

RESSALVA

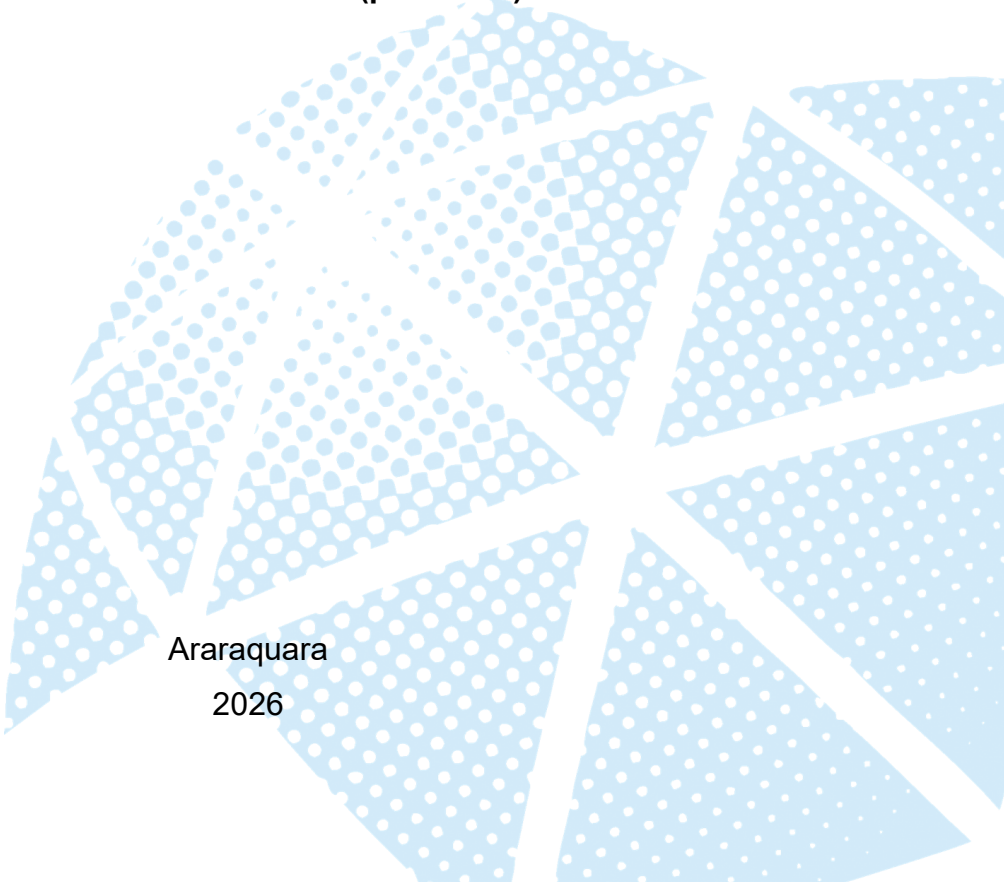
Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/01/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

LARA CERAZI SALVADOR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS
ANÁLOGOS AO PEPTÍDEO (p-BthTX-I)₂K

Araraquara
2026



LARA CERAZI SALVADOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS
ANÁLOGOS AO PEPTÍDEO (p-BthTX-I)₂K**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Araraquara

2026

S182a Salvador, Lara Cerazi
Avaliação do potencial antimicrobiano de peptídeos diméricos
análogos ao peptídeo (p-BthTX-I)2K / Lara Cerazi Salvador. --
Araraquara, 2026
77 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Norival Alves Santos Filho

1. peptídeos. 2. Antibióticos peptídicos. 3. peptídeos síntese. 4.
peptídeos catiônicos antimicrobianos. 5. dímeros. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Considerando a resistência a antimicrobianos um problema de saúde global, este trabalho tem impacto científico direto através do desenvolvimento de peptídeos como possível tratamento para a resistência aos antimicrobianos e como direcionador para o desenvolvimento de pesquisas e melhorias nesta área. Com o avanço das pesquisas, o uso de peptídeos antimicrobianos como tratamento de doenças gera impacto econômico através da produção e distribuição de novos medicamentos mais eficientes e de menor custo, acarretando também em um impacto social pela diminuição dos efeitos colaterais e da resistência, aumentando a possibilidade de cura e melhora da qualidade de vida. Assim, este trabalho está diretamente relacionado, com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU no Brasil 3, 9 e 14, sendo inovação no tratamento de infecções bacterianas melhorando a saúde e diminuindo a quantidade de resíduos farmacológicos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Considering antimicrobial resistance a global health problem, this work has a direct scientific impact through the development of peptides as a possible solution for new antimicrobials and as a driver for research and improvements in this area. With the advancement of research, the use of antimicrobial peptides as a treatment for diseases generates economic impact through the production and distribution of new, more efficient, and lower-cost drugs, also resulting in a social impact by reducing side effects and resistance, increasing the possibility of cure and improving quality of life. Thus, this work is directly related to the UN Sustainable Development Goals (SDGs) in Brazil 3, 9 and 14, being innovative in the treatment of bacterial infections, improving health and reducing the amount of pharmacological waste.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Peptídeos Diméricos Análogos ao Peptídeo (p-BthTx-I)₂K

AUTORA: LARA CERAZI SALVADOR

ORIENTADOR: NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

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

 Documento assinado digitalmente
NORIVAL ALVES SANTOS FILHO
Data: 26/01/2026 15:28:35-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof.^a Dr.^a PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / UNESP / Câmpus de Registro - FCAVR

Prof. Dr. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA (Participação Virtual)
Universidade Regional Amazônica Ikiam

Araraquara, 23 de janeiro de 2026.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	LARA CERAZI SALVADOR 21/08/2000
Nacionalidade	brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Salvador, Lara C. Salvador, Lara Cerazi Salvador, L. C.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 3301-9539
Currículo Lattes	https://lattes.cnpq.br/0697227754556410
ORCID	https://orcid.org/0009-0000-3065-7538 https://orcid.org/0009-0000-3065-7538
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2018/2023	Bacharelado em Química Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química de Araraquara
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
DE ABREU FERNANDES, PAULA; DE LIMA FONTES, MARINA; NUNES, LETÍCIA OLIVEIRA CATARIN; ARAGÃO, ARIANI RODRIGUES; SALVADOR, LARA CERAZI ; BRANDÃO, SARAH TOLENTINO ROCHA; FILHO, NORIVAL ALVES SANTOS; DA SILVA BARUD, HERNANE. New updates on peptides and peptide-	

based biopolymeric materials: medical, pharmaceutical and sensors applications. JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS, v. 436, p. 128177, 2025.

SANTOS, ISABELA C. DOS; ROMANAZZI, MARCELA; MALACHIAS-PIRES, GEOVANNA M.; ARAGÃO, ARIANI R.; FILARDI, ELOISE T. M.; MELO-DOS-SANTOS, GUILHERME; **SALVADOR, LARA C.**; CERVEJA, MARCOS F.; ROCHA, ANDERSON M.; MAGALHÃES, ANANDA; DE OLIVEIRA, ISADORA S.; ALMEIDA, JOSÉ R.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; PUCCA, MANUELA B.. Phospholipases A2 (PLA2s) and Related Peptides from Bothrops Snake Venoms: History, Structure, Pharmacology, and Inhibitors. BIOMOLECULES, v. 15, p. 1583, 2025

CARNERO CANALES, CHRISTIAN S.; MARQUEZ CAZORLA, JESSICA INGRID; MARQUEZ CAZORLA, RENZO MARIANITO; SANTOS, ALINE MARTINS DOS; LOBATO DUARTE, JONATAS; OLIVEIRA CATARIN NUNES, LETÍCIA; REIS, TÚLIO CUSTÓDIO; **CERAZI SALVADOR, LARA**; SANTOSFILHO, NORIVAL ALVES; SÁBIO, RAFAEL MIGUEL; SANTOS, HÉLDER A.; PAVAN, FERNANDO ROGÉRIO. Redefining Therapies for Drug-Resistant Tuberculosis: Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides, Nanotechnology, and Computational Design. Advanced Healthcare Materials, v. -, p. e03964, 2026.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

SANTOS-FILHOS, N. A.; FILARDI, E. T. M.; **SALVADOR, L. C.**. Participação em banca de Lucas Oliveira Rodrigues. **Síntese, caracterização e estudo de mecanismos de ação de peptídeos análogos à Melitina**. 2026. Trabalho de conclusão de curso em Farmácia – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2026.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

48TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOPHYSICAL SOCIETY, 2024, (São Paulo). Evaluation of the Antimicrobial Potencial of Dimeric Peptides Analogous to the Peptide (p-BthTX-I)₂K. 2024. (Apresentação de pôster – Congresso).

53RD ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (SBBq), 2024, (Águas de Lindóia). Evaluation of the Antimicrobial Potencial of Dimeric Peptides Analogous to the Peptide (p-BthTX-I)₂K. 2024. (Apresentação de pôster – Congresso).

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente, minha mãe Maria Julia e meu marido Gabriel que foram meu suporte e amparo para que eu pudesse chegar até o presente momento.

Agradeço especialmente meu pai, Aguinaldo, e meu avô Lauro que não estão mais presentes, mas sempre foram meus maiores incentivadores, meus modelos e peças fundamentais em meu desenvolvimento e formação pessoal.

Meu agradecimento também ao meu orientador, Norival Alves Santos Filho, que acreditou em mim e se fez presente a todo tempo, me auxiliando e me incentivando desde a iniciação científica, em toda minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao grupo LEPepBio e especialmente às minhas amigas e parceiras de laboratório, Letícia, Ariani e Louise, por terem me acolhido e me ensinado tanto, me aconselhado e compartilhado tantas histórias e momentos ao longo desses anos.

Por fim, agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver um mestrado de qualidade e pelo suporte que me foi dado ao longo destes anos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A resistência a antimicrobianos é um processo natural que ocorre com a evolução de microrganismos; entretanto o uso incorreto e indiscriminado de antibióticos tem causado aumento exponencial no número de casos, sendo considerado pela OMS como uma das 10 principais ameaças à saúde global desde 2019. Neste âmbito as bactérias ESKAPE se destacam como as maiores causadoras de infecções bacterianas multirresistentes com elevada taxa de mortalidade e dificuldade de tratamentos eficientes. O cenário atual da multirresistência gera a urgente necessidade de alternativas terapêuticas aos antibióticos convencionais, e neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como candidatos promissores devido à sua natureza catiônica, caráter anfipático e interação seletiva com membranas bacterianas. Estes peptídeos são provenientes de fontes naturais como plantas, bactérias e animais, sendo os peptídeos derivados de miotoxinas de serpentes um dos grupos mais abundantes. Este trabalho aborda a síntese e avaliação do potencial antimicrobiano de peptídeos diméricos derivados da região C-terminal de miotoxinas de serpentes do tipo Lys⁴⁹ fosfolipase A₂, tendo como principal objetivo a otimização da síntese e boa atividade antimicrobiana. Neste trabalho, os peptídeos são dímeros análogos ao peptídeo (p-BthTX-I)₂K e foram obtidos através da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, utilizando um resíduo de lisina na porção C-terminal para a obtenção do dímero, seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência e confirmação do material obtido por espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima frente as bactérias ESKAPE, além da avaliação da atividade antifúngica. Também foram realizados ensaios de atividade hemolítica em eritrócitos humanos e MTT em linhagens celulares em busca da determinação da toxicidade dos peptídeos, estabilidade em soro sanguíneo para avaliação da degradação frente as proteases e permeabilização de vesículas, mimetizando a interação dos peptídeos com a membrana celular como possível mecanismo de ação, além da espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência com variação de temperatura para determinação da estrutura secundária e possíveis mudanças conformacionais pela degradação dos peptídeos. Os resultados obtidos indicaram que os peptídeos diméricos apresentam atividade antimicrobiana significativa, seletiva para determinadas cepas, com baixa citotoxicidade nas concentrações avaliadas e sem toxicidade na atividade hemolítica, além de comportamento concentraçã-

dependente na permeabilização de vesículas, sugerindo atuação interna após a permeabilização da membrana celular como possível mecanismo de ação. Assim, os peptídeos derivados da região C-terminal de miotoxinas de serpentes apresentam caráter promissor para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana, com foco nas bactérias onde os peptídeos LC2202 e LC2203 apresentaram melhores resultados de inibição, contribuindo para o avanço na produção de novos fármacos e no desenvolvimento de novos peptídeos com potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: peptídeos; peptídeos antimicrobianos; dímeros; peptídeos síntese; biotecnologia.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is an inherent property of microorganisms that occur as a result of their evolutionary adaptation to antimicrobial agents. However, the incorrect and indiscriminate use of antibiotics has caused an exponential increase in the number of cases and has been considered by the WHO as one of the 10 main threats to global health since 2019. In this context, ESKAPE bacteria are a prominent cause of multidrug-resistant bacterial infections, which are associated with high mortality rates and the challenge of identifying effective treatments. The present context of multidrug resistance necessitates the development of therapeutic alternatives to conventional antibiotics and in this regard, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising therapeutic option due to their cationic nature, amphipathic character, and selective interaction with bacterial membranes. These peptides are derived from natural sources, including plants, bacteria, and animals, with peptides derived from snake myotoxins representing one of the most abundant groups. This work addresses the synthesis and evaluation of the antimicrobial potential of dimeric peptides derived from the C-terminal region of Lys⁴⁹ phospholipase A₂ snake myotoxins, with the main objective of optimizing synthesis and good antimicrobial activity. In this study, the peptides are dimers analogous to the peptide (p-BthTX-I)₂K. These peptides were obtained through Solid Phase Peptide Synthesis, using a lysine residue in the C-terminal portion to obtain the dimer. The peptides were then purified by high-performance liquid chromatography and confirmed by mass spectrometry. Antimicrobial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations against ESKAPE bacteria, in addition to evaluating antifungal activity. Hemolytic activity assays were also performed on human erythrocytes and MTT on cell lines to determine the toxicity of the peptides, stability in blood serum to evaluate degradation against proteases and vesicle permeabilization, mimicking the interaction of peptides with the cell membrane as a possible mechanism of action, in addition to circular dichroism spectroscopy and fluorescence with temperature variation to determine the secondary structure and possible conformational changes due to peptide degradation. Results obtained indicated that dimeric peptides have significant antimicrobial activity, selective for certain strains, with low cytotoxicity at the concentrations evaluated and no toxicity in hemolytic activity, in addition to concentration-dependent behavior in vesicle permeabilization, suggesting internal action after cell membrane permeabilization as a possible mechanism of

action. Consequently, peptides derived from the C-terminal region of snake myotoxins demonstrate considerable potential for the development of novel antimicrobial drugs, specifically for bacteria where peptides LC2202 and LC2203 exhibited the most pronounced inhibition results, thereby contributing to advancements in the production of new drugs and the development of new peptides with antimicrobial potential.

Keywords: peptides; antimicrobial cationic peptides; dimers; peptides synthesis; biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil cromatográfico em HPLC analítico (A, B) e LCMS (C, D) da dimerização do peptídeo p-BthTX-I pela oxidação dos resíduos de cisteína. O peptídeo foi diluído em tampão contendo 0,1 M de bicarbonato de amônio sob agitação por 24 h. Para avaliar a possibilidade de dimerização em meio de cultura, a solução utilizada foi meio MHB pH 7,2 e a solução estoque de peptídeo em concentração de 1 mg/mL foi incubada por 24 h a 37°C.28
- Figura 2.** Espectro de dicroísmo circular dos peptídeos A) p-BthTX-I e B) (p-BthTX-I)₂ em diferentes soluções. C) Ensaio de permeabilização em vesícula do monômero e dímero em diferentes concentrações para os lipídeos POPC:POPG (95:5%) e POPE:POPG (80:20%). D) Espectro de fluorescência para o dímero (p-BthTX-I)₂ em diferentes concentrações de LPC.29
- Figura 3.** Perfis de estabilidade em soro sanguíneo dos peptídeos A) p-BthTX-I e B) (p-BthTX-I)₂ nos tempos indicados. Os perfis foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 de fase reversa, com método de 5-95% de solução B em 15 min, fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.30
- Figura 4.** Cromatograma comparando os perfis de degradação em soro sanguíneo do peptídeo (p-BthTX-I)₂ com os perfis cromatográficos dos peptídeos sintetizados des-Lys¹,Lys²-(p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂. Os perfis foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 de fase reversa, método de 5-95% de solução B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.31
- Figura 5.** Esquema das sequências peptídicas sintetizadas e a variação da atividade antimicrobiana com as mudanças na sequência.34
- Figura 6.** Atividade hemolítica para o peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K. Como controle positivo para 100% de hemólise foi utilizado Triton X-100 1%.34
- Figura 7.** Espectroscopia de dicroísmo circular do peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K com varredura entre 190 e 260 nm para três soluções diferentes (H₂O, LPC, TFE).35
- Figura 8.** Avaliação da atividade antibacteriana do peptídeo pC-CoaTX-II em comparação com a miotoxina CoaTX-II (190 µM). Quantificado por espectrofotometria

a 595 nm para observar a capacidade do peptídeo de inibir o crescimento bacteriano nas linhagens testadas.....	36
Figura 9. Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS).....	40
Figura 10. Estrutura molecular da Lisina acoplada ao suporte polimérico (resina). As regiões circuladas em roxo são as aminas onde ocorrem os acoplamentos (α -amina e ϵ -amina).....	41
Figura 11. Representação da disposição dos peptídeos e controle nas placas de 96 poços para a diluição e, posteriormente, para a drogagem das células.....	47
Figura 12. Ilustração das sequências de aminoácidos dos peptídeos LC2202 e LC2203 após a finalização da síntese através da lisina Fmoc-Lys(Fmoc)OH para a obtenção dos dímeros.....	52
Figura 13. Perfil cromatográfico do peptídeo A) LC2202 bruto e B) LC2202 puro. Os perfis foram obtidos em corrida de 30 minutos com gradiente de 5-95% de solução B com fluxo de 1,0 mL/min. As soluções utilizadas foram: solução A (0,045% de TFA em H ₂ O ultrapura) e solução B (0,036% de TFA em H ₂ O ultrapura).	53
Figura 14. Perfil cromatográfico do peptídeo A) LC2203 bruto e B) LC2203 puro. Os perfis foram obtidos em corrida de 30 minutos com gradiente de 5-95% de solução B com fluxo de 1,0 mL/min. As soluções utilizadas foram: solução A (0,045% de TFA em H ₂ O ultrapura) e solução B (0,036% de TFA em H ₂ O ultrapura).	53
Figura 15. Espectro de massas em modo positivo para o peptídeo LC2202. Em amarelo estão destacadas as massas referentes ao peptídeo para cada íon.	55
Figura 16. Espectro de massas em modo positivo para o peptídeo LC2203. Em amarelo estão destacadas as massas referentes ao peptídeo para cada íon.	55
Figura 17. Gráfico da atividade hemolítica para os peptídeos LC2202 (rosa) e LC2203 (azul). Como controle positivo de hemólise (CP) foi utilizado Triton X-100 1% (v/v).	59
Figura 18. Perfil cromatográfico da degradação do peptídeo LC2202 em soro sanguíneo. O detalhe ao lado do cromatograma mostra a degradação do peptídeo nos tempos medidos de forma detalhada. Para análise de degradação os perfis dos diferentes tempos foram obtidos em corrida de 30 minutos cada um com gradiente de 5-95% de solução B com fluxo de 1,0 mL/min. Para isso, foram utilizadas solução A (0,045% de TFA em H ₂ O ultrapura) e solução B (0,036% de TFA em H ₂ O ultrapura).	61
Figura 19. Perfil cromatográfico da degradação do peptídeo LC2203 em soro sanguíneo. O detalhe ao lado mostra o perfil da degradação do peptídeo, de forma	

ampliada, nos tempos medidos e a formação dos produtos de degradação. Para análise de degradação os perfis dos diferentes tempos foram obtidos em corrida de 30 minutos cada um com gradiente de 5-95% de solução B com fluxo de 1,0 mL/min. Para isso, foram utilizadas solução A (0,045% de TFA em H₂O ultraultrapura) e solução B (0,036% de TFA em H₂O ultrapura).....62

Figura 20. Gráfico de viabilidade celular para a linhagem HEK293T após a drogagem com o peptídeo LC2202 por 24 h e 48 h. O controle de viabilidade utilizado foi a própria linhagem celular tratada com meio de cultura contendo água ultrapura seguindo a mesma metodologia utilizada para os peptídeos.63

Figura 21. Gráfico de viabilidade celular para a linhagem HEK293T após a drogagem com o peptídeo LC2203 por 24 h e 48 h. O controle de viabilidade utilizado foi a própria linhagem celular tratada com meio de cultura contendo água ultrapura seguindo a mesma metodologia utilizada para os peptídeos.64

Figura 22. Gráfico de viabilidade celular para a linhagem HaCaT após a drogagem com o peptídeo LC2202 por 24 h e 48 h. O controle de viabilidade utilizado foi a própria linhagem celular tratada com meio de cultura contendo água ultrapura seguindo a mesma metodologia utilizada para os peptídeos.65

Figura 23. Gráfico de viabilidade celular para a linhagem HaCaT após a drogagem com o peptídeo LC2203 por 24 h e 48 h. O controle de viabilidade utilizado foi a própria linhagem celular tratada com meio de cultura contendo água ultrapura seguindo a mesma metodologia utilizada para os peptídeos.65

Figura 24. Gráfico da permeabilização em vesículas de 100% POPC nas concentrações de 128 µg/mL, 32 µg/mL e 4 µg/mL para os peptídeos A) LC2202 e B) LC2203 representados pela Intensidade (porcentagem de CF liberada) x Tempo. ...68

Figura 25. Gráfico da permeabilização em vesículas de 80% POPC + 20% POPG nas concentrações de 128 µg/mL, 32 µg/mL e 4 µg/mL para os peptídeos A) LC2202 e B) LC2203 representados pela Intensidade (porcentagem de CF liberada) x Tempo. ...68

Figura 26. Dicroísmo Circular para os peptídeos A) LC2202 e B) LC2203 com varredura entre 195 e 260 nm para três soluções diferentes (PBS, LPC, TFE).69

Figura 27. (A) Espectros de fluorescência dos peptídeos LC2202 e LC2203 a 0.5 mg/ml pH 7.0 em função da temperatura; (B) Área normalizada dos espectros de fluorescência em função da temperatura dos espectros de fuorescência dos peptídeos LC2202, LC2203.71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos peptídeos: síntese e purificação. 27

Tabela 2. Atividade biológica dos quatro peptídeos utilizados no estudo. Os valores de concentrações apresentados se referem a concentração inibitória mínima (CIM) (CIM) para as cepas *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, a concentração responsável por produzir 50% de hemólise (HC₅₀), a média geométrica das concentrações de CIM (GM) e o índice terapêutico, calculado pela razão da HC₅₀ sobre a GM (TI).28

Tabela 3. Características dos peptídeos sintetizados no estudo. Os valores de tempos de retenção foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 em fase reversa, método de 5-95% de solução B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.31

Tabela 4. Atividade biológica dos peptídeos sintetizados. Os valores de concentrações apresentados se referem a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. HC₅₀ refere-se à concentração responsável por produzir 50% de hemólise.....32

Tabela 5. Atividade biológica dos peptídeos (p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂. Os valores referem-se à concentração bactericida mínima (CIM) e a concentração inibitória mínima (CBM).32

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do peptídeo p-BthTX-I e dos peptídeos análogos sintetizados.33

Tabela 7. Comparativo das propriedades e sequências dos peptídeos p-BthTX-I (Santos-Filho et. al., 2015) e pC-CoaTX-II (Almeida et. al., 2018). Dadas as semelhanças, espera-se que as mesmas mudanças realizadas no peptídeo p-BthTX-I apresentem resultados semelhantes quando aplicadas ao pC-CoaTX-II.....36

Tabela 8. Comparativo das propriedades dos peptídeos p-BthTX-I, pC-CoaTX-II e da região entre os resíduos 115 a 129 da miotoxina BaMtx, denominado na tabela como p-BaMtx.37

Tabela 9. Conversão das concentrações utilizadas dos peptídeos LC2202 e LC2203 nos ensaios de MTT de µM para a concentração padrão adotada (µg/mL).48

Tabela 10. Códigos, sequências e massas molares dos peptídeos sintetizados e seus análogos.....51

Tabela 11. Informações relevantes e método de purificação utilizado para cada peptídeo.	53
Tabela 12. Razão massa/carga (m/z) e íons correspondentes para o peptídeo LC2202. A massa molar deste peptídeo é de 3148,74 g/mol.....	55
Tabela 13. Razão massa/carga (m/z) e íons correspondentes para o peptídeo LC2203. A massa molar deste peptídeo é de 2820,51 g/mol.....	56
Tabela 14. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os peptídeos LC2202 e LC2203 para linhagens gram-positivas e gram-negativas. Na tabela, estão indicadas em branco as cepas gram-positivas das bactérias multirresistentes e em cinza as bactérias gram-negativas. N.D. corresponde aos ensaios onde não foi possível determinar a concentração inibitória ou bactericida por estarem acima da concentração maior concentração testada. N.R. indica que os ensaios para determinada linhagem não foram realizados.	57
Tabela 15. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima para os peptídeos LC2202 e LC2203 para as cepas de <i>C. albicans</i> suscetível e resistente à Fluconazol, respectivamente.....	58

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1	ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA	23
1.2	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	25
1.3	FOSFOLIPASE A ₂ LYS ⁴⁹ E PEPTÍDEOS DERIVADOS	26
1.4	PEPTÍDEOS ANÁLOGOS	27
2.	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA (SPFS)	39
3.2	PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/HPLC).....	42
3.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	42
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICÍDA MÍNIMA (CBM).....	43
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICÍDA MÍNIMA (CFM) PARA <i>CANDIDA ALBICANS</i>	44
3.6	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	44
3.7	ESTABILIDADE EM SORO SANGUÍNEO	45
3.8	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT	46
3.9	PERMEABILIZAÇÃO EM VESÍCULAS	48
3.10	ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	49
3.11	ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA DE ESTABILIDADE EM TEMPERATURA	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE TRABALHO	51
4.1.1	Síntese De Peptídeos Em Fase Sólida (SPFS).....	51
4.1.2	Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) 52	
4.1.3	Espectrometria de Massas	54
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICÍDA MÍNIMA (CBM).....	56

4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICÍDA MÍNIMA (CFM)	58
4.4	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	59
4.5	ESTABILIDADE EM SORO SANGUÍNEO.....	60
4.6	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT	63
4.7	PERMEABILIZAÇÃO EM VESÍCULAS	67
4.8	ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	68
4.9	ANÁLISE DE ESTABILIDADE POR FLUORESCÊNCIA.....	70
5.	CONCLUSÃO	72
6.	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA

Antimicrobianos (como antibióticos, antifúngicos e outros) são medicamentos utilizados para tratamento e prevenção de doenças microbianas em humanos, animais e, até mesmo, em plantas. A resistência a essa classe é um processo natural desenvolvido ao longo do tempo com a evolução de bactérias, fungos e protozoários, principalmente por alterações genéticas desses microrganismos. O crescimento anormal e descontrolado causado, especialmente, por conta do uso inadequado e indiscriminado dos antimicrobianos na área da saúde, na agropecuária, pela falta de acesso a saneamento básico e pela indústria alimentícia, ocasiona o surgimento acelerado de bactérias e outros organismos multirresistentes, desencadeando um problema grave de saúde pública global (Tang; Millar; Moore, 2023). Esse fenômeno compromete a eficácia dos tratamentos com antimicrobianos convencionais, tornando-os pouco ou nada eficientes e fazendo com que o número de casos graves e de mortes por este motivo aumente exponencialmente. Desde 2019, a resistência à antimicrobianos é tratada pela OMS como uma das dez principais ameaças a saúde no mundo, principalmente em países menos desenvolvidos, sendo uma das três maiores prioridades nos tratamentos de saúde global, causando em média 1,27 milhões de mortes mundialmente (OMS, 2023; Golli et al., 2025).

Durante a pandemia de COVID-19 e após este período, principalmente pelo uso exagerado, e muitas vezes desnecessário, de antibióticos, a resistência a antimicrobianos se tornou uma questão ainda mais preocupante com a incidência de novas bactérias multirresistentes, infecções bacterianas mais resistentes que as anteriores e mais difíceis de serem tratadas com os medicamentos convencionais já conhecidos (Das; Gladston; Silvanose, 2023). Também neste período, foram relatadas como maiores causadoras de sepse e altos níveis de mortalidade as Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE) e cepas de *Acinetobacter baumannii* (Golli et al., 2025). Um estudo global de 2022 do The Lancet estimou que 7,7 milhões de mortes em 2019 estavam associadas a infecções bacterianas e, destas, cerca de 54,9% estão associadas a seis patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e, posteriormente, *Acinetobacter baumannii* (Murray et al., 2022). Estes patógenos pertencem à um grupo de bactérias conhecido como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter spp*), acrônimo para as primeiras bactérias identificadas como multirresistentes, que “escapam” da ação dos medicamentos. Este grupo é o maior causador das infecções bacterianas conhecidas atualmente e possui dentre suas linhagens, cepas multirresistentes que estão listadas pela OMS como principais patógenos de multirresistência (Bicho et al., 2024). Além destas, algumas classificações atuais também incluem a *Escherichia coli* como pertencente ao grupo (Li et al., 2025). Dentre as ESKAPE, encontram-se as bactérias gram-negativas citadas no estudo de 2022 do The Lancet (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*), elencadas como mais incidentes nas infecções hospitalares graves ao redor do mundo entre 2019 e 2021 em um estudo realizado pela EUROACT-2, sendo estas também, com maior dificuldade de resultados para os tratamentos disponíveis (Golli et al., 2025).

Em consequência do aumento da resistência a antimicrobianos, desde 2022 infecções bacterianas consideradas comuns (como ISTs, sepse, infecções do trato urinário) já são notificadas pela OMS com altas taxas de resistência aos tratamentos com antibióticos usuais, resultando em cerca de 700 mil mortes por ano de infecções causadas por microrganismos multirresistentes (Lata et al., 2023). Neste cenário, estima-se que, se nada for feito, até 2050 o número de mortes chegará a 10 milhões por ano, gerando um custo de aproximadamente U\$100 trilhões (OMS, 2023).

Para frear os possíveis danos à saúde global, a OMS em parceria com as Nações Unidas e outras organizações, estabeleceram protocolos e metas a serem realizadas para contenção e monitoramento dos usos de antibióticos, além de planos de controle específicos que cada país deverá implementar. Contudo, ainda se faz necessário investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos que supram as necessidades para o tratamento dos crescentes quadros de resistências (Tang; Millar; Moore, 2023).

Tendo em vista que nenhuma classe de antibióticos apresentou evolução nos últimos 25 anos e que para se obter resultados um pouco melhores com relação à resistência a antimicrobianos nos tratamentos atuais é necessário combinar medicamentos (Wang et al., 2022), a comunidade científica busca soluções para as terapias e cura das infecções causadas por microrganismos resistentes. As indústrias privadas e instituições públicas prezam por alternativas modernas, com estrutura e mecanismos de ação bem definidos e, principalmente, que possuam alta biocompatibilidade com o hospedeiro. Mas também é essencial que sejam estratégias

baratas e que não se tornem facilmente obsoletas. Tendo estes critérios em vista, os peptídeos surgem como pesquisa promissora no campo de antimicrobianos (Lata et al., 2023).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que se destacam por sua grande biodisponibilidade, possibilidade de síntese facilitada, custo reduzido e pelo amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus, fungos e parasitas. Além dos mecanismos de ação eficientes, já conhecidos e estudados que minimizam a chance de resistência (Mazurkiewicz-Pisarek; Baran; Ciach, 2023).

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são geralmente compostos por 10 a 50 resíduos de aminoácidos (Hsu et al., 2024) e classificados de acordo com sua estrutura, sequência ou mecanismo de ação. São divididos em quatro grupos, segundo suas características estruturais: PAMs α -helicoidais, PAMs de folha- β (geralmente ricos em leucina, alanina, glicina e lisina), PAMs de estrutura $\alpha\beta$ e PAMs com estruturas estendidas ou não- $\alpha\beta$ (ricos em glicina, prolina e triptofano) (Hafeez et al., 2021). Geralmente, os PAMs são catiônicos (cargas de +2 a +13), o que permite sua melhor interação com a membrana celular de bactérias. São anfifílicos, solúveis em água, com baixo peso molecular e geralmente possuem alta resistência a temperatura e baixa toxicidade em células eucarióticas (Luo; Song, 2021). A classe de PAMs mais amplamente encontrada são os α -hélice catiônicos, que atuam através das interações eletrostáticas. A relação estrutura-atividade dos PAMs mostrou que propriedades como estrutura secundária, carga, anfipaticidade e hidrofobicidade são de extrema importância para a atividade biológica (Chen; Jiang, 2023). Possuem mecanismos de ação variados, podendo ser divididos em dois grandes grupos: mecanismos de morte direta e mecanismos de imuno modulação. Os mecanismos de morte direta são mais comumente observados, agindo diretamente no rompimento da membrana ou permeando-a através de interações eletrostáticas de forma a interagir com o conteúdo intracelular (Kumar; Kizhakkedathu; Straus, 2018).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser derivados de seres procarióticos e eucarióticos, como bactérias, insetos, répteis e mamíferos, e possuem um amplo espectro de ação, sendo usados como bactericidas, antitumorais, antivirais, antifúngicos, para imuno modulação e até mesmo parar prevenir formação de biofilmes (Hafeez et al., 2021).

Os peptídeos estudados neste trabalho, especificamente, são derivados de venenos de serpentes.

1.3 FOSFOLIPASE A₂ LYS⁴⁹ E PEPTÍDEOS DERIVADOS

Aproximadamente 90% das moléculas presentes nos venenos de serpentes são proteínas, como as fosfolipases A₂, metaloproteases, serino-proteases, desintegrinas, entre outras (Tasoulis; Isbister, 2017). Dentre elas, a família das Fosfolipase A₂ (PLA₂) vem sendo amplamente estudada, principalmente por suas diferentes funções e estruturas apresentadas. Sua isoforma principal tem atividade catalítica e possui a capacidade de hidrolisar a ligação éster da posição sn-2 dos fosfolipídeos, formando moléculas de ácidos graxos e lisofosfolipídeos (Khan; Ilies, 2023). Entretanto, as PLA₂ são divididas em 16 grupos com estruturas e atividades distintas, presentes em espécies diferentes e subdivididas ainda em 6 famílias de acordo com a localização, funções fisiológicas e especificidade do substrato (PLA₂ secretada, PLA₂ citosólica, PLA₂ Ca²⁺ independente, PLA₂ PAF-acetilhidrolase, PLA₂ lisossomal) (Lomonte, 2023).

As Fosfolipase A₂ secretada se dividem em subgrupos, sendo os grupos PLA₂ IA e PLA₂ IIA encontrados principalmente em venenos de serpentes (Khan; Ilies, 2023). Este segundo grupo é subdividido em outros de acordo com o aminoácido encontrado na posição 49 da proteína, podendo ser eles: Asp⁴⁹, Lys⁴⁹, Arg⁴⁹, Ser⁴⁹, Asn⁴⁹ e Gln⁴⁹ (Lomonte, 2023). No entanto, os dois tipos mais comuns são PLA₂ Asp⁴⁹, onde a posição 49 é ocupada por um resíduo de Aspartato e apresenta importante atividade catalítica, e seu homólogo, presente apenas em serpentes da família *Viperidae*, PLA₂ Lys⁴⁹ que, apesar de não apresentar atividade enzimática, tem função citotóxica, miotóxica e efeitos antibacterianos e antifúngicos (Santos-Filho et al., 2015).

Em alguns estudos, segmentos de proteínas homólogas a Lys⁴⁹ foram analisadas e identificou-se uma região próxima ao C-terminal responsável pela atividade miotóxica e antimicrobiana (Lomonte et al., 1994). De acordo com Santos-Filho *et al.*, 2015, o que torna essa região responsável por grande parte da atividade antimicrobiana é a formação de dímero que ocorre naturalmente nos resíduos de cisteína devido a formação de pontes dissulfeto; visto que os monômeros correspondentes apresentavam menor atividade.

Diante disso, novos peptídeos foram sintetizados baseando-se nas miotoxinas de serpentes de PLA₂ Lys⁴⁹, com o objetivo de estudar suas funções antimicrobianas e,

principalmente, melhorar a toxicidade, seletividade e encurtar a sequência de aminoácidos, facilitando a síntese e comercialização da molécula. Neste cenário, peptídeos análogos (possuem mesma função sem possuírem a mesma origem), desenvolvidos através do *design* racional de moléculas, com modificações nos aminoácidos da sequência ou na quantidade de resíduos da cadeia peptídica foram sintetizados e testados pelo grupo, a fim de encontrar novas moléculas com potencial antimicrobiano que sejam promissoras.

1.4 PEPTÍDEOS ANÁLOGOS

Derivado da região C-terminal da Bothropstoxina-I, Santos-Filho et. al. (2015) sintetizou o peptídeo p-Bthtx-I e outros três análogos [(p-BthTX-I)₂, p-(Ser¹¹)-BthTX-I(COO⁻) e p-(Ser¹¹)-BthTX I(CONH₂)] (Tabela 1) para avaliar o efeito da dimerização na atividade antimicrobiana. Um dos peptídeos foi dimerizado pela oxidação da cisteína e outros dois monômeros foram sintetizados substituindo a molécula de cisteína da sequência por um resíduo de serina, sendo um peptídeo de C-terminal amidado e outro de carboxila livre na mesma região. O principal objetivo era avaliar o efeito da dimerização do peptídeo na atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, que foi comprovado quando esta mostrou-se aumentada para o dímero e minimizada para os peptídeos p-(Ser¹¹)-BthTX-I(COO⁻) e p-(Ser¹¹)-BthTX I(CONH₂) (Tabela 2). A hipótese era de que a dimerização seria de extrema importância para a atividade do peptídeo p-Bthtx-I e que as concentrações bactericidas apresentadas por ele, são derivadas da dimerização do próprio peptídeo em meio de cultura.

Tabela 1. Características dos peptídeos: síntese e purificação.

Peptídeo	Sequência	Tempo de Retenção (min)	Massa (Da)
p-(Ser ¹¹)-BthTX-I(COO ⁻)	KKYRYHLKPFCKK	8,26	1723,1
[p-(Ser ¹¹)-BthTX-I(CONH ₂)]	KKYRYHLKPFCKK-NH ₂	8,19	1723,0
p-BthTX-I	KKYRYHLKPFCKK	8,55	1739,1
(p-BthTX-I) ₂	(KKYRYHLKPFCKK) ₂	9,18	3476,2

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2015)

Tabela 2. Atividade biológica dos quatro peptídeos utilizados no estudo. Os valores de concentrações apresentados se referem a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, a concentração responsável por produzir 50% de hemólise (HC₅₀), a média geométrica das concentrações de CIM (GM) e o índice terapêutico, calculado pela razão da HC₅₀ sobre a GM (TI).

Linhagens	CIM (μmol/L)			
	p-(Ser ¹¹)-BthTX-I(COO ⁻)	[p-(Ser ¹¹)-BthTX-I(CONH ₂)]	p-BthTX-I	(p-BthTX-I) ₂
<i>E. coli</i>	128	128	16	4
<i>S. aureus</i>	>128	>128	64	32
<i>C. albicans</i>	>128	>128	>128	>128
HC ₅₀	>128	>128	>128	>128
GM	>128	>128	40	18
TI	nd	nd	6,4	28,4

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2015)

*nd: não determinado. Para as amostras que não apresentaram hemólise, foi utilizada concentração de 256 μmol/L para o cálculo do TI.

Ainda neste estudo, o peptídeo na forma monomérica foi incubado por 24 horas no mesmo meio de cultura utilizado para os ensaios antimicrobianos e em poucos minutos já foi possível observar a formação dos primeiros dímeros. Após 6 horas quase todos os monômeros haviam dimerizado e esta condição se manteve após as 24 horas, indicando que a forma dimerizada é a maior responsável pela atividade antimicrobiana observada (Figura 1).

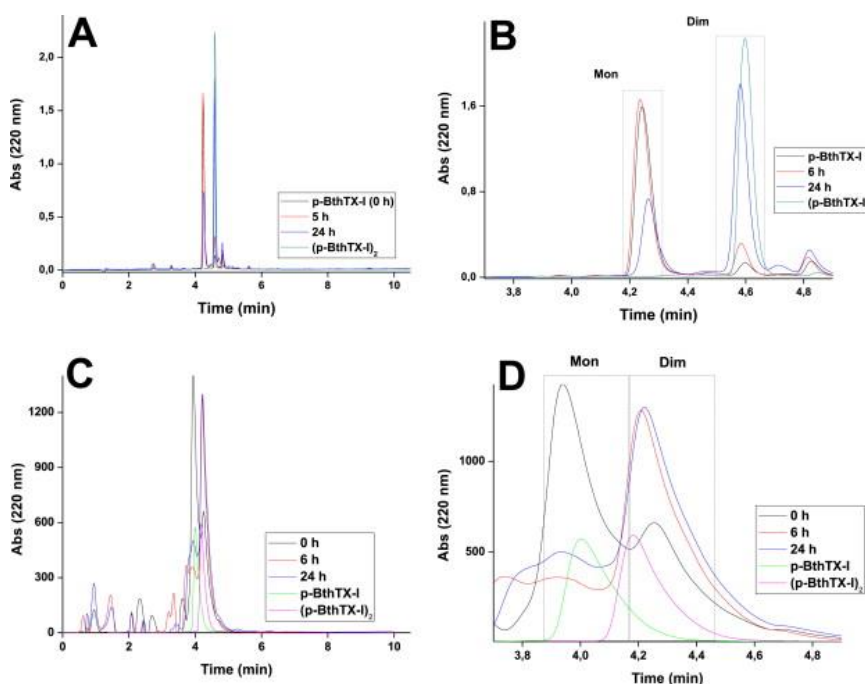


Figura 1. Perfil cromatográfico em HPLC analítico (A, B) e LCMS (C, D) da dimerização do peptídeo p-BthTX-I pela oxidação dos resíduos de cisteína. O peptídeo foi diluído em tampão contendo 0,1 M de bicarbonato de amônio sob agitação por 24 h. Para avaliar a possibilidade de dimerização em meio de cultura, a solução utilizada foi meio MHB pH 7,2 e a solução estoque de peptídeo em concentração de 1 mg/mL foi incubada por 24 h a 37°C.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2015)

Além disso, a espectroscopia de dicroísmo circular mostrou que os peptídeos p-BthTX-I e (p-BthTX-I)₂ não apresentam estrutura secundária definida em nenhum dos ambientes avaliados: tampão PBS, miméticos de membrana celular (LPC e POPC) e indutor de estruturação (TFE). O ensaio de fluorescência mostrou que o peptídeo (p-BthTX-I)₂ se mantém estável com a variação da concentração de LPC, sugerindo que seu mecanismo de ação não seja através da membrana celular, visto a baixa interação observada. Também neste trabalho, não foi observada atividade contra *C. albicans* e nem toxicidade contra células humanas, demonstrando possível especificidade para células procarióticas (Figura 2).

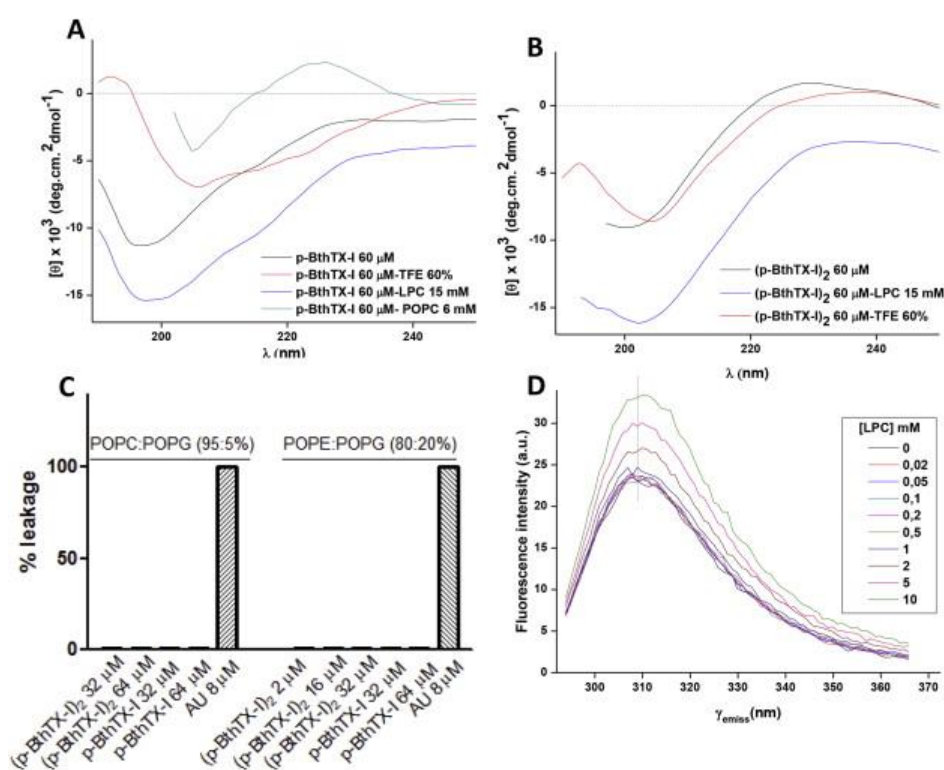


Figura 2. Espectro de dicroísmo circular dos peptídeos A) p-BthTX-I e B) (p-BthTX-I)₂ em diferentes soluções. C) Ensaio de permeabilização em vesícula do monômero e dímero em diferentes concentrações para os lipídeos POPC:POPG (95:5%) e POPE:POPG (80:20%). D) Espectro de fluorescência para o dímero (p-BthTX-I)₂ em diferentes concentrações de LPC.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2015)

Um estudo posterior publicado por Santos-Filho et al. (2017) observou através de ensaios de degradação em soro sanguíneo dos peptídeos p-BthTX-I e (p-BthTX-I)₂ que ambos apresentaram degradação acelerada nos primeiros 30 minutos (Figura 3). A espectrometria de massas confirmou que os produtos de degradação formados continham duas, três e quatro lisinas a menos na sequência, entretanto, um pico muito semelhante nos dois cromatogramas em 7,5 minutos, sugeriu a formação de um

mesmo produto de degradação para ambos os peptídeos. Após os 120 minutos decorridos, apenas o produto contendo quatro resíduos de lisina a menos foi observado, o mesmo com tempo de retenção idêntico para os dois peptídeos analisados.

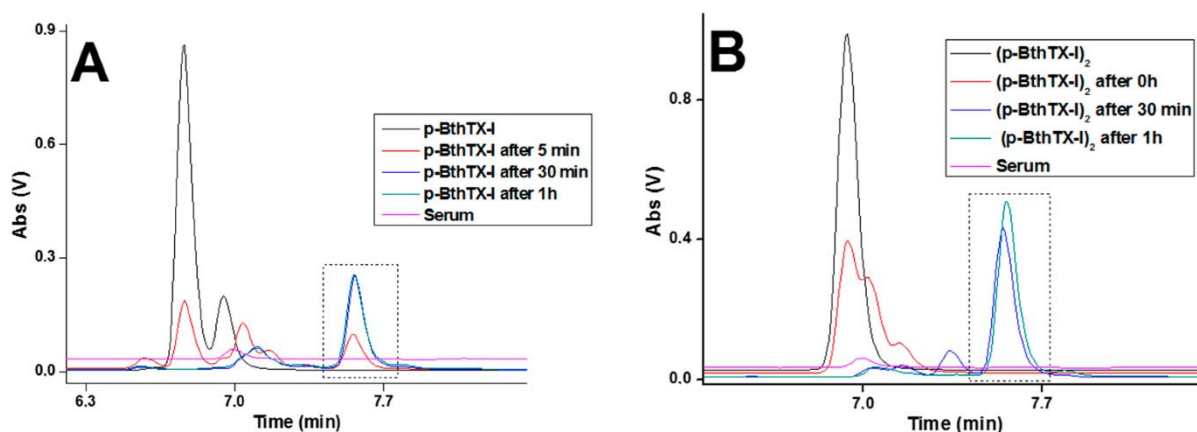


Figura 3. Perfis de estabilidade em soro sanguíneo dos peptídeos A) p-BthTX-I e B) (p-BthTX-I)₂ nos tempos indicados. Os perfis foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 de fase reversa, com método de 5-95% de solução B em 15 min, fluxo de 1 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2017)

Para que fosse possível identificar os resíduos degradados, o peptídeo (p-BthTX-I)₂ e outros quatro foram sintetizados e dimerizados por ligações dissulfeto seguidas da oxidação por ar: des-Lys¹³-(p-BthTX-I)₂, des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂, des-Lys¹,Lys²-(p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹-(p-BthTX-I)₂ (Tabela 3). Através de novo ensaio de degradação em soro foi possível comparar os tempos de retenção dos peptídeos sintetizados e dos perfis cromatográficos dos produtos de degradação, que, juntamente com a espectrometria de massas, confirmou que o produto estável era o peptídeo sem os quatro resíduos de lisina na região C-terminal (des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂) (Figura 4).

Tabela 3. Características dos peptídeos sintetizados no estudo. Os valores de tempos de retenção foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 em fase reversa, método de 5-95% de solução B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.

Peptídeo	Sequência	Tempo de Retenção* (min)	Massa (Da)
(p-BthTX-I) ₂	K K Y R Y H L K P F C K K	9,18	3476,2
des-Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂	K K Y R Y H L K P F C K -	10,91	3219,9
des-Lys ¹² ,Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂	K K Y R Y H L K P F C - -	11,35	2963,6
des-Lys ¹ ,Lys ² -(p-BthTX-I) ₂	- - Y R Y H L K P F C K K	10,87	3219,9
des-Lys ¹ -(p-BthTX-I) ₂	- K Y R Y H L K P F C K K	10,69	2963,6

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2017)

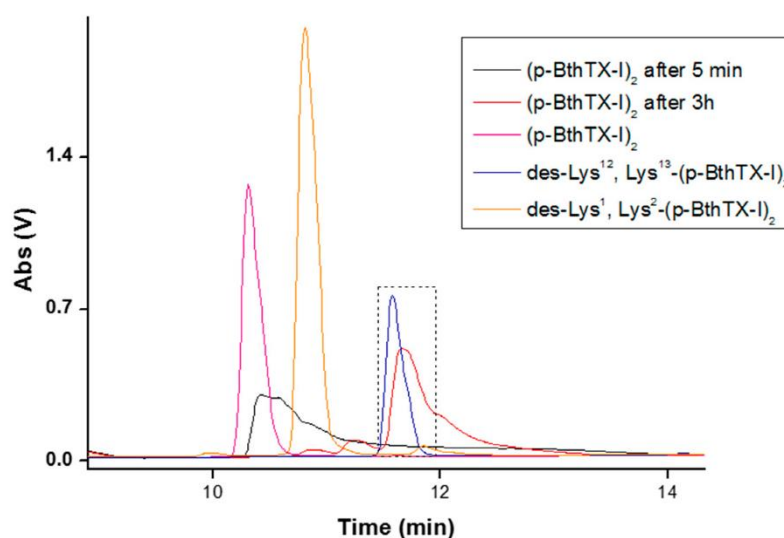


Figura 4. Cromatograma comparando os perfis de degradação em soro sanguíneo do peptídeo (p-BthTX-I)₂ com os perfis cromatográficos dos peptídeos sintetizados des-Lys¹,Lys²-(p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂. Os perfis foram obtidos em HPLC analítico com coluna C18 de fase reversa, método de 5-95% de solução B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm. Solução A: 0,045% de TFA em H₂O ultrapura. Solução B: 0,036% de TFA em acetonitrila.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2017)

*A caixa pontilhada indica o perfil cromatográfico do peptídeo des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂ e o produto de degradação estável obtido após 3 h.

Os peptídeos sintetizados foram avaliados quanto sua atividade antibacteriana e antifúngica (Tabela 4) e os peptídeos (p-BthTX-I), seu dímero e o peptídeo des-Lys¹², Lys¹³-(p-BthTX-I)₂ foram testados também para outras cepas multirresistentes, onde, em alguns casos, o peptídeo proveniente do produto de degradação apresentou melhores resultados (Tabela 5). Além disso, o estudo também avaliou a capacidade dos dois peptídeos diméricos ((p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹², Lys¹³-(p-BthTX-I)₂ de erradicar biofilmes de *S. epidermidis* e o ensaio de time-kill com a mesma bactéria foi conduzido para confirmar a ação bactericida dos dímeros. Nos dois casos, o dímero e o produto

de degradação apresentaram atividade bactericida em concentrações muito semelhantes.

Tabela 4. Atividade biológica dos peptídeos sintetizados. Os valores de concentrações apresentados se referem a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. HC₅₀ refere-se à concentração responsável por produzir 50% de hemólise.

Linhagem	CIM (μM)				
	(p-BthTX-I) ₂	des-Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂	des-Lys ¹² ,Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂	des-Lys ¹ ,Lys ² -(p-BthTX-I) ₂	des-Lys ¹ -(p-BthTX-I) ₂
<i>E. coli</i>	4	32	16	64	16
<i>S. aureus</i>	64	128	128	64	128
<i>C. albicans</i>	>128	>128	>128	>128	>128
HC ₅₀	>128	>128	>128	>128	>128

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2017)

Tabela 5. Atividade biológica dos peptídeos (p-BthTX-I)₂ e des-Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂. Os valores referem-se à concentração bactericida mínima (CIM) e a concentração inibitória mínima (CBM).

Linhagem bacteriana	p-BthTX-I		(p-BthTX-I) ₂		des-Lys ¹² ,Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂	
	CIM (μM)	CBM (μM)	CIM (μM)	CBM (μM)	CIM (μM)	CBM (μM)
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	128	512	16	64	32	32
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512	N.D.	512	512	128	256
<i>S. aureus</i> SA16	512	512	>512/256'	512	128	128
<i>S. aureus</i> SA33	512/>512'	>512	256/512'	512	128	256
<i>S. aureus</i> SA88	512	>512	256	256	256	512
<i>S. aureus</i> SA90	512/>512'	512	128	256	128/512'	512/512'
<i>E. faecium</i> VRE16	128	>512	32	>512	16	64
<i>E. faecium</i> HSJRP8	32	>512	8	>512	8	32
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	>512	N.D.	64	64	128/64	256/128
<i>K. pneumoniae</i> ATCCBAA1705	>512	N.D.	256	512	32	64
<i>K. pneumoniae</i> NDM-1	>512/512'	>512	256	512	256	512
<i>E. coli</i> ATCC35218	512	>512	512	512	64	256
<i>E. coli</i> CA4	>512	N.D.	256	512	64	128

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2017)

*N.D.: não determinado

Em estudo subsequente produzido por (Santos-Filho et al., 2021), novas formas de síntese para os análogos do (p-BthTX-I)₂ foram avaliadas, buscando a otimização do tempo de síntese e do custo de produção, além de avaliar também o efeito da mudança na sequência de aminoácidos para a atividade do peptídeo. Assim, foram sintetizados outros três peptídeos que tinham a região C e N-terminal alteradas de forma que a molécula final fosse ainda o peptídeo dimérico.

Para isso, a forma monomérica foi sintetizada (KKYRYHLKPFCKK) e parte da peptidil-resina foi utilizada para acoplar o resíduo de glutamina (Fmoc-Glu-OH) para a dimerização através da região N-terminal, visto que este resíduo possui dois grupos carboxílicos (alfa e delta). Para aumentar a estabilidade e atividade, o peptídeo

nomeado E(p-BthTX-I)₂ foi ciclizado através da oxidação do resíduo de cisteína. Já o peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K foi obtido utilizando como primeiro resíduo da região C-terminal uma lisina Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, que possui as aminas alfa e épsilon desprotegidas, ao invés da Cys¹¹, permitindo o crescimento simultâneo de duas cadeias peptídicas, evitando a etapa de oxidação necessária para a síntese que continha cisteína. Este método, além de facilitar o processo de síntese, aumentou a atividade antibacteriana do peptídeo.

Além destes, o peptídeo des-Lys¹,Lys²,Cys¹¹, Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K foi sintetizado e apresentou atividade bactericida mais baixa que seus análogos (Tabela 6), bem como o peptídeo E(p-BthTX-I)₂ que não apresentou muitas diferenças quando comparado com o peptídeo (p-BthTX-I)₂, evidenciando a importância da presença das lisinas nas posições um e dois na região N-terminal da sequência peptídica (Figura 5).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do peptídeo p-BthTX-I e dos peptídeos análogos sintetizados.

Linhagem bacteriana	p-BthTX-I		E(p-BthTX-I) ₂		des-Lys ¹ ,Lys ² ,Cys ¹¹ , Lys ¹² ,Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂ K		des-Cys ¹¹ ,Lys ¹² ,Lys ¹³ -(p-BthTX-I) ₂ K	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	128	>512	128	512	256	512	16	64
<i>S. aureus</i> ATCC25923	512	>512	>512	ND	>512	ND	128	256
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	512	>512	512	>512	>512	ND	28	>512
<i>E. faecium</i> ATCC700221	512	>512	256	512	128	>512	32	>128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	>512	ND	>512	>128	>512	ND	256	256
<i>E. coli</i> ATCC25922	>512	ND	256	ND	512	512	64	128
<i>A. baumannii</i> ATCC19606	>512	ND	>512	128	256	512	256	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>512	ND	>512	ND	>512	ND	>512	ND

Fonte: Adaptado de Santos-Filho et. al. (2021).

*ND: não determinado.

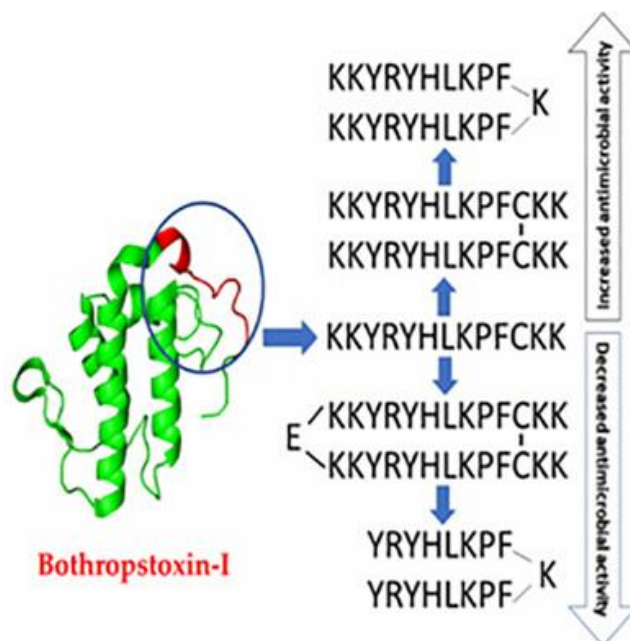


Figura 5. Esquema das sequências peptídicas sintetizadas e a variação da atividade antimicrobiana com as mudanças na sequência.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2021).

O estudo mostrou também que, como seus análogos, o peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K não apresentou hemólise significativa em nenhuma concentração testada (1 a 512 µg/mL) (Figura 6), bem como nenhuma ação na membrana celular bacteriana e nem apresentou estrutura secundária definida em água, trifluoroetanol (TFE) e lisofosfatidilcolina (LPC) (Figura 7).

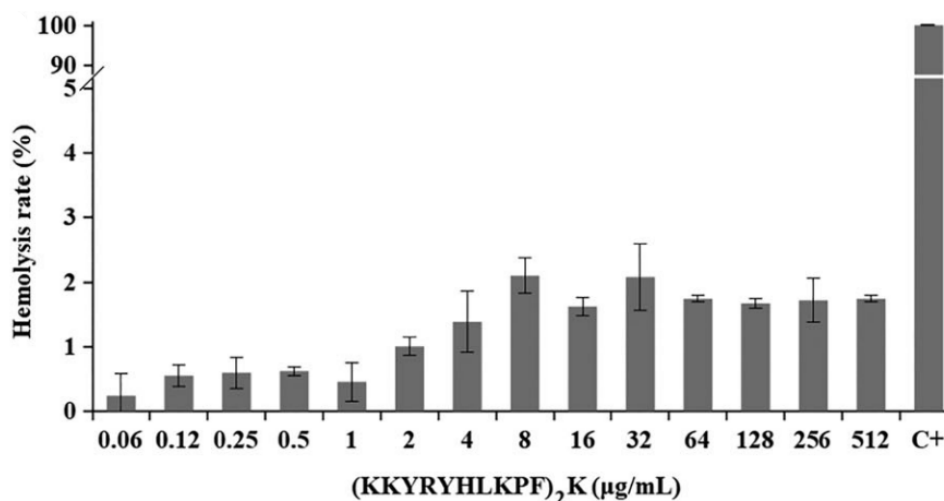


Figura 6. Atividade hemolítica para o peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K. Como controle positivo para 100% de hemólise foi utilizado Triton X-100 1%.

Fonte: Santos-Filho et. al. (2021).

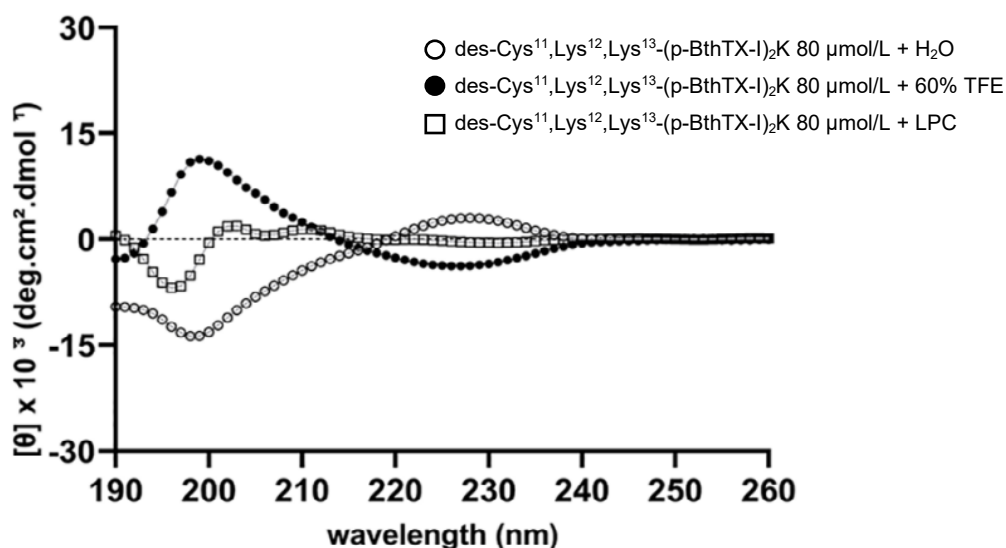


Figura 7. Espectroscopia de dicroísmo circular do peptídeo des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K com varredura entre 190 e 260 nm para três soluções diferentes (H₂O, LPC, TFE).

Fonte: Santos-Filho et. al. (2021).

Para concluir o estudo, Santos-Filho et. al. (2021) realizou ensaio de Ala Scan com o análogo de maior atividade (des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K) buscando avaliar se a substituição de resíduos positivos (K, R e H) ou aromáticos (Y e F) afetaria a atividade antibacteriana observada. Os resultados encontrados confirmaram que todas as substituições apresentaram menor potencial antimicrobiano que o análogo inicial, indicando que para este peptídeo, todos os aminoácidos da sequência possuem papel importante para a atividade.

Semelhante a outros PAMs encontrados na literatura derivados de PLA₂ de serpentes, o peptídeo análogo pC-CoaTX-II (KKYRIYPKFLCKK), pertencente a região da porção C-terminal (resíduos de 115 a 129) da miotoxina CoaTX-II de Lys⁴⁹ PLA₂, tem características catiônicas (carga líquida +6) e anfipáticas (hidrofobicidade estimada +18,33 kcal/mol) como já bem definido na classe dos PAMs e também observado no peptídeo (p-BthTX-I)₂. O peptídeo foi identificado, sintetizado e caracterizado por (Almeida et al., 2018) e possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes (Figura 8). Os ensaios *in silico* realizados no mesmo estudo para elucidar seu mecanismo de ação mostraram que o peptídeo parece atuar na membrana celular bacteriana, causando a formação de poros. As características semelhantes e a região da miotoxina a qual o peptídeo pC-CoaTX-II pertence (mesma região que o peptídeo p-BthTX-I) (Tabela 7) levam a crer que as mesmas características observadas e

melhorias realizadas para o peptídeo de Santos-Filho et. al. (2015) podem ser realizadas para o peptídeo pC-CoaTX-II, buscando aumentar sua atividade e facilitar sua síntese.

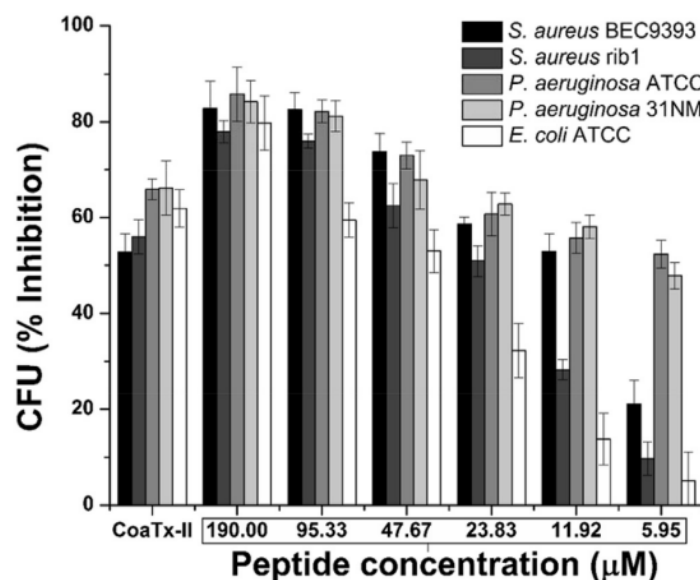


Figura 8. Avaliação da atividade antibacteriana do peptídeo pC-CoaTX-II em comparação com a miotoxina CoaTX-II (190 µM). Quantificado por espectrofotometria a 595 nm para observar a capacidade do peptídeo de inibir o crescimento bacteriano nas linhagens testadas

Fonte: Almeida et. al. (2018)

Tabela 7. Comparativo das propriedades e sequências dos peptídeos p-BthTX-I (Santos-Filho et. al., 2015) e pC-CoaTX-II (Almeida et. al., 2018). Dadas as semelhanças, espera-se que as mesmas mudanças realizadas no peptídeo p-BthTX-I apresentem resultados semelhantes quando aplicadas ao pC-CoaTX-II.

Peptídeo	Sequência	Massa (g/mol)	Carga líquida	Hidrofobicidade (kcal/mol)	Região molecular
p-BthTX-I	KKYRYHLKPFCKK	1739,1	+6	+18,56	C-terminal BthTX-I (115 a 129)
pC-CoaTX-II	KKYRIYPKFLCKK	1713,0	+6	+18,33	C-terminal CoaTx-II (115 a 129)

Fonte: Adaptado de Almeida et. al. (2018); Santos-Filho et. al. (2015).

A miotoxina BaMtx de Lys⁴⁹ PLA₂ presente em serpentes *Bothrops atrox*, já isolada, identificada e caracterizada quanto a sua atividade anticâncer por Proleón et al. (2022), também apresenta em sua região C-terminal, entre os resíduos 115 a 129, uma sequência de aminoácidos semelhante aos peptídeos já citados neste trabalho (Tabela 8). Entretanto, ainda não existem estudos publicados que mencionem o peptídeo derivado desta região da miotoxina BaMtx, limitando assim a comparação dos resultados obtidos neste trabalho para esta miotoxina e abrindo espaço para

síntese futura deste peptídeo como forma de comparação e enriquecimento de deste estudo.

Tabela 8. Comparativo das propriedades dos peptídeos p-BthTX-I, pC-CoaTX-II e da região entre os resíduos 115 a 129 da miotoxina BaMtx, denominado na tabela como p-BaMtx.

Peptídeo	Sequência	Massa (g/mol)	Carga líquida
p-BthTX-I	KKYRYHLKPFCKK	1739,1	+6
pC-CoaTX-II	KKYRIYPKFLCKK	1713,0	+6
p-BaMtx	KKYRYNYLKPFCCK	1879,3*	+6*

Fonte: Adaptado de Almeida et. al. (2018); Poleón et. al. (2022); Santos-Filho et. al. (2015);

ProtParam – Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

*A massa molar e carga líquida para p-BaMtx foram obtidas utilizando o software ProtParam Expasy.

Neste trabalho, os peptídeos de interesse são derivados das miotoxinas de Fosfolipase A₂ de Lys⁴⁹, BaMtx e CoaTX-II - provenientes de duas serpentes, *Bothrops atrox* e *Crotalus oreganus abyssus*, respectivamente. Tendo como base os resultados obtidos por Santos-Filho et. al. (2015; 2017; 2021) e levando em conta as características já observadas na literatura para peptídeos antimicrobianos (PAMs), este trabalho visa a síntese dos peptídeos diméricos análogos ao (p-BthTX-I)₂K da forma descrita por Santos-Filho et. al (2021), substituindo a dimerização por cisteína pela dimerização por lisina. Os análogos das miotoxinas BaMtx e CoaTX-II serão avaliados quanto sua atividade antimicrobiana, toxicidade, estabilidade, estrutura secundária e mecanismo de ação na membrana celular bacteriana, a fim de observar comportamento semelhante ou melhor que os análogos já caracterizados des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K e pC-CoaTX-II.

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo sintetizar os peptídeos diméricos análogos às miotoxinas BaMtx e CoaTX-II, por Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) através da dimerização por um resíduo de lisina (K) a avaliar a atividade antimicrobiana e toxicidade em células humanas, bem como sua estabilidade, estrutura secundária e mecanismo de ação.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Sintetizar os peptídeos:
 - des-Cys¹²,Lys¹³,Lys¹⁴-(BaMtx)₂K: (KKYRYNYLKPF)₂K
 - des-Cys¹¹,Lys¹²,Lys¹³-(pC-CoaTxII)₂K: (KKYRIYPKFL)₂K
- Purificar os peptídeos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC);
- Caracterizar o material obtido por Espectrometria de Massas;
- Determinar o potencial antimicrobiano e antifúngico através das Concentrações Inibitórias Mínimas;
- Avaliar a toxicidade em eritrócitos humanos;
- Observar a estabilidade dos peptídeos em soro sanguíneo;
- Analisar a citotoxicidade dos peptídeos em linhagens de células humanas (HEK-293-T e HaCat);
- Avaliar a ação dos peptídeos em membrana celular como possível mecanismo de ação através do ensaio de permeabilização em vesículas;
- Analisar a estabilidade dos peptídeos com a variação de temperatura através de fluorescência;
- Identificar as estruturas secundárias dos peptídeos sintetizados por Espectroscopia de Dicroísmo Circular.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. et al. A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. **European journal of medicinal chemistry**, v. 149, p. 248–256, 2018.
- ALMEIDA, J. R. et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 147–158, 2016.
- ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- BICHO, G. F. H. et al. Synthesis, characterization, and study of the antimicrobial potential of dimeric peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologs. **Toxins**, v. 16, n. 7, p. 308, 2024.
- BIN HAFEEZ, Ahmer *et al.* Antimicrobial peptides: An update on classifications and databases. [S. l.]: **MDPI**, 2021.
- BÖTTGER, R.; HOFFMANN, R.; KNAPPE, D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. **PLoS one**, v. 12, n. 6, p. e0178943, 2017.
- CESARO, Angela; TORRES, Marcelo Der Torossian; DE LA FUENTE-NUNEZ, Cesar. Methods for the design and characterization of peptide antibiotics. **Methods in Enzymology**, v. 663, p. 303–326, 2022.
- CHEN, N.; JIANG, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. **European journal of medicinal chemistry**, v. 255, n. 115377, p. 115377, 2023.
- DAS, Sibi; GLADSTON, Jibin; SILVANOSE, Christudas. **The silent pandemic by super pathogens during the COVID-19 pandemic**. 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20944/preprints202310.0197.v1>>.
- GOLLI, Andreea Loredana *et al.* Correction: Golli et al. The impact of the COVID-19 pandemic on the antibiotic resistance of gram-negative pathogens causing bloodstream infections in an intensive care unit. **Biomedicine**, v. 13, n. 4, p. 848, 2025.
- HSU, Chou-Yi *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs): New perspectives on their function in dermatological diseases. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 30, n. 3, 2024.
- KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KHAN, S. A.; ILIES, M. A. The phospholipase A2 superfamily: Structure, isozymes, catalysis, physiologic and pathologic roles. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 2, p. 1353, 2023.

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, 2018.

LATA, M. et al. Evolutionary and in silico guided development of novel peptide analogues for antibacterial activity against ESKAPE pathogens. **Current research in microbial sciences**, v. 4, n. 100183, p. 100183, 2023.

LI, Dmitriy *et al.* Next generation ESKAPE-E superbugs: identifying transmissible locus of stress tolerance and antibiotic resistance in pandemic bacterial lineages. **Npj Antimicrobials and Resistance**, v. 3, n. 1, p. 91, 2025.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the Cterminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 28, p. 3224–3230, 2010.

LOMONTE, Bruno. Lys49 myotoxins, secreted phospholipase A2-like proteins of viperid venoms: A comprehensive review. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 224, n. 107024, p. 107024, 2023.

LOMONTE, Bruno *et al.* Neutralizing Interaction between Heparins and Myotoxin 11, a Lysine 49 Phospholipase 4 from Bothrops asper Snake Venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29867–29873, 11 1994.

LUO, Ying; SONG, Yuzhu. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11401, 2021.

MAZURKIEWICZ-PISAREK, Anna; BARAN, Joanna; CIACH, Tomasz. Antimicrobial peptides: Challenging journey to the pharmaceutical, biomedical, and cosmeceutical use. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 9031, 2023.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase synthesis (Nobel lecture). **Angewandte Chemie. International edition in English**, v. 24, n. 10, p. 799–810, 1985.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. **Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections.** [S.l.: S.n.].

PROLEÓN, A. et al. Functional, immunological characterization, and anticancer activity of BaMtx: A new Lys49- PLA2 homologue isolated from the venom of Peruvian Bothrops atrox snake (Serpentes: Viperidae). **International journal of biological macromolecules**, v. 206, p. 990–1002, 2022

SANTAMARÍA, C. et al. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 7, p. 807–815, 2005.

SANTOS-FILHO, N. et al. Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTXI)₂ and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 11, p. 1898, 2017. 36

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of BothropstoxinI. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 103, p. 160–168, 2015.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Understanding the mechanism of action of peptide (pBthTX-I)₂ derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA2)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 196, p. 44–55, 2021.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX- I. **Peptide science (Hoboken, N.J.)**, v. 114, n. 2, 2021.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial resistance (AMR). **British journal of biomedical science**, v. 80, p. 11387, 2023.

TARAH, M.; ABDOLALIZADEH, L.; HEDAYATI, S. Mung bean protein isolate: Extraction, structure, physicochemical properties, modifications, and food applications. **Food chemistry**, v. 444, n. 138626, p. 138626, 2024.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

Ten health issues WHO will tackle this year. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>>. Acesso em: 26 apr. 2024.

WANG, Lei et al. Biological functions and applications of antimicrobial peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 23, n. 4, p. 226–247, 2022.

WHO outlines 40 research priorities on antimicrobial resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/22-06-2023-who-outlines-40-research-priorities-on-antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 26 apr. 2024.

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 26 apr. 2024

WU, Y.; ZHANG, G.; ZHOU, M. Inhibitory and anti-inflammatory effects of two antimicrobial peptides moronecidin and temporin-1Dra against *Propionibacterium*

acnes in vitro and in vivo. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 26, n. 7, 2020.