação tópica. A ação hemolítica encontrada, no entanto, necessita ser melhor avaliada e impede que este peptídeo seja utilizado de forma oral. Os testes biológicos também comprovaram ação antibacteriana dos peptídeos RP1 e Fc-RP1 contra a espécie gram positiva *S. agalactiae*.

6. Referências

ALBEROLA, J. et al. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 2, p. 641-3, Feb 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742227> >.

AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 8, p. 1055-81, Aug 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24276381> >.

AVITABILE, C.; D'ANDREA, L. D.; ROMANELLI, A. Circular Dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. **Sci Rep**, v. 4, p. 4293, Mar 2014. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618744> >.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1543-75, Nov 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287494> >.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **J Dent Res**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 03 2017. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872334> >.

BENADUCCI, T. et al. A flow cytometry method for testing the susceptibility of *Cryptococcus* spp. to amphotericin B. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, n. 3, p. 159-63, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25639695> >.

BONDARYK, M. et al. Natural Antimicrobial Peptides as Inspiration for Design of a New Generation Antifungal Compounds. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 3, Aug 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371563> >.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases- Estimate Precision. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 4, Oct 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371573> >.

BROMLEY, E. H.; CHANNON, K. J. Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 103, p. 231-75, 2011. ISSN 1878-0814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21999998> >.

CASALLANOVO, F. et al. 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. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170802> >.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 7, p. a019752, Nov 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384768> >.

CRUSCA, E. et al. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, n. 1, p. 41-8, 2011. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560142> >.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. **A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis**. SIMENEW, K. *Journal of Bacteriology & Parasitology*: 4:2 p. january, 2013.

DE LUCCA, A. J.; WALSH, T. J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 1, p. 1-11, Jan 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869556> >.

DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4837-47, Aug 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913171> >.

EBBENSGAARD, A. et al. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. **PLoS One**, v.

10, n. 12, p. e0144611, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656394> >.

ELMAHALLAWY, E. K.; AGIL, A. Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research. **Curr Pharm Des**, v. 21, n. 17, p. 2259-75, 2015. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25543123> >.

ERFE, M. C. et al. Efficacy of synthetic peptides RP-1 and AA-RP-1 against Leishmania species in vitro and in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 658-65, Feb 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123683> >.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 3, May 2017. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28513415> >.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Front Microbiol**, v. 4, p. 353, Dec 2013. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367355> >.

HOFSTRAAT, K.; VAN BRAKEL, W. H. Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. **Int Health**, v. 8 Suppl 1, p. i53-70, Mar 2016. ISSN 1876-3405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940310> >.

JANKA, V. et al. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 51, n. 9, p. 964-74, Oct 2015. ISSN 1543-706X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019120> >.

JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A.; TOP, S. Ferrocifen type anti cancer drugs. **Chem Soc Rev**, v. 44, n. 24, p. 8802-17, Dec 2015. ISSN 1460-4744. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26486993> >.

KANG, H. K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **J Microbiol**, v. 55, n. 1, p. 1-12, Jan 2017. ISSN 1976-3794. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28035594> >.

KUMAR, L. et al. Eradication of superficial fungal infections by conventional and novel approaches: a comprehensive review. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 42, n. 1, p. 32-46, Feb 2014. ISSN 2169-141X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452349> >.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, Jan 2018. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351202> >.

LAROCK, C. N.; NIZET, V. Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, n. 11 Pt B, p. 3047-54, Nov 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701232> >.

LEWIES, A. et al. The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15392-433, Aug 2015. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26305243> >.

LI, J. et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Front Neurosci**, v. 11, p. 73, 2017. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261050> >.

LIPPERT, R. et al. Redox behavior and biological properties of ferrocene bearing porphyrins. **J Inorg Biochem**, v. 171, p. 76-89, 06 2017. ISSN 1873-3344. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371681> >.

LORENZÓN, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Cândida albicans* cells. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1521-8, Jun 2013. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519707> >.

MACKEY, T. K. et al. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 949-79, Oct 2014. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278579> >.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 194, 2016. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28083516> >.

MARQUETTE, A.; BECHINGER, B. Biophysical Investigations Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and Their Synergism. **Biomolecules**, v. 8, n. 2, Apr 2018. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670065> >.

MIKLÁN, Z. et al. New pemetrexed-peptide conjugates: synthesis, characterization and in vitro cytostatic effect on non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human leukemia (HL-60) cells. **J Pept Sci**, v. 17, n. 12, p. 805-11, Dec 2011. ISSN 1099-1387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076954> >.

_____. New ferrocene containing peptide conjugates: synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. **Biopolymers**, v. 88, n. 2, p. 108-14, 2007. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266125> >.

- PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chem Rev**, v. 115, n. 19, p. 10938-66, Oct 2015. ISSN 1520-6890. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010257> >.
- PECH-CANUL, Á.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R. L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from. **J Parasitol Res**, v. 2017, p. 3751403, 2017. ISSN 2090-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656101> >.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001067, Oct 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060861> >.
- PODOLSKI-RENIĆ, A. et al. Ferrocene-cinchona hybrids with triazolyl-chalcone linkers act as pro-oxidants and sensitize human cancer cell lines to paclitaxel. **Metallomics**, v. 9, n. 8, p. 1132-1141, Aug 2017. ISSN 1756-591X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28737782> >.
- PRETZEL, J. et al. Antiparasitic peptides. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 135, p. 157-92, 2013. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615879> >.
- RAUF, M. K. et al. Antileishmanial, DNA Interaction, and Docking Studies of Some Ferrocene-Based Heteroleptic Pentavalent Antimonials. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 349, n. 1, p. 50-62, Jan 2016. ISSN 1521-4184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627058> >.
- RUSSELL, A. L. et al. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chem Phys Lipids**, v. 163, n. 6, p. 488-97, Jun 2010. ISSN 1873-2941. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362562> >.
- SALEEM, M. et al. Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. **Anal Chim Acta**, v. 876, p. 9-25, May 2015. ISSN 1873-4324. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998454> >.
- SAMAD, A.; SULTANA, Y.; AQIL, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. **Curr Drug Deliv**, v. 4, n. 4, p. 297-305, Oct 2007. ISSN 1567-2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979650> >.
- SANTOS, M. M. et al. Recent Advances of Metallocenes for Medicinal Chemistry. **Mini Rev Med Chem**, v. 17, n. 9, p. 771-784, 2017. ISSN 1875-5607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27804886> >.
- SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-86, Oct 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079498> >.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67, Jun 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646428> >.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 16, n. 2, p. 237-52, Feb 2015. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346016> >.

THAVER, D.; ALI, S. A.; ZAIDI, A. K. Antimicrobial resistance among neonatal pathogens in developing countries. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 1 Suppl, p. S19-21, Jan 2009. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106758> >.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. e525-32, Aug 2011. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605997> >.

VELÁSQUEZ, A. M. et al. Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 7, p. 1707-10, Apr 2014. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24630563> >.

VICENTE, E. F. et al. N-terminal microdomain peptide from human dihydroorotate dehydrogenase: structure and model membrane interactions. **Protein Pept Lett**, v. 22, n. 2, p. 119-29, 2015. ISSN 1875-5305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24810226> >.

VOUGA, M.; GREUB, G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, n. 1, p. 12-21, Jan 2016. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493844> >.

WANG, Y. et al. Organometallic Antitumor Compounds: Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 54, n. 35, p. 10230-3, Aug 2015. ISSN 1521-3773. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26179051> >.

WANI, W. A. et al. Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. **Eur J Med Chem**, v. 101, p. 534-51, Aug 2015. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26188909> >.

YANG, H. et al. Structure and Bioactivity of a Modified Peptide Derived from the LPS-Binding Domain of an Anti-Lipopolysaccharide Factor (ALF) of Shrimp. **Mar Drugs**, v. 14, n. 5, May 2016. ISSN 1660-3397. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213409> >.