

MARINA RODRIGUES PEREIRA

Conjugação do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K à moléculas orgânicas e seus efeitos

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

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

P436c Pereira, Marina Rodrigues
Conjugação do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-
I)₂K à moléculas orgânicas e seus efeitos / Marina Rodrigues
Pereira. – Araraquara : [s.n.], 2021
67 f. : il.

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

1. Antibióticos peptídicos. 2. Dímeros.
3. Farmacorresistência bacteriana. 4. Peptídeos microbianos.
5. Bactérias patogênicas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Conjugação do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K às moléculas orgânicas e seus efeitos

AUTORA: MARINA RODRIGUES PEREIRA

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

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



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



Prof. Dr. ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN (Participação Virtual)
Unidade Acadêmica Ciências da Saúde / Universidade Federal de Jataí - UFJ – Jataí



Prof. Dr. VICTOR ALVES CARNEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Pós-Graduação da UFC / Centro Universitário INTA - Sobral

Araraquara, 08 de outubro de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Marina Rodrigues Pereira

Nome em citações bibliográficas: Pereira, M. R.; PEREIRA, M. R.;

Endereço Profissional: Prof. Francisco Degni, 55. Quitandinha. Araraquara-SP

Formação Acadêmica/Titulação: Bacharel em Química – Universidade Católica Unisalesiano Auxilium – 2017

Produção Bibliográfica:

Santos-Filho, N. A., Righetto, G. M., **Pereira, M. R.**, Piccoli, J. P., Almeida, L. M. T., Leal, T. C., Camargo, I. L. B. C., Cilli, E. M., **Pept. Sci.** 2021, e24243.
<https://doi.org/10.1002/pep2.24243>

Participação em eventos científicos:

I Web Encontro Nacional de Engenharia Química – julho de 2021 – Resumo Simples na área temática de Biotecnologia e Bioprocesso

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por iluminar a minha vida.

Aos meus pais Gilmar e Mara e aos meus irmãos Neto e Karina por todo o amor, amizade e incentivo em tudo que sempre me propus a realizar. A minha tia Miriam, pelo cuidado e amor. A todos meus primos, primas, e parentes mesmo que distantes sempre conversaram e me incentivaram direta ou indiretamente.

A minha cunhada, Ethiene e meu sobrinho Maurílio que nos trouxe mais alegria e disposição.

Aos meus amigos, Allan, Fernando, Luiz, Higor e Wallace, por toda a cumplicidade em momentos maravilhosos. A minha amiga Natalia que surgiu na pós-graduação e será para a vida, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Eduardo Maffud Cilli, pela amizade e o carinho em ensinar e por toda confiança depositada.

A todo o Instituto de Química que contribuíram diretamente ou indiretamente para esse trabalho.

A todos do grupo de pesquisa LaseBIO, Natalia Bittencourt, Paulo, Mariana, Leticia, Maria Carolina, Sarah, Augusto, Natalia Costa, Jeff e Júlia por todos os momentos maravilhosos, ensinamentos e cumplicidade.

Ao Thiago Vidotto pelos os ensinamentos na escrita científica. A Vox2You por todos os ensinamentos de oratória.

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

“A vida não é fácil para nenhum de nós... Devemos ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós mesmos.” (Marie Curie)

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são alternativas para o tratamento contra bactérias que apresentam resistência aos antibióticos comerciais utilizados atualmente. Os PAMs são oligopeptídeos, anfipáticos e, em sua maioria, quando dimerizados, aumentam sua atividade biológica de forma significativa. Neste trabalho, o peptídeo dimérico desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K, que apresenta atividade seletiva contra células procariontes, e dois bioconjugados contendo o ácido gálico e o ferroceno na extremidade N-terminal, foram sintetizados, purificados e caracterizados. Outras modificações também foram realizadas, como o acoplamento do grupo acetila na extremidade N-terminal, e da obtenção de um homólogo linear. Os peptídeos e bioconjugados obtidos foram avaliados em relação a sua atividade antibacteriana, citotóxica e de permeabilização de vesículas. O peptídeo com ácido gálico acoplado à região N-terminal apresentou aumento da atividade antimicrobiana para *S. Aureus* (MIC = 64 µM) quando comparado ao peptídeo original (MIC = 128-256 µM), apresentando toxicidade para fibroblastos somente em 512 µM. Em bactéria Gram-negativa esse peptídeo apresentou diminuição de sua atividade. O peptídeo contendo Fc manteve a atividade contra a bactéria *E. Coli* (MIC = 4 µM) e um aumento em *S. Aureus*, no entanto, apresentou a maior citotoxicidade (menor viabilidade celular), que pode estar relacionado com sua capacidade de permeabilizar vesículas. Os peptídeos, acetilado e o homólogo linear apresentaram viabilidade celular acima de 90%, em todas as concentrações estudadas, no entanto a atividade bacteriana foi baixa. Estes resultados mostram a importância da estrutura dimérica na atividade do peptídeo e a importância da carga da extremidade N-terminal na atividade do peptídeo. Os resultados obtidos trazem informações do efeito da bioconjugação de moléculas orgânicas no peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K (código: p-BT), contribuindo para o desenvolvimento de novas moléculas ativas.

Palavra-chave: Antibióticos peptídicos; dímeros; farmacoresistência bacteriana; peptídeos microbianos; bactérias patogênicas.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are alternatives for the treatment of bacteria that are resistant to the commercial antibiotics currently used. PAMPs are oligopeptides, amphipathic and, for the most part, when dimerized, they significantly increase their biological activity. In this work, the dimeric peptide desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³ (p-BthTX-I)₂K, which has selective activity against prokaryote cells, and two bioconjugates containing gallic acid and ferrocene at the N-terminal end, synthesized, purified and characterized. Other modifications were also carried out, such as coupling the acetyl group at the N-terminal end, and obtaining a linear homologue. Peptides and bioconjugates were removed in relation to their antibacterial, cytotoxic and vesicle permeabilizing activities. The peptide with gallic acid coupled to the N-terminal region shows increased antimicrobial activity for *S. aureus* (CIM = 64 μM) when compared to the original peptide (CIM = 128-256 μM), the toxicity for fibroblasts only at 512 μM. In Gram-negative bacteria, this peptide shows decreased activity. The Fc-containing peptide maintained an activity against *E. Coli* bacteria (CIM = 4 μM) and an increase in *S. aureus*, however, it showed the highest cytotoxicity (lower cell viability), which may be related to its ability to permeabilize vesicles. The acetylated peptides and the linear homolog dissipated cell viability above 90% in all studied tools, however bacterial activity was low. These results show the importance of the dimeric structure in the activity of the peptide and the importance of the N-terminal end charge in the activity of the peptide. The results obtained provide information on the effect of bioconjugation of organic molecules on the peptide desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³ (p-BthTX-I)₂K (code: p-BT), contributing to the development of new active molecules.

Keyword: Peptide antibiotics; dimers; bacterial pharmaco-resistance; microbial peptides; pathogenic bacteria.

FIGURAS

Figura 1 – Representação cronológica dos cientistas e suas descobertas.	15
Figura 2 – Alvos de ação e de resistência dos antibióticos.	18
Figura 3 – Estrutura secundária encontrada nos peptídeos antimicrobianos.	21
Figura 4 – Modelos propostos para explicar os mecanismos de ação dos PAMs: Na membrana (A): 1) Barril; 2) Poro desordenado; 3) Poro toroidal; 4) Carpete. Em alvos intracelulares (B): 1) Inibição da síntese de DNA ou RNA; 2) Inibição da respiração celular e efluxo de ATP e NADH; 3) Inibição da função ribossômica e síntese proteica; 4) Inibição de enzimas ou proteínas importantes para estrutura celular.	23
Figura 5 – Estrutura química ácido ferroceno.	27
Figura 6 – Reação de oxirredução do ferroceno.	28
Figura 7 – Estrutura química ácido gálico.	29
Figura 8 – Doenças descritas na literatura de atuação do ácido gálico.	29
Figura 9 – Reação de acoplamento do grupo amino livre do aminoácido com anidrido acético.	31
Figura 10 – Representação de MLVs e LUVs e seus respectivos diâmetros.	37
Figura 11 – Espectro de massas dos peptídeos obtidos. A) p-BT; B) AG-p-BT; C) Fc-p-BT; D) Ac-p-BT; E) p-BT linear.	41
Figura 12 – Perfis cromatográficos dos peptídeos brutos. A) p-BT; B) AG-p-BT; C) Fc-p-BT; D) Ac-p-BT; E) p-BT linear.	42
Figura 13 – Perfil cromatográfico do p-BT, com pureza acima de 95%.	43
Figura 14 – Perfil cromatográfico peptídeo AG-p-BT, com pureza de 100%.	44
Figura 15 – Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-p-BT, pureza de 90%.	44
Figura 16 – Perfil cromatográfico peptídeo Ac-p-BT, pureza de 100%.	45
Foi purificado 101 mg do peptídeo p-BT linear bruto e obteve-se 22,6 mg da fração pura de interesse, com pureza de 100%. O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 17. As condições de purificação podem ser observadas na tabela 5.	45
Figura 17 – Perfil cromatográfico peptídeo p-BT linear, pureza de 100%.	45
Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos p-BT (A), Fc-p-BT (B), AG-p-BT (C), Ac-p-BT (D) e p-BT linear (E) em tampão PBS, micelas de LPC e em TFE.	48
Figura 19 – Viabilidade celular (%) dos peptídeos em fibroblastos (linhagem NIH/3T3).	50

Figura 20 – Permeabilização em vesículas 80% POPE e 20% POPG.....	54
Figura 21 – Permeabilização em vesículas 95% POPC e 5% POPG.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pesquisadores e moléculas descobertas importantes para a história dos antibióticos.	17
Tabela 3 – Rendimento da síntese de peptídeos.....	39
Tabela 4 – Dados obtidos da clivagem dos peptídeos e solução de clivagem utilizada.	40
Tabela 5 – Condições das purificações dos peptídeos brutos e os rendimentos obtidos.....	43
Tabela 6 – CIM e CBM dos peptídeos em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Acil	LUVs – Vesículas unilamelares grandes
AG – Ácido Gálico	MLVs – Vesículas multilamelares
ATP – Trifosfato de adenosina	MM – Massa molar
Ca²⁺ – íon de cálcio	NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
CBM – Concentração bactericida mínima	PAMs – Peptídeos antimicrobianos
CD – Dicroísmo circular	PBS – Tampão fosfato salino
CF – Carboxifluoresceína	PC - Fosfocolina
CIM – Concentração inibitória mínima	PE – Fosfatidiletanolamina
CLAE – Cromatógrafo líquido de alta eficiência	PG – Fosfatidilglicerol
DDPA – n-Dodecylphosphonic acid	PLA2 – Fosfolipase A2
DIC – Diisopropilcarbodiimida	POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DIEA – N-diisopropiletilamina	POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DIPEA – N,N-diisopropiletilamina	POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
DMF – Dimetilformamida	RNA – Ácido ribonucleico
DNA – Ácido desoxirribonucleico	SM – Sphingomyelin
DPPC – 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	SPPF – Síntese de peptídeo em fase sólida
EROs – Espécies reativas de oxigênio	TFA – Ácido trifluoracético
Fc – Ferroceno	TFE – Trifluoretanol
HATU – 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio	TIS – Triisopropilsilano
HOBt – Hidroxibenzotriazol	
LPC – Lisofosfatidilcolina	

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Alpha

β – Beta

μ - Micro

θ – Elepsidade molar

λ – Comprimento de onda

ϵ – Épsilon

Å – Angstrom (unidade de medida)

ℓ – Caminho optico

nm – Nanômetro

m/z – Massa/carga

AMINOÁCIDOS

A – Ala – Alanina

C – Cys – Cisteína

D – Asp – Aspartato (Ácido aspártico)

E – Glu – Glutamato (Ácido glutâmico)

F – Phe – Fenilalanina

G – Gly – Glicina

H – His – Histidina

I – Ile – Isoleucina

K – Lys – Lisina

L – Leu – Leucina

M – Met – Metionina

N – Asn – Asparagina

P – Pro – Prolina

Q – Gln – Glutamina

R – Arg – Arginina

S – Ser – Serina

T – Thr – Treonina

V – Val – Valina

W – Trp – Triptofano

Y – Tyr – Tirosina

SUMÁRIO

1- Introdução.....	15
1.2 - Peptídeos antimicrobianos -----	20
1.3 – Bioconjugação -----	26
1.3.1- Ferroceno -----	27
1.3.2 – Ácido gálico -----	28
2- Objetivos.....	32
3- Materiais e métodos.....	32
3.1 – Síntese de peptídeo em fase sólida -----	32
3.1.1 – Síntese do peptídeo dimérico -----	32
3.1.2 – Síntese bioconjugados -----	33
3.1.3 – Síntese peptídeo linear -----	34
3.2 – Clivagem -----	34
3.3 – Purificação e caracterização dos peptídeos -----	34
3.4 – Dicroísmo Circular -----	35
3.5 – Ensaio Biológico -----	35
3.5.1 – Citotoxicidade -----	35
3.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima -----	36
3.6 – Permeabilização em vesículas -----	37
4- Resultados e Discussões.....	38
4.3 – Síntese de peptídeos -----	38
4.4 – Dicroísmo Circular -----	46
4.5 – Ensaio Biológico -----	49
4.5.1 – Citotoxicidade -----	49
4.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima -----	51
4.6 – Permeabilização em vesícula -----	53
5- Conclusões	57
6- Referências.....	58

1- Introdução

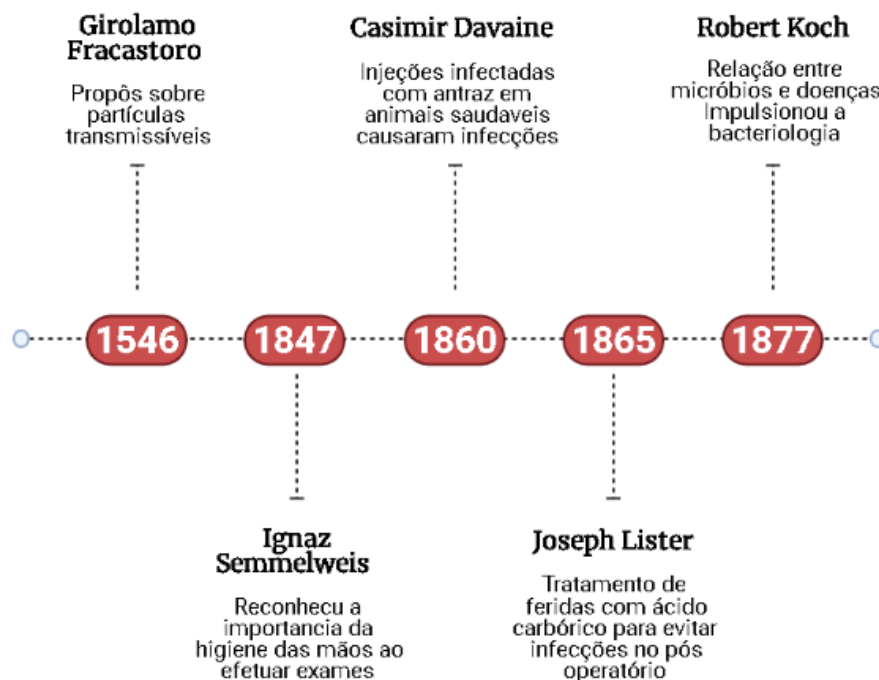
1.1 - Resistência microbiana à antibióticos

Selman Waksman, em 1945, definiu antibióticos como substâncias químicas de origem microbiana que possuem propriedades antibacteriana. Esses antibióticos podem levar a morte de bactérias, podendo ser bactericida (matando diretamente as bactérias) e/ou bacteriostáticos (impedindo o crescimento bacteriano) (DAVIES, 2006; TORTORA *et al*, 2017).

Sabemos que o marco na medicina sobre doenças infecciosas, foi realizado por Louis Pasteur, um químico francês, que estudando bactérias chegou na teoria do germe da doença. Bem antes dele, temos alguns nomes que foram extremamente importantes como Girolamo Fracastoro, Ignaz Semmelweis, Casimir Davaine, Joseph Lister e Robert Koch, todos contribuíram por meio de suas especialidades, para se ter os conhecimentos atuais sobre bactérias, fungos, antibióticos e formas de prevenção de uma infecção (MOHR, 2016; NICOLAOU, RIGOL, 2018)

Na figura 1, temos a representação cronológica de todas essas contribuições

Figura 1 – Representação cronológica dos cientistas e suas descobertas.



Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a). Feito em BioRender.com

Com o passar dos anos outros pesquisadores foram surgindo, com descobertas cruciais. Dentre esses, destaca-se o bacteriologista Alexander Fleming (1928) que, descobriu a penicilina, o que lhe proporcionou o prêmio Nobel. Essa descoberta mudou completamente a história da medicina. Outros nomes também foram importantes para chegarmos em diferentes classes de antibióticos, com diferentes mecanismos de ação, como é o caso dos cientistas Koch, Bernhard Fischer e Georg Gaffky que isolaram *Mycobacterium tuberculosis* e *Vibrio cholerae* (MOHR, 2016; NICOLAOU, RIGOL, 2018)

O primeiro antibiótico natural descoberto foi o ácido micofenólico, descrito por Bartolomeo Gosio e isolado da *Penicillium glaucum*. O antibiótico além de inibir o crescimento do *Bacillus anthracis*, também apresentava atividade antiviral, antifúngica e antitumoral. Já o primeiro antibiótico sintético foi desenvolvido por Alfred Bertheim, e ficou conhecido como Salvarsan (Arsfenamina), sendo utilizado por mais de 40 anos contra a sífilis (MOHR, 2016; NICOLAOU, RIGOL, 2018)

Na tabela 1, temos a apresentação de diversos pesquisadores que contribuíram para a evolução dos antibióticos e as moléculas estudadas.

Tabela 1 – Pesquisadores e moléculas descobertas importantes para a história dos antibióticos.

Ano	Pesquisadores	Descobertas	Referências
1932	Gerhard Domagk	Sulfonamidas	DOMAGK, 1935
1939	René Dubos	Tirotricina	DUBOS, 1939
1943	Albert Schatz e Selman Waksman	Astreptomicina classe de aminoglicosídeo	SCHATZ; BUGLE; WAKSMAN, 1944
1945	Benjamin M. Duggar	Aureomicina (Clortetraciclina)	DUGGAR, 1948
1945	Giuseppe Brotsu	Cefalosporina C	BROTZU, 1948
1959	Piero Sensi	Ansamicina Macrolactâmico	SENSI, 1959
1962	Leshner e colaboradores	Ácido nalidíxico	LESHER <i>et al.</i> , 1962
1970	Empresa Kalamazoo MI, EUA	Linezolida	SLEE <i>et al.</i> , 1987
1997	Ronald N. Jones e Douglas J. Biedenbach	Eritromicina	JONES; BIEDENBACH, 1997
2004	Leadbetter e colaboradores	Telavancina	LEADBETTER <i>et al.</i> , 2004

Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a)

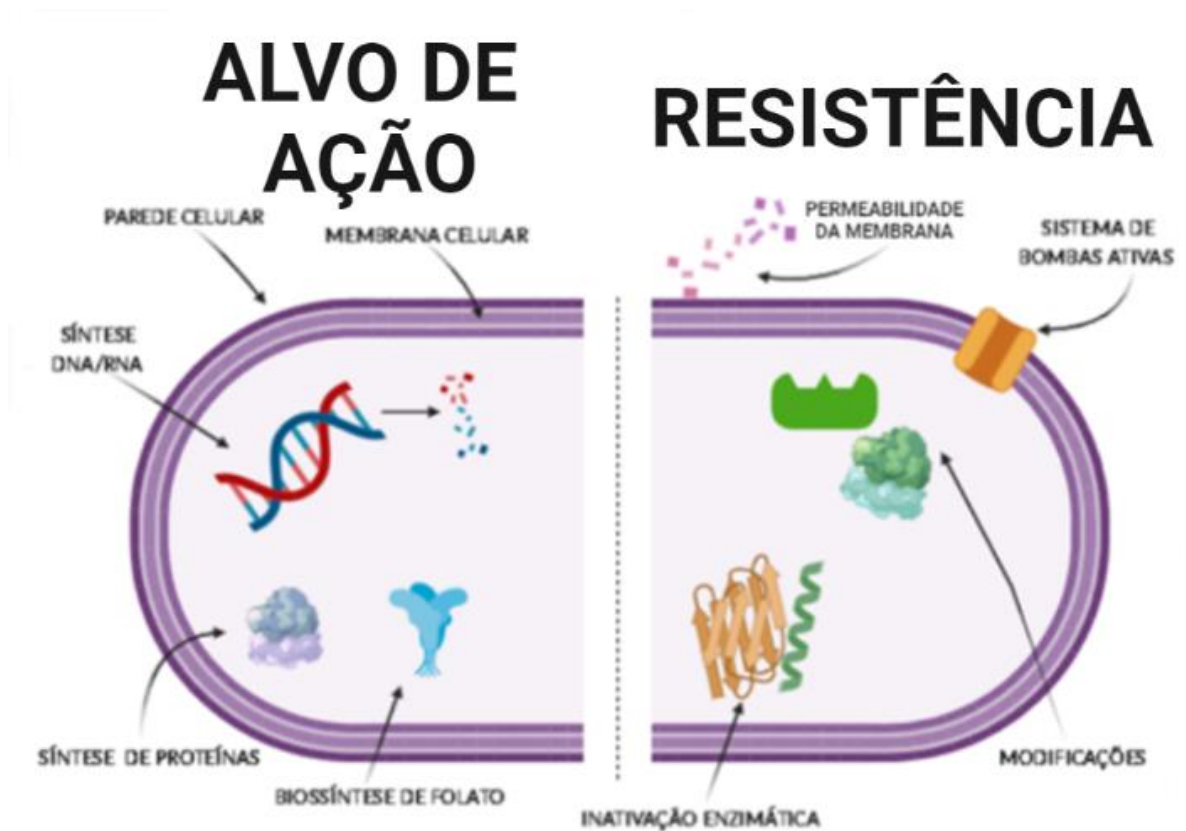
As classes dos antibióticos em uso possuem como mecanismos de ação a inibição da síntese de proteínas (tetraciclinas, aminoglicosídeos); alteração da síntese da parede celular (β -lactâmicos, glicopeptídeos); interferência na replicação de DNA e integridade bacteriana (fluoroquinolona); interrupção da biossíntese de folato (sulfonamidas); e ruptura da integridade da membrana celular (lipopetídeos) (BAPTISTA, 2013; VIKESLAND *et al*, 2019).

A resistência das bactérias aos medicamentos pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo, modificações no alvo ribossomal e mutações de proteínas. A inativação enzimática também pode ocorrer, onde as bactérias sintetizam enzimas que podem transformar e inativar os antibióticos. A redução da permeabilidade da membrana interna e externa, diminuindo a absorção do

medicamento é outro modo de resistência. A eliminação dos antibióticos pelo sistema de bomba de efluxo, onde o antibiótico não consegue ter uma concentração efetiva dentro da célula, como o caso da tetraciclina, também acontece (HASAN, AL-HARMOOSH, 2020).

Na figura 2, estão apresentados de modo simplificado os alvos de ação e de resistência citados acima.

Figura 2 – Alvos de ação e de resistência dos antibióticos.



Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a). Feito em BioRender.com

O uso irresponsável dos antibióticos é a principal causa do aumento da resistência bacteriana e não se limita apenas ao consumo hospitalar, mas também ao emprego exacerbado na agropecuária. Essa resistência gera o aumento de morbidades e de mortalidade humana, gerando custos à saúde (CDC, 2019). O Banco Mundial estima que pode haver uma redução do produto interno bruto (PIB) de alguns países entre 2 à 3,5% devido à resistência aos antibióticos, gerando custos de até 3,4 trilhões de dólares até o ano de 2030 (ROOPE *et al.*, 2019)

O desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos ocorreu em maior proporção entre os anos de 2000 a 2009, quando houve um aumento de pequenas empresas farmacêuticas. Em contrapartida, após essa data, as políticas e ações desenvolvidas pelo mundo no combate a resistência aos antibióticos não têm apresentado eficácia, apesar da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatar sinais positivos no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos em ensaios pré-clínicos (OPAS, 2017). Entre 2010 e 2019 apenas 15 novas drogas antibacterianas foram aprovadas (DHEMAN *et al.*, 2020).

Somado a isso, dados mundiais entre 2000 e 2010 mostram que o consumo de antimicrobianos aumentaram 36% em 71 países, sendo Brasil, Rússia, Índia e África do Sul os responsáveis por três quartos desse aumento (ANVISA, 2018).

O consumo de antibióticos na pandemia de COVID-19 ocorreu de forma exacerbada, sendo que a maioria dos pacientes receberam antibióticos antes de serem diagnosticados (LIU *et al.*, 2021). No começo da pandemia não havia formas eficazes de identificar a infecção sendo necessário o uso de antibióticos empiricamente (FRIBERG; GUEDJ, 2020; METSEMAKERS *et al.*, 2021).

No Brasil os primeiros protocolos de manejo clínico da COVID-19 trazia a importância do uso de antibióticos apenas em caso de sepse (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), no entanto, Langford e colaboradores (2020), evidenciaram que as coinfeções por bactérias em pacientes com COVID-19 eram baixas, mas o uso dos medicamentos antibacterianos não, mostrando um uso irresponsável de antibióticos.

O uso inadequado de antibióticos pode levar a problemas maiores no futuro, como estima a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for economic co-operation and development – OECD), indicando que a resistência microbiana pode causar 60 mil mortes por ano nos 33 países inclusos em seu modelo, podendo matar cerca de 2,4 milhões de pessoas até 2050. No Brasil e Federação Russa, de 40 a 60% das infecções apresentam resistência à antibióticos (OECD, 2018). A OMS sempre se preocupou com as consequências causadas pela resistência bacteriana e descreve algumas bactérias como prioridade crítica, entre elas as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, todas resistentes à carbapenema. Alguns medicamentos vêm sendo desenvolvidos contra esses patógenos prioritários como o Benapenem, que se

encontra na fase II de exames pré-clínicos. Apesar de todas as informações contidas no documento da OMS, a organização confirma que há a necessidade de novos investimentos e iniciativas, pois as descobertas permanecem insuficientes (WHO *et al.*, 2019).

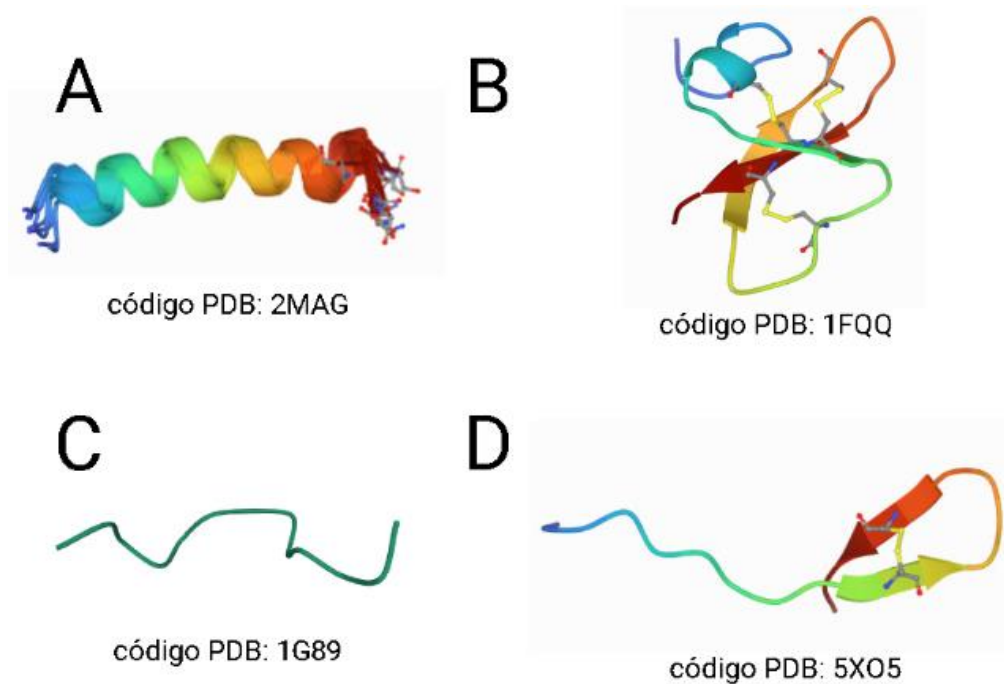
Pesquisas envolvendo novos antibióticos, com estruturas e mecanismos diferentes, são uma nova alternativa para o combate à resistência bacteriana, como é o caso dos peptídeos antimicrobianos, produzidos e encontrados nos sistemas de defesa dos microrganismos (GHOSH *et al.*, 2019).

1.2 - Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) possuem de 5 a 50 resíduos de aminoácidos e massa molar que varia de 1 a 5 kDa (YASIR, 2018). Bancos de dados, que são atualizados constantemente como o Antimicrobial Peptide Database (APD), mostram 3.180 peptídeos antimicrobianos, sendo 2.356 oriundos de animais. PAMs catiônicos são o maior grupo, apesar de peptídeos aniônicos também terem sido identificados.

Geralmente os PAMs são classificados de acordo com sua estrutura, sendo divididos em quatro grupos (figura 3): (A) α -hélice (magainin-2), (B) folha- β (β -defensin-2), (C) estrutura estendida (indolicidin) e (D) loop (thanatin) (COSTA, 2014; KOEHBACH *et al.*, 2019).

Figura 3 – Estrutura secundária encontrada nos peptídeos antimicrobianos.



Fonte: Adaptado pela autora. Feito em BioRender.com

O grupo mais estudado e encontrado é aquele que possui estrutura em α -hélice, aproximadamente de 30 a 50% do total (figura 3A). Ele apresenta uma estrutura linear em solução aquosa e assume estrutura secundária em α -hélice quando interage com a membrana das bactérias. Peptídeos estruturados em folha- β (figura 3B) possuem de 1 a 5 ligações dissulfeto, criando uma estrutura anfipática. Esses são mais estruturados em solução e não sofrem grandes alterações conformacionais ao interagir com ambiente de membrana. Os peptídeos estruturados em loop (figura 3D) também são estabilizados por diversas ligações dissulfeto. Os peptídeos que adquirem estrutura estendida (figura 3C) são compostos por grande quantidade de resíduos de arginina, triptofano, glicina, prolina e histidina (YASIR, 2018; DI SOMMA *et al.*, 2020).

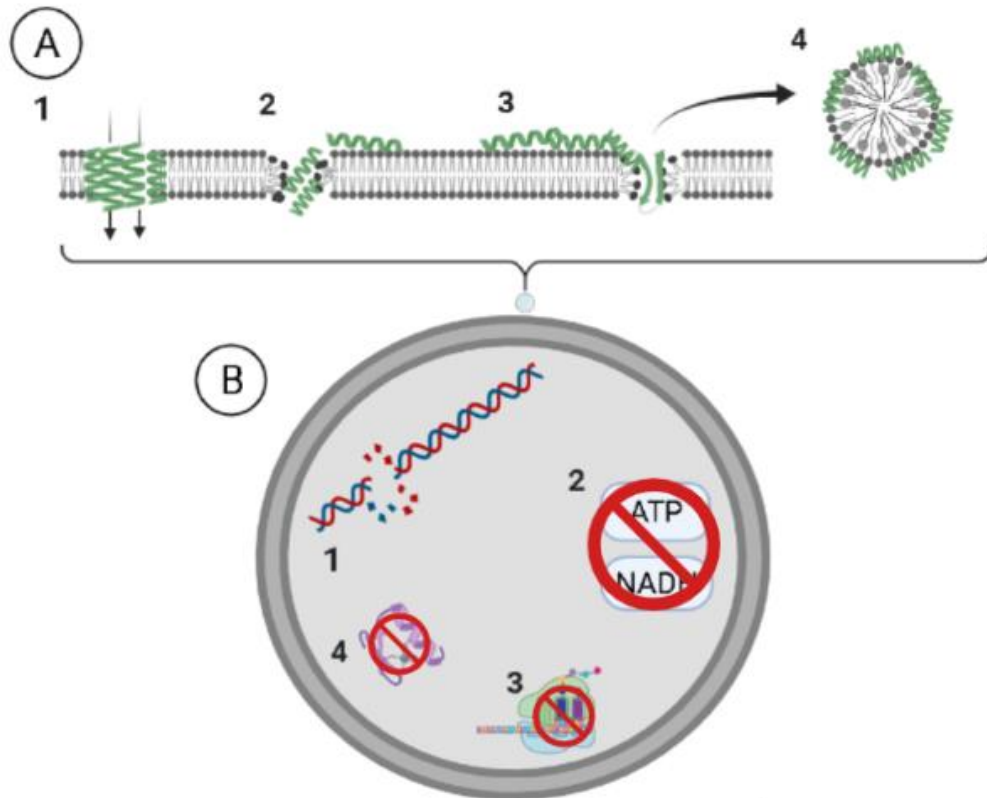
Geralmente é aceito que os peptídeos inicialmente interagem com as membranas de microrganismos por interação eletrostática, que devido a sua carga positiva, são atraídos pela rede de cargas negativas das membranas. As interações hidrofóbicas com a cauda apolar dos lipídeos e a face apolar dos peptídeos também possuem papel fundamental quando os PAMs entram em contato com a membrana. Após o contato, os peptídeos dobram-se em estruturas mais estáveis, de acordo com sua sequência de aminoácidos (TORRES *et al.*, 2019) e seu mecanismo de ação. O

modo de ação dos PAMs depende de fatores, como a estrutura do peptídeo, concentração do peptídeo e composição da membrana, principalmente dos fosfolípidios existentes. Além disso, os componentes da parede celular também podem interagir com os PAMs, como o ácido lipoteicoico e os lipopolissacarídeos (WANG *et al*, 2018).

Vários mecanismos de ação são propostos, abaixo descrevemos resumidamente alguns deles relacionados a ação na membrana (Figura 4 – A): 1) mecanismo de barril (Figura 4 – A1) – os peptídeos se estruturam na membrana na forma de uma estrutura parecida com um barril, sendo seu interior polar e sua superfície, que interage com as caudas lipídicas, apolar, formando poros e causando a morte celular; 2) poro desordenado (Figura 4 – A2) – também ocorre a formação de poros, mas este não possui uma estrutura bem organizada, mostrando maior desorganização; 3) poro toroidal (Figura 4 – A3) – os peptídeos interagem entre si e juntamente com os lipídeos da membrana ocorre a formação de poros; 4) mecanismo de tapete (Figura 4 – A4), onde os peptídeos a partir de uma concentração crítica solubilizam a membrana em estrutura micelares (LOREZON *et al*, 2019; TORRES *et al.*, 2019; MANZINI, 2011).

Outros mecanismos de ação na membrana foram sugeridos (Tabela 2): 1) despolarização da membrana, que é capaz de desestabilizar a membrana através da passagem de pequenos íons e que resultam na perda de gradientes eletroquímicos e de pH transmembrana; 2) afinamento da membrana, nesse caso a membrana é transformada em uma bicamada elástica após a inserção dos peptídeos e conseqüentemente ocorre sua desestabilização; 3) oxidação lipídica, ocorre a oxidação dos lipídios por meio das espécies reativas de oxigênio; 4) formação de bicamada não intermediária, o peptídeo nessa situação induz a fase lipídica tridimensional e não lamelar. Essa fase apresenta muito mais lipídios por unidade de área promovendo a desestabilização da membrana (MAGANA *et al*, 2020; NGUYEN *et al*, 2011). Na tabela 2 são apresentados exemplos de PAMs os mecanismos propostos e suas respectivas referências.

Figura 4 – Modelos propostos para explicar os mecanismos de ação dos PAMs: Na membrana (A): 1) Barril; 2) Poro desordenado; 3) Poro toroidal; 4) Carpete. Em alvos intracelulares (B): 1) Inibição da síntese de DNA ou RNA; 2) Inibição da respiração celular e efluxo de ATP e NADH; 3) Inibição da função ribossômica e síntese proteica; 4) Inibição de enzimas ou proteínas importantes para estrutura celular.



Fonte: Elaborado pela autora. Feito em BioRender.com

Tabela 2 – Peptídeos e seus mecanismos de interação com a membrana.

	Peptídeo	Mecanismo proposto	Referências
1	Lactoferricina Daptomicina	Despolarização da membrana	GIFFORD, 2005 JEU; FUNG, 2004
2	PGLa LL-37	Afinamento da membrana	LOHNER, 2009
3	Temporina L Indolicidina	Direcionamento de lipídios oxidados	MATTILA, 2008
4	Gramicidina S	Bicamada não intermediária	HANEY, 2010

Fonte: Elaborada pelo (a) autor (a)

Além da ação na membrana, mecanismos de ação envolvendo interações específicas com componentes presentes nos microrganismos também podem ser encontrados (Figura 4 – B), como: inibição da síntese de DNA e RNA (Figura 4 – B1); inibição da respiração celular e efluxo de ATP e NADH (Figura 4 – B2); inibição da função ribossômica e síntese proteica (Figura 4 – B3); e inibição de enzimas necessárias para a síntese da estrutura da parede celular e/ou bloqueios de proteínas necessárias para dobramento adequado (Figura 4 – B4) (LOHNER, 2017).

Os PAMs são obtidos de plantas, animais, bactérias e fungos, bem como a partir de toxinas e/ou venenos, podendo inclusive, baseados no conhecimento da relação estrutura/função, serem desenhados e obtidos de forma sintética (síntese química). Diversos peptídeos bioativos foram relatados a partir do veneno de diferentes famílias de serpentes. Entre as 3.000 espécies de cobras conhecidas, apenas um número pequeno é venenoso, principalmente a família *Viperidae* e *Elapidae*. O veneno de cobra é uma secreção glandular e essa mistura contém aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios, proteínas e peptídeos. Esses peptídeos presentes nas peçonhas são compostos interessantes, pois quando utilizados nas concentrações corretas, podem ser utilizados como drogas terapêuticas (MUNAWAR *et al.*, 2018).

A secreção da *Bothrops Jararacuçu* (família *Viperidae*) possui uma vasta fonte de enzimas, dentre elas as fosfolipases, envolvidas no metabolismo de fosfolipídios. Dentre as fosfolipases, destaca-se a fosfolipase A2 (PLA2) que necessita da coordenação do íon de cálcio (Ca^{2+}) para que ocorra sua catálise. Já as PLA2 homólogas (Lys49) não possuem a coordenação do íon de Ca^{2+} e atividade enzimática, no entanto apresentam efeito miotóxico (FRY *et al.*, 2008; SANTOS, 2011). Lomonte e colaboradores (2003), conseguiram evidenciar que a parte responsável pela atividade miotóxica é a região C-terminal de Lys49-PLA2, especificamente os aminoácidos situados entre as posições 115 e 129. O peptídeo p(BthTX-I) (Sequência: KKYRYHLKPFCKK) e o seu dímero p(BthTX-I)₂ obtido pela ligação entre os resíduos de Cys, foram sintetizados por nosso grupo e não mostraram interação com a membrana plasmática, atividade contra *C. albicans*, eritrócitos, células epiteliais ou macrófagos. No entanto, mostrou atividade contra bactérias, demonstrando possível especificidade contra células procarióticas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2015)

Em outro estudo, nosso grupo demonstrou que o peptídeo (p-BthTX-I)₂ foi totalmente degradado após 25 min de incubação em soro. No entanto, o principal produto de degradação – o peptídeo sem quatro resíduos de lisina na região C-terminal [des-Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂] – permaneceu estável mesmo após 24 horas. A atividade antibacteriana desse peptídeo foi avaliada contra uma variedade de bactérias, incluindo cepas resistentes a múltiplos fármacos, onde se observou que a atividade foi mantida e em alguns casos aumentada (SANTOS-FILHO *et al.*, 2017). Resultados do nosso grupo também mostraram que o peptídeo dimerizado com um

resíduo de lisina na extremidade C-terminal (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K), substituindo a ligação dissulfeto, apresentou atividade similar ou aumentada em relação ao dímero inicial (SANTOS-FILHO *et al.*, 2018).

Apesar de pesquisas anteriores destacar que PAMs não apresentam nenhuma resistência microbiana, por estar presente na defesa inata de microrganismos, alguns estudos vêm discutindo alguns mecanismos de resistência adquiridos por PAMs (ANDERSSON *et al.*, 2016).

Baindara e colaboradores (2020), descrevem os possíveis mecanismos de resistência usado por bactérias contra PAMs, como por exemplo, (I) degradação proteolítica, (II) sequestro dentro do biofilme semelhante a matriz extracelular, (III) repulsão eletrostática de ácido lipoteicóico e ácido teicóico, (IV) maior rigidez na membrana externa por acilação de lipídios, (V) repulsão eletrostática por grupos positivos, (VI) repulsão eletrostática, por meio da transformação do lipídio na sua forma aniônica para catiônica que reduzindo a interação de PAMs, (VII) alteração do pentapeptídeo impedindo a entrada de PAMs na ligação de lipídio II e (VIII) bombas de efluxo.

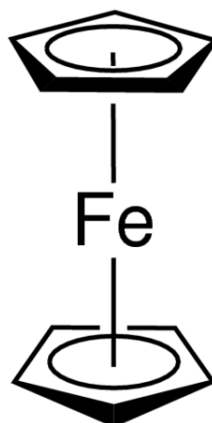
1.3 – Bioconjugação

A bioconjugação é muito aplicada no uso com proteínas, e por elas possuírem resíduos de aminoácidos na sua composição algumas estratégias começaram a ser utilizadas com PAMs. A bioconjugação tem o intuito de aumentar e/ou alterar as propriedades de possíveis drogas peptídicas. Em 2010, 30% dos peptídeos aprovados para uso clínico apresentaram conjugações (LAU; DUNN, 2018; HUDECZ, 2005). Bioconjugados de peptídeos podem apresentar melhora na entrega do composto (“drug delivery”) ao alvo de ação no organismo, toxicidade reduzida, farmacocinética otimizada, eficácia e segurança (LIU *et al.*, 2020). Os PAMs possuem versatilidade nas modificações químicas, resultando com facilidade em novas moléculas, sendo que a bioconjugação poderia contornar a resistência por atuar em mais de um alvo. Desta forma, a bioconjugação proporciona a obtenção de biomoléculas com mais de uma função, sendo um método importante em vários campos da ciência de biomoléculas e/ou biomedicina (MEIER-MENCHES; CASINI, 2020; HUDECZ, 2005).

1.3.1- Ferroceno

O ferroceno (Fc) ($C_{10}H_{10}Fe$), figura 5, é uma substância organometálica do tipo sanduíche, com ponto de ebulição de $249^{\circ}C$, baixa solubilidade em água e solúvel em solventes orgânicos.

Figura 5 – Estrutura química ácido ferroceno.

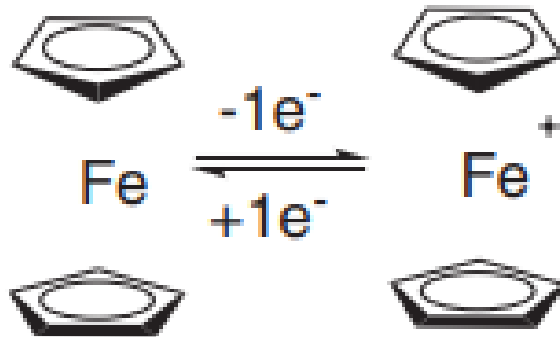


Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com> (Acesso: 29/03/2021)

Devido ao seu caráter lipofílico, derivados de ferroceno ultrapassam membranas celulares de forma mais fácil. O grupo ferrocenil sofre oxidação reversível de um elétron sob a emissão de um elétron por meio de uma reação semelhante a Fenton sob condições fisiológicas, apresentando grande possibilidade de aplicação na medicina (LUDWIG *et al.*, 2019). Devido aos 12 elétrons estarem ligados em orbitais ligantes, e outros 6 se encontram em não ligantes, o ferroceno apresenta propriedades redox (figura 6) em uma faixa de potencial própria e gerando cátion-radical (PEREIRA *et al.*, 2013).

Reações de oxidação catalisadas por Fe^{2+} contendo composto organometálicos foram aprovados como um método eficiente para degradar compostos orgânicos na presença de H_2O_2 . Em uma reação típica, a mistura de H_2O_2 e Fe^{2+} produz radicais hidroxilas (OH), que é altamente eficiente para oxidação de compostos orgânicos (FENG *et al.*, 2019).

Figura 6 – Reação de oxirredução do ferroceno.



(PEREIRA *et al.*, 2013)

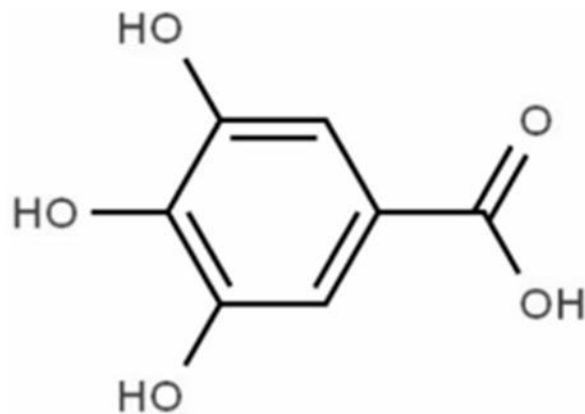
O organometálico Fc é versátil para o desenvolvimento de novas drogas, devido a sua baixa toxicidade *in vivo* e simplicidade da sua modificação química (ZEH *et al.*, 2020). O Fc ganhou muita atenção na concepção de novos antibióticos nas últimas décadas e vários grupos sintetizaram conjugados de Fc com atividade antimicrobiana. Alguns PAMs modificados com o composto, ao entrar em contato com a membrana celular, acabou gerando uma perturbação nas enzimas (MurG) importantes para a formação da estrutura celular, deixando as bactérias vulneráveis (LUDWIG *et al.*, 2019). O Fc também aparece em conjugados de cloroquina (ferroquina), se mostrando eficaz na fase II de ensaios clínicos no tratamento da malária (MBABA *et al.*, 2019).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) formados por esse composto podem ocasionar morte celular, por meio da peroxidação dos lipídios ou danos à membrana (COSTA, 2018; COSTA *et al.*, 2020).

1.3.2 – Ácido gálico

O ácido gálico (AG) (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, C₇H₆O₅) é um composto fenólico, identificado inicialmente por Carl Wilhelm Scheele em 1786, com ponto de ebulição em torno de 240°C, solúvel em água, éter, álcool e glicerol (Figura 7).

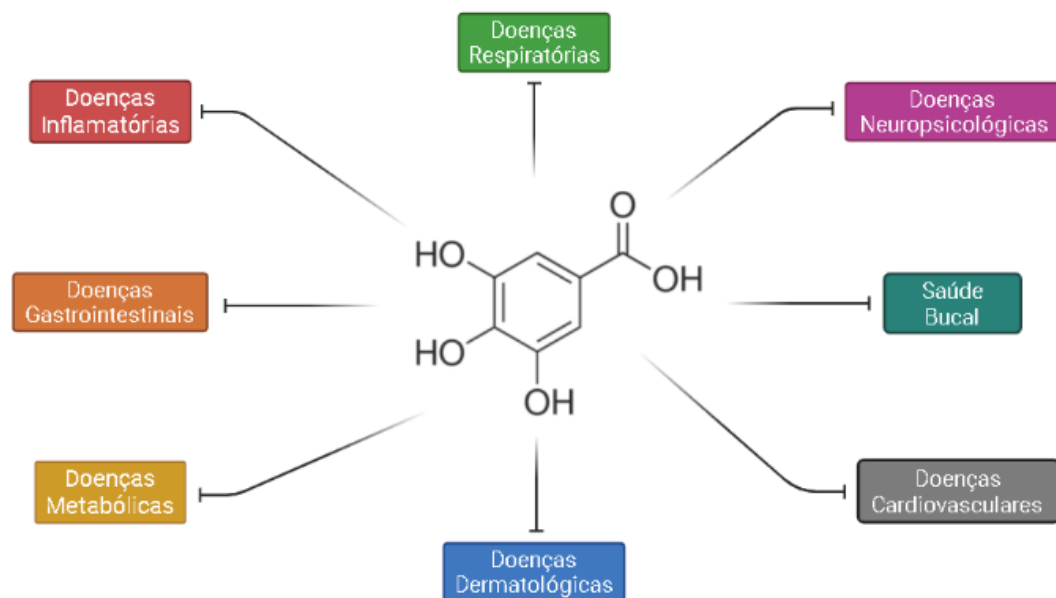
Figura 7 – Estrutura química ácido gálico.



(SUN *et al*, 2020)

Esse composto vem sendo utilizado para modificar as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas, a afinidade em alvos celulares e a difusão através da membrana lipídica, causando morte celular por apoptose (LOCATELLI, 2009). O AG é um composto promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo que algumas de suas atividades farmacológicas pode ser observada na figura 8. O composto apresenta atividade antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antidiabética, etc. (BADEA, 2019; ZHRANI *et al*, 2020).

Figura 8 –Doenças descritas na literatura de atuação do ácido gálico.



Fonte: Elaborado pelo (a) autor (a); adaptado de KAHKESHANI *et al*, 2019

Compostos fenólicos, como o AG, possuem a capacidade de neutralizar radicais livres, o que permite sua atuação como doador de hidrogênio, supressor de oxigênio singlete e mediador redutor (NOURI *et al.*, 2020). A bioatividade de seus análogos também tem sido atribuída à característica anfipática dos ésteres derivados. (ZHRANI *et al.*, 2020).

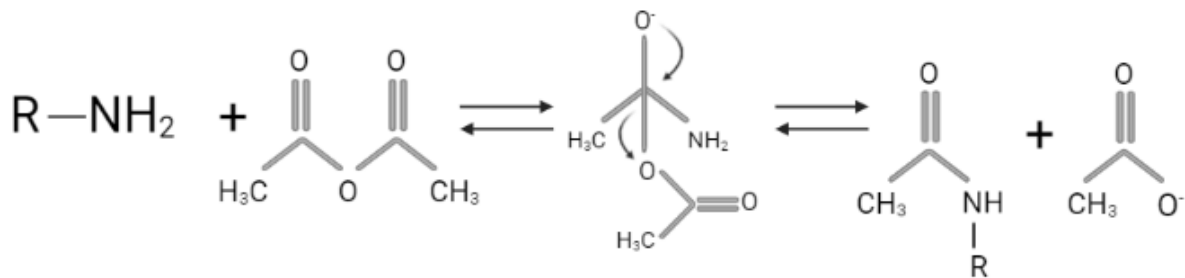
O AG pode inibir a motilidade, aderência e formação de biofilme de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Chromobacterium violaceum* e *Listeria monocytogenes*. O composto pode também perturbar a integridade da membrana celular em bactérias gram-positivas e gram-negativas, mudar a carga, a hidrofobicidade e a permeabilidade na superfície da membrana (SHAO *et al.*, 2015). Esse composto tem sido muito avaliado em relação ao seu potencial terapêutico contra algumas doenças (BORGES *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2020).

O acoplamento ácido gálico à peptídeos vêm sendo utilizado para o desenvolvimento de novos bioconjugados antimicrobianos, anticâncer (SANCHES, 2016) e antiviral (BATISTA *et al.*, 2018).

Neste trabalho avaliamos a síntese de conjugados contendo o peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K e a molécula de AG ou Fc.

Somado a isso, para avaliar a contribuição da carga da extremidade N-terminal desse peptídeo que é retirada com a adição do AG e do Fc, resolvemos neutralizar a carga positiva do grupo amino com o acoplamento de um grupo acetila. O anidrido acético (C₄H₆O₃; ponto de ebulição: 139°C) vem sendo utilizado como estratégia para retirada da carga da região N-terminal de peptídeos (figura 10). A mudança de carga na extremidade N-terminal pode influenciar na atividade do peptídeo ou na sua estruturação (CRUSCA *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2020).

Figura 9 – Reação de acoplamento do grupo amino livre do aminoácido com anidrido acético.



Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a). Feito em BioRender.com

Em proteínas, a acetilação ocorre de forma natural na região N-terminal, podendo ocorrer até 84,4% em proteínas humanas. Nas proteínas, a acetilação tem como objetivo estabilizar as interações proteína-proteína, mas seu papel fisiológico não é bem compreendido (DU *et al.*, 2020; ORREN, MACHWE, 2019)

No estudo de Kuzmin e colaboradores (2017) a acetilação realizada no peptídeo Tachyplesin I apresentou uma melhora na estabilidade em soro (peptídeo intacto após 24 h de incubação), entretanto sua toxicidade foi aumentada 30%. Em outros estudos é observado que a região N-terminal acetilada apresentou uma inserção mais profunda na membrana (ALVARES *et al.*, 2018). Miasaki e colaboradores (2020), mostraram também que a acetilação reduziu a carga no N-terminal, tendo uma barreira de energia menor para a inserção do peptídeo o que induziu um maior empacotamento lipídico.

Somado a acetilação, o peptídeo p-BT linear (sequência: KKYRYHLKPFAPKHLHYRYKK-NH₂) foi sintetizado para avaliarmos a influência da necessidade da dimerização na atividade do peptídeo original. Desta forma, o peptídeo foi sintetizado de maneira linear, substituindo a lisina, responsável pela dimerização, por um resíduo de alanina. Essa substituição foi pensada pois o resíduo de lisina quando na formação do dímero não possui carga, pois seus grupos α - e ϵ -aminos estão ligados a cadeia peptídica. A alanina foi então colocada para simular esse resíduo sem carga.

Essa avaliação foi realizada pois Santos-filho e colaboradores (2015) testaram alguns peptídeos homólogos ao p-BthTX-I, por exemplo, peptídeos sem resíduos de cisteína na posição 11, com objetivo de evitar dimerização por ponte dissulfeto. Esse

trabalho mostrou que a dimerização era fundamental para a atividade do peptídeo, no entanto um peptídeo linear não foi avaliado.

2- Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é a síntese, purificação e caracterização do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K adicionado na extremidade N-terminal o ferroceno, ácido gálico ou anidrido acético, bem como seu homólogo linear. Adicionalmente, será analisado o potencial dessas moléculas como agente antibacteriano.

Com isso, os objetivos específicos a serem atingidos são:

- Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos:

Nome do peptídeo	Sequência	Código
desCys ¹¹ /Lys ¹² /Lys ¹³ (p-BthTX-I) ₂ K	(KKYRYHLKPF) ₂ K	p-BT
AG-desCys ¹¹ /Lys ¹² /Lys ¹³ (p-BthTX-I) ₂ K	AG-(KKYRYHLKPF) ₂ K	AG-p-BT
Fc-desCys ¹¹ /Lys ¹² /Lys ¹³ (p-BthTX-I) ₂ K	Fc-(KKYRYHLKPF) ₂ K	Fc-p-BT
Ac-desCys ¹¹ /Lys ¹² /Lys ¹³ (p-BthTX-I) ₂ K	Ac-(KKYRYHLKPF) ₂ K	Ac-p-BT
desCys ¹¹ /Lys ¹² /Lys ¹³ (p-BthTX-I) ₂ K linear	KKYRYHLKPF A FPKLHYRYKK	p-BT linear

- Avaliar a estrutura secundária das sequências obtidas por dicroísmo circular.
- Avaliar a capacidade de permeabilização dos peptídeos visando obter informações sobre seu modo de ação.
- Avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica dos compostos sintetizados.

3- Materiais e métodos

3.1 – Síntese de peptídeo em fase sólida

3.1.1 – Síntese do peptídeo dimérico

O peptídeo p-BT (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K - sequência: ((KKYRYHLKPF)₂K)), homólogo ao peptídeo p(BthTX-I)₂ (SANTOS-FILHO *et al.*, 2015), foi obtido pelo método de SPFS por meio da estratégia Fmoc (BEHRENDT *et al.*, 2015). O processo se baseia no crescimento da cadeia peptídica, aminoácido por aminoácido a partir de sua região C-terminal, que se encontra ligada covalentemente ao suporte polimérico. A resina utilizada foi Rink Amida, que permite a ligação entre a

carboxi-terminal do aminoácido com a resina através de uma ligação amida, permitindo assim ao final da síntese a extremidade C-terminal alfa carboxamida (AMBLARD *et al.*, 2006).

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação de Diisopropilcarbodiimida (DIC) e Hidroxibenzotriazol (HOBt), por duas horas de agitação. Inicialmente o aminoácido Fmoc-Lys-Fmoc foi acoplado com duas vezes de excesso em relação ao número de sítios ativos na resina. Após essa etapa foi utilizado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 4 vezes em relação ao de sítios reativos existentes inicialmente na resina, isto é, duas vezes em relação ao número de sítios reativos. O grupo Fmoc base-lábil foi retirado pela lavagem em 20% 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) durante 1 e 20 min, em agitação. Entre cada etapa foram realizadas lavagens com DMF, para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. O DMF promoveu um aumento no tamanho da resina sendo eficiente na etapa de acoplamento, esse processo é denominado solvatação (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Depois de cada etapa de acoplamento foi executado o teste de ninidrina. Este composto, em temperaturas elevadas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, apropriado para indicar a presença de grupos aminos livres e indício da eficiência dos passos de acoplamento e desproteção (SUN *et al.*, 2006).

3.1.2 – Síntese bioconjugados

A partir da obtenção do peptídeo p-BT, uma fração de peptidil-resina foi separada para os acoplamentos das moléculas de AG, Fc e acetato (Ac). O AG e o Fc foram acoplados na extremidade N-terminal, por meio de uma reação com a mistura acoplante hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) e N,N-diisopropiletilamina (DIPEA). No caso de resultado positivo no teste de ninidrina, o acoplamento era repetido com a mistura acoplante HOBt/DIC, com agitação constante durante 12 h.

O processo de adição de um grupo acil na extremidade N-terminal do peptídeo p-BT foi realizada por meio de uma solução contendo 20% de anidrido acético em DMF, em agitação por duas horas.

3.1.3 – Síntese peptídeo linear

O peptídeo linear KKYRYHLKPFAPKLYRYKK foi sintetizado unindo as duas cadeias laterais através da alanina. A síntese foi feita continuamente por meio da SPFS. A Alanina substituiu a Lisina, devido ao fato deste último aminoácido no início da síntese estar com seus dois grupos amino ligados por meio de ligações peptídicas e não apresentar carga.

3.2 – Clivagem

A clivagem dos peptídeos ao final da síntese foi executada pela adição do ácido trifluoracético (TFA), responsável pela clivagem e os supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) e água ultrapura. A proporção utilizada foi de 95% TFA, 2,5% de TIS e 2,5% de água (Novabiochem® Peptide Synthesis Ed. 2014/15) para todos os peptídeos com exceção para o contendo AG. Nesse caso foi utilizada uma solução contendo 80% TFA, 15% de TIS e 5% de água. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de peptidil-resina. A reação foi realizada em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h a temperatura ambiente. Após esse período, foi executada a precipitação do peptídeo com éter etílico gelado, esse processo foi repetido 3 vezes para eliminação do reagente TIS e demais produtos orgânicos presentes na solução de clivagem, sendo o sobrenadante descartado. Ao final, o peptídeo foi dissolvido em uma solução de água contendo 0,045% de TFA (solvente A) e acetonitrila contendo 0,036% de TFA (solvente B) na proporção 1:1, sendo separado da resina por centrifugação. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado (KING *et al.*, 1990).

3.3 – Purificação e caracterização dos peptídeos

As purificações dos produtos brutos obtidos foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com fluxo de 5 mL por minuto, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca AAPPTEC (tamanho 250 mm x 10 mm, 120 Å, tamanho da partícula de 10 µm). Para a purificação do peptídeo p-BT e p-BT linear foi usado o gradiente linear de 10 a 40% de solvente B em 90 min. O peptídeo AG-p-BT foi purificado com gradiente linear de 5 a 25% solvente B em 90 min. Para o peptídeo Fc-p-BT foi utilizado gradiente de 15 a 35% solvente B em 60 min, e para o peptídeo Ac-p-BT usou-se gradiente de 10 a 40% de solvente B em 60 min.

Em seguida, a caracterização dos materiais obtidos foi realizada por meio de CLAE em modo analítico, utilizando espectrômetro Shimadzu, com coluna de fase reversa C18 Ultrasphere Phenomenex (4,6 mm x 150 mm, poro de 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm), detecção em 220 nm, e gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min, com fluxo de 1 mL por min. A obtenção das massas molares dos peptídeos obtidos foi realizada em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. A infusão da amostra foi realizada com uma concentração de aproximadamente 10 ppm em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5,0 µL/min e a fonte de eletrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de eletrospray (M+H+) faixa de 200-2000 g/mol.

3.4 – Dicroísmo Circular

Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J-815, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 5 varreduras com tempo de integração de 3 segundos por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos peptídeos em tampão fosfato salino (PBS 0,1 mM). Os peptídeos foram avaliados em solução tampão, em trifluoretanol (TFE) 60% e na presença do detergente lisofosfatidilcolina (LPC) nas concentrações de 1 µM, 15 µM e 50 µM. O cálculo da elipticidade molar $[\Theta]$, utilizado para converter os dados coletados inicialmente em milidegree, foi feito utilizando a seguinte fórmula (CASALLANOVO *et al.*, 2006):

$$[\Theta] = \frac{\text{valor (milidegree)}}{10 \times \ell \times [\text{peptídeo}] \times \text{n}^\circ \text{ de AA}}$$

O numerador corresponde ao 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 (mol. L⁻¹) e “nº de AA” é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo.

3.5 – Ensaio Biológicos

3.5.1 – Citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada para os compostos em concentrações decrescentes (512 a 32 µM) utilizando o ensaio de Rusazurina sobre células semelhantes a fibroblastos da linhagem NIH/3T3, em conformidade com Caiaffa e

colaboradores (2017). Este método permite determinar a eficácia da respiração celular (mitocondrial) e a viabilidade celular. A incubação das células no meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbeccos) por 24 h nos forneceu o grupo controle negativo. Os compostos foram incubados utilizando o mesmo meio de cultura e o mesmo tempo (24 h). Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 200 μ L de resazurina (70 μ M) e as células foram incubadas a 37°C durante 4 h. Após a incubação, 100 μ L de solução foi transferido para uma nova placa e a absorbância medida em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm (Biotek, Winooski, VT). Os valores médios foram calculados e convertidos em porcentagem de metabolismo celular em relação ao controle negativo (DMEM), definido como tendo 100% de metabolismo celular (MEDINA-ALARCÓN *et al.*, 2017).

Posteriormente os dados foram tratados por método estatístico ANOVA, a partir do teste de Tukey HSD, com diferença considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

3.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Foram realizados ensaios biológicos para verificação da atividade antimicrobiana de todos os peptídeos, em placas de microdiluição de 96 poços. Os testes foram realizados nas bactérias *E. coli* (ATCC 10536) e *S. aureus* (ATCC 14458), fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Rio de Janeiro, São Paulo, Brasil). Nesta determinação foi utilizada a diluição seriada (512 a 0,25 μ M) para a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana em bactérias aeróbias segundo a metodologia preconizada pelo NCCLS (sigla M7-A7). As amostras foram preparadas em água destilada, e posteriormente diluídos em 118 μ L de caldo Mueller-Hinton. As concentrações de peptídeo foram de 2.500 μ M para os peptídeos e 10.000 μ M para o ácido gálico e para o ferroceno.

Após a ressuspensão de duas vezes em caldo Mueller-Hinton, com a densidade óptica avaliada em 0,3 (10^5 UFC/mL) as bactérias foram incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente foi adicionado 15 μ L de solução de Resazurina à 0,01%, e incubadas novamente por duas horas, e a solução foi protegida da luz. Posteriormente, os poços correspondentes ao CIM (o último poço azul) e pelo menos três poços anteriores foram isoladamente homogeneizados, diluídos em série e

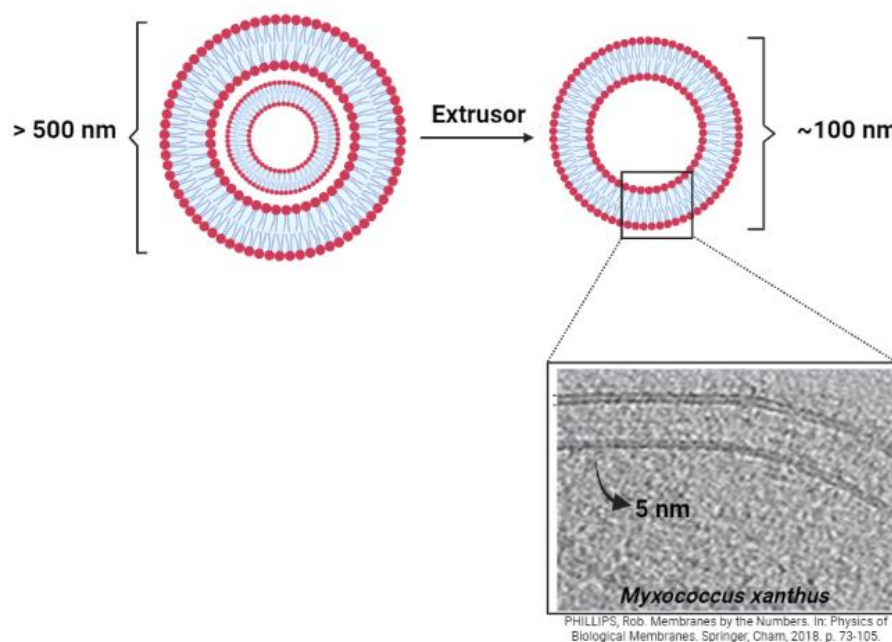
semeados em ágar Mueller-Hinton para determinação do CBM. O controle positivo para as bactérias foi a ciprofloxacina. O controle negativo foi obtido sem a adição dos agentes antimicrobianos em caldo Mueller-Hinton.

3.6 – Permeabilização em vesículas

Duas diferentes composições de vesículas foram preparadas: 1) 80% 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e 20% 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (POPG); 2) 95% 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 5% POPG. Esses compostos foram dissolvidos em clorofórmio/metanol (4:1) para ocorrer a homogeneização dos lipídeos, e levados para evaporação do líquido e formação do filme lipídico com N₂ gasoso. Na sequência o filme obtido foi mantido em vácuo para eliminação completa dos solventes. Posteriormente, o filme foi hidratado com solução de carboxifluoresceína (CF) 80 mmol/L em tampão PBS 0,01 mol/L, que foi submetido em ciclos de vórtex e sonicador à 60°C, em períodos de 10 min, por uma hora, para formação de vesículas encapsuladas com CF na concentração de 15 mM.

Para obtenção de vesículas unilamelares grandes (LUVs) (Figura 13), as vesículas multilamelares (MLVs), obtidas no procedimento acima, foram passadas por extrusor Avanti Polar Lipids, com filtro de policarbonato com poros de 100 nm.

Figura 10 – Representação de MLVs e LUVs e seus respectivos diâmetros.



Para a separação das vesículas com CF encapsulada e da CF livre, a solução extrusionada foi submetida à uma coluna de exclusão molecular, previamente preparada com resina Sephadex G-25.

A fração escolhida para os testes foi aquela que após a adição do detergente triton X100 (controle positivo) apresentava aumento de fluorescência de 5 vezes em relação ao valor inicial em uma cubeta com caminho ótico de 1 cm e volume de 500 μ L, utilizando um espectrofluorímetro Modelo Fluorolog-3 FL3-122 da Horiba Jobin Yvon, com comprimentos de onda de excitação em 495 nm e de emissão em 517 nm.

A permeabilização foi realizada da seguinte forma: 1) inicialmente, a vesícula foi colocada no aparelho por 2 min para confirmar a estabilidade das vesículas; 2) em 2 min o peptídeo foi adicionado e a variação da fluorescência foi medida até 8 min; 3) em 8 min o detergente triton foi adicionado para a obtenção do valor correspondente a 100% de vazamento de CF.

A porcentagem de permeabilização seguiu a seguinte equação:

$$\% \text{ permeabilização} = [(F_{\text{solução}} - F_{\text{inicial}})] / [(F_{\text{final}} - F_{\text{inicial}})] \times 100$$

4- Resultados e Discussões

4.3 – Síntese de peptídeos

O peptídeo p-BT foi obtido por meio da SPFS. A síntese foi iniciada com o aminoácido Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH para a obtenção do dímero. A escala inicial de grupos ativos foi 1,5 mmol e o rendimento obtido foi de 66%.

Os acoplamentos das moléculas de ácido gálico e ferroceno ao peptídeo p-BT, foram realizados em uma escala de 0,06 mmol de grupos ativos na resina e com três vezes de excesso dos compostos orgânicos. Os agentes acopladores mais reativos forma utilizados (HATU/DIPEA). Após 2 h de acoplamento, uma alíquota foi submetida ao teste de ninidrina, sendo que em ambos acoplamentos o resultado foi positivo, indicando que ainda havia grupamentos livres, em outras palavras, nem todo o ácido gálico e ferroceno haviam sido acoplados. A partir disso, foi realizado um reacoplamento com três vezes de excesso, e diferentes agentes acopladores (DIC/HOBt), deixando reagir com a resina durante 12 h. O teste de ninidrina foi então refeito, apresentando resultado negativo, indicando que os acoplamentos foram completos para ambas as moléculas. Ao final das sínteses evidenciou-se uma perda

de massa. Essa perda foi relacionada a desproteção do grupo Fmoc e à retirada de resina para os testes de ninidrina.

Para a acetilação da peptidil-resina foi utilizado escala 0,01 mmol, com uso de anidrido acético 20% em DMF com três gotas de DIEA, reagindo por uma hora. O DIEA usado teve a função de evitar a protonação do grupo amino, o que dificultaria a formação de ácido acético. Após esse período um teste de ninidrina foi realizado, mostrando resultado negativo, indicando que ocorreu acetilação dos grupos aminos presentes. Ao final da síntese também se observou uma perda de massa como o esperado, pois a massa molar do grupo protetor Fmoc é maior que a do acetil.

O peptídeo p-BT linear foi sintetizado partindo de uma escala inicial de 0,2 mmol de resina. Os acoplamentos dos aminoácidos foram realizados com a combinação de DIC/HOBt com duas vezes de excesso em cada acoplamento.

Todas as massas iniciais e finais de cada peptídeo e seus respectivos rendimentos estão mostrados na tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento da síntese de peptídeos.

Peptídeos	Massa inicial (g)	Rendimento (%)
p-BT	3,023	66
AG-p-BT	0,409	55
Fc-p-BT	0,407	53
Ac-p-BT	0,132	60
p-BT linear	0,386	82

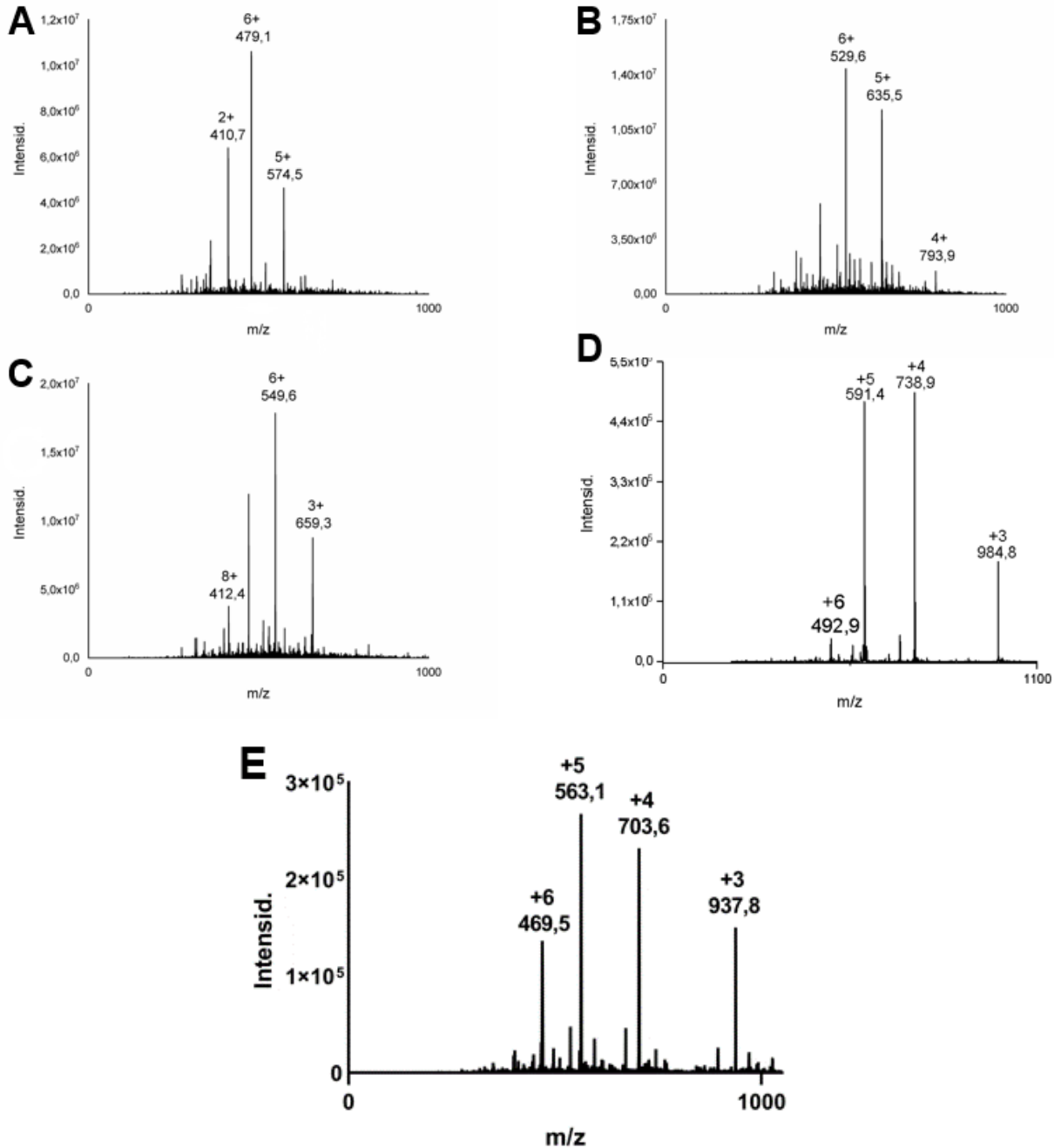
Após as sínteses, os materiais foram clivados em soluções contendo TFA/H₂O/TIS e as massas obtidas estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Dados obtidos da clivagem dos peptídeos e solução de clivagem utilizada.

Peptídeo	Massa clivada (g)	Massa obtida (g)	Solução (TFA / TIS / H₂O) (%)
p-BT	5,049	1,583	95 / 2,5 / 2,5
AG-p-BT	0,385	0,120	80 / 15 / 5
Fc-p-BT	0,376	0,120	95 / 2,5 / 2,5
Ac-p-BT	0,128	0,037	95 / 2,5 / 2,5
p-BT linear	1,078	0,344	95 / 2,5 / 2,5

A confirmação da obtenção dos peptídeos desejados foi realizada por meio da determinação das massas molares dos produtos obtidos por meio da espectrometria de massas: p-BT (MM calculada: 2.868,47 g/mol) (figura 11A), AG-p-BT (MM calculada: 3.172,47 g/mol) (figura 11B), Fc-p-BT (MM calculada: 3.292,47 g/mol) (figura 11C), Ac-p-BT (MM calculada: 2.952,5 g/mol) (figura 11D) e p-BT linear (MM calculada: 2.811,36 g/mol) (figura 11E).

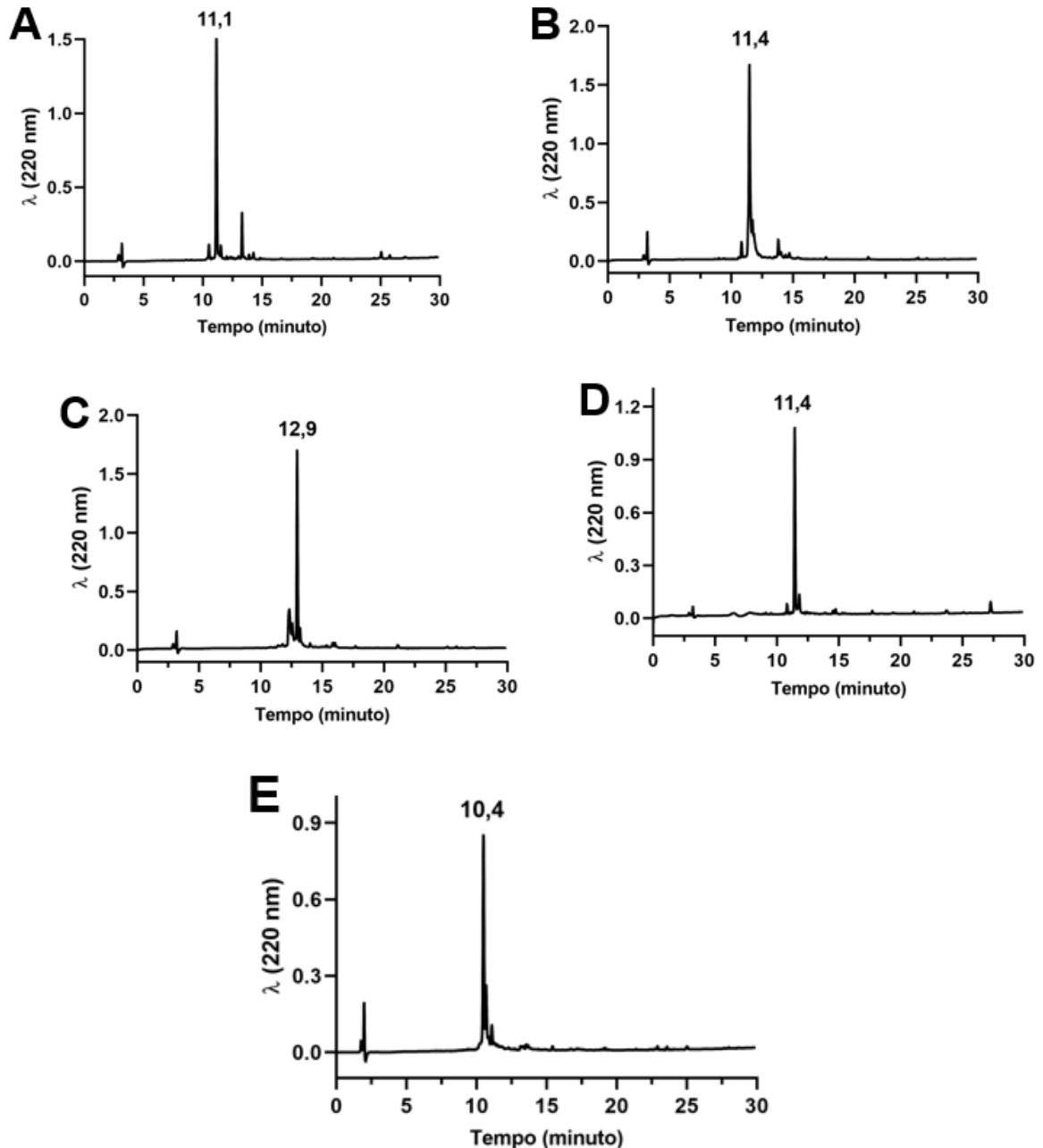
Figura 11 – Espectro de massas dos peptídeos obtidos. A) p-BT; B) AG-p-BT; C) Fc-p-BT; D) Ac-p-BT; E) p-BT linear.



Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos foram obtidos em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min e com fluxo de 1 mL/min. O peptídeo p-BT apresentou um tempo de retenção de 11,1 min (figura 12-A), o AG-p-BT exibiu um tempo de retenção de 11,4 min (figura 12-B), o Fc-p-BT demonstrou retenção de 12,9 min (figura 12-C), o Ac-p-

BT evidenciou uma retenção de 11,4 min (figura 12-D), e o peptídeo p-BT linear mostrou retenção de 10,4 min (figura 12-E).

Figura 12 – Perfis cromatográficos dos peptídeos brutos. A) p-BT; B) AG-p-BT; C) Fc-p-BT; D) Ac-p-BT; E) p-BT linear.



Os peptídeos e análogos foram purificados em sistema CLAE semi-preparativo, e as frações obtidas nas purificações foram avaliadas em sistema CLAE analítico.

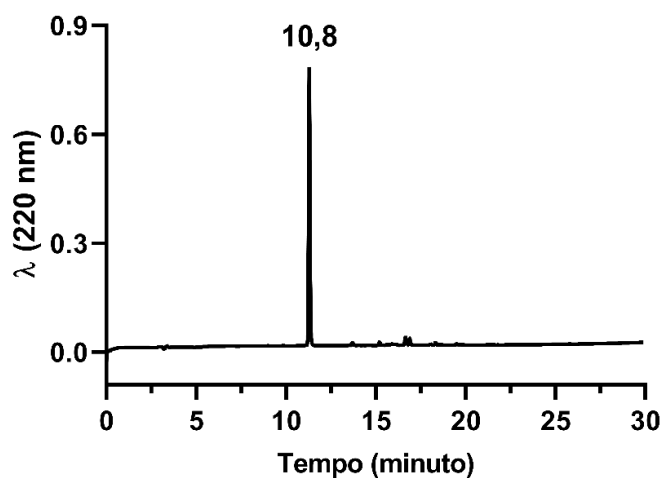
Foram purificados aproximadamente 1,583 g de peptídeo bruto p-BT, sendo necessário quinze purificações de 100 mg cada, obtendo 704 mg de peptídeo de

interesse, com pureza acima de 95%, o perfil cromatográfico do peptídeo puro pode ser observado na figura 13. As condições da purificação podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 5 – Condições das purificações dos peptídeos brutos e os rendimentos obtidos.

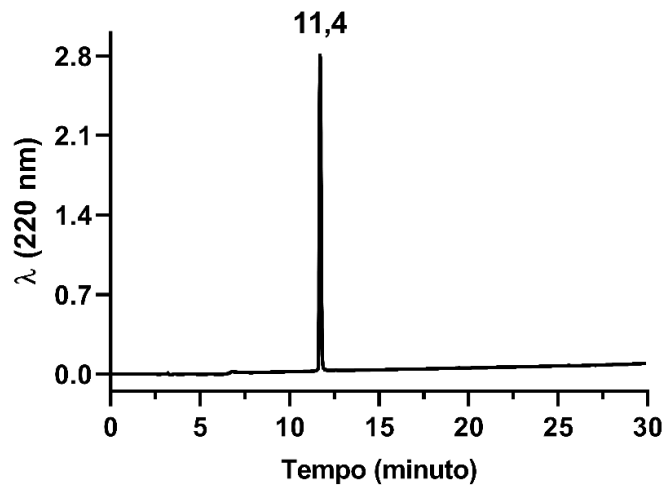
Peptídeo	Programa	Peptídeo puro (mg)	Rendimento (%)
p-BT	10 a 40 em 90 min	704	35
AG-p-BT	5 a 25 em 90 min	28	11
Fc-p-BT	15 a 35 em 60 min	20	15
Ac-p-BT	10 a 40 em 90 min	16	30
p-BT linear	10 a 40 em 90 min	27	60

Figura 13 – Perfil cromatográfico do p-BT, com pureza acima de 95%.



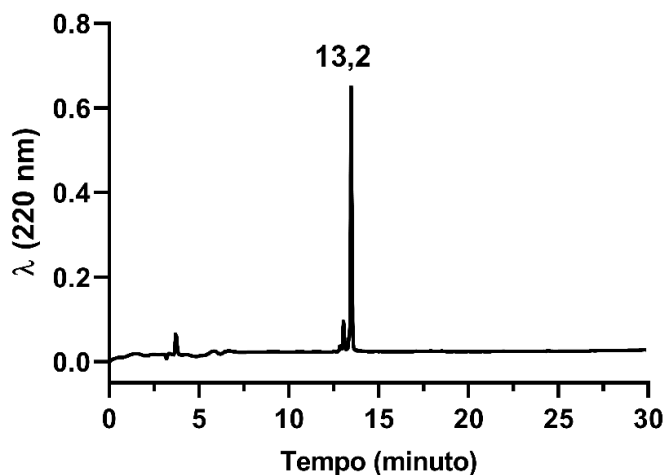
O peptídeo AG-p-BT foi purificado utilizando uma massa de 100 mg do material bruto, obtendo 28 mg do peptídeo de interesse com pureza de 100%. O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 14. As condições da purificação podem ser observadas na tabela 5. Embora o peptídeo AG-p-BT, tenha tempo de retenção semelhante aos demais, o seu gradiente de purificação foi escolhido visando uma melhor separação durante a purificação.

Figura 14 – Perfil cromatográfico peptídeo AG-p-BT, com pureza de 100%.



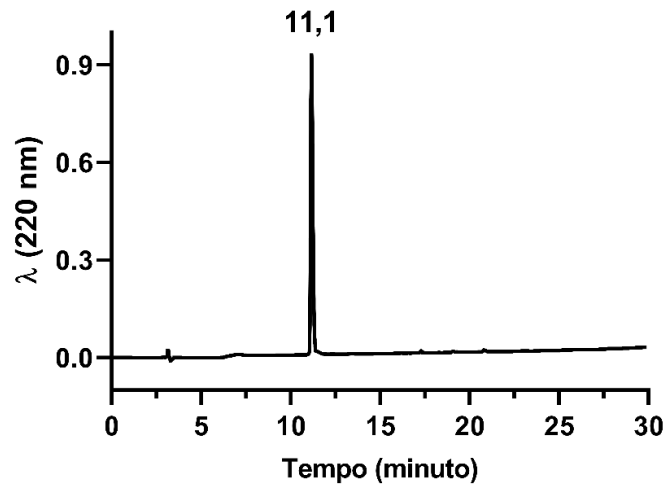
Uma massa de 100 mg de peptídeo bruto Fc-p-BT foi purificada, obtendo 28 mg de uma fração parcialmente purificada. Durante a purificação foram encontradas dificuldades para obtenção de frações com alto grau de pureza, com isso a fração de 28 mg de peptídeo puro foi novamente purificada em sistema CLAE semi-preparativo em gradiente descrito na tabela 5. Alguns estudos demonstraram a instabilidade do anel do grupo ferroceno em meio ácido (MARTIĆ *et al.*, 2011), para evitar que isso ocorresse, as frações obtidas foram liofilizadas instantaneamente. O perfil cromatográfico obtido após a segunda purificação pode ser observado na figura 15, com pureza de 90%. A massa obtida nesse procedimento foi de 20 mg do peptídeo de interesse. As condições da purificação podem ser observadas na tabela 5.

Figura 15 – Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-p-BT, pureza de 90%.



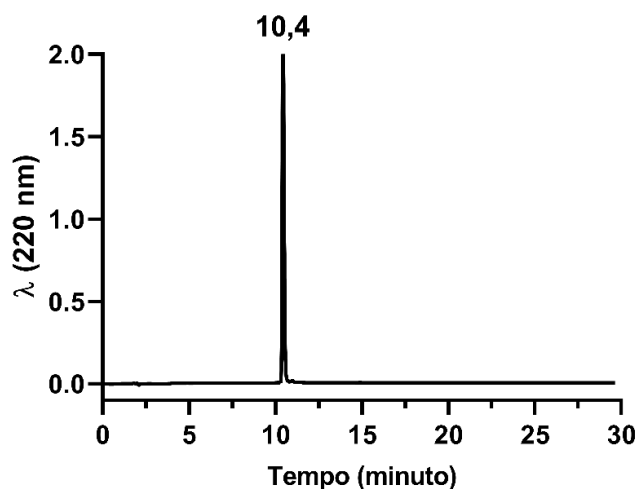
O peptídeo Ac-p-BT teve 37 mg de material bruto purificado, obtendo 16,6 mg do peptídeo de interesse, com uma pureza de 100%. O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 16. As condições da purificação podem ser observadas na tabela 5.

Figura 16 – Perfil cromatográfico peptídeo Ac-p-BT, pureza de 100%.



Foi purificado 101 mg do peptídeo p-BT linear bruto e obteve-se 22,6 mg da fração pura de interesse, com pureza de 100%. O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 17. As condições de purificação podem ser observadas na tabela 5.

Figura 17 – Perfil cromatográfico peptídeo p-BT linear, pureza de 100%.



4.4 – Dicroísmo Circular

A natureza das ligações peptídicas e suas ligações amidas, possuem propriedades eletrônicas e vibracionais importantes, sendo sondadas por vários métodos, um desses métodos é o dicroísmo circular (CD). Essa técnica permite avaliar a estrutura secundária de proteínas e peptídeos e consiste na absorção diferencial da luz circularmente polarizada pelas ligações amidas (AVITABILE *et al.*, 2014; KEIDERLING, 2020). Os dados sobre a estrutura secundária dos peptídeos são essenciais para a compreensão da relação entre sua estrutura e função.

Para avaliar o efeito da adição da molécula (ferroceno e ácido gálico) e das modificações (acetilação e peptídeo linear), os peptídeos foram testados em solução tampão PBS (solução salina que preserva pH constante), micelas de LPC e solução de TFE – Figura 18. O LPC é conhecido como um detergente que imita o meio ambiente encontrado na membrana. O TFE é um composto orgânico que interage fortemente com a água, forçando o peptídeo a autoestruturação.

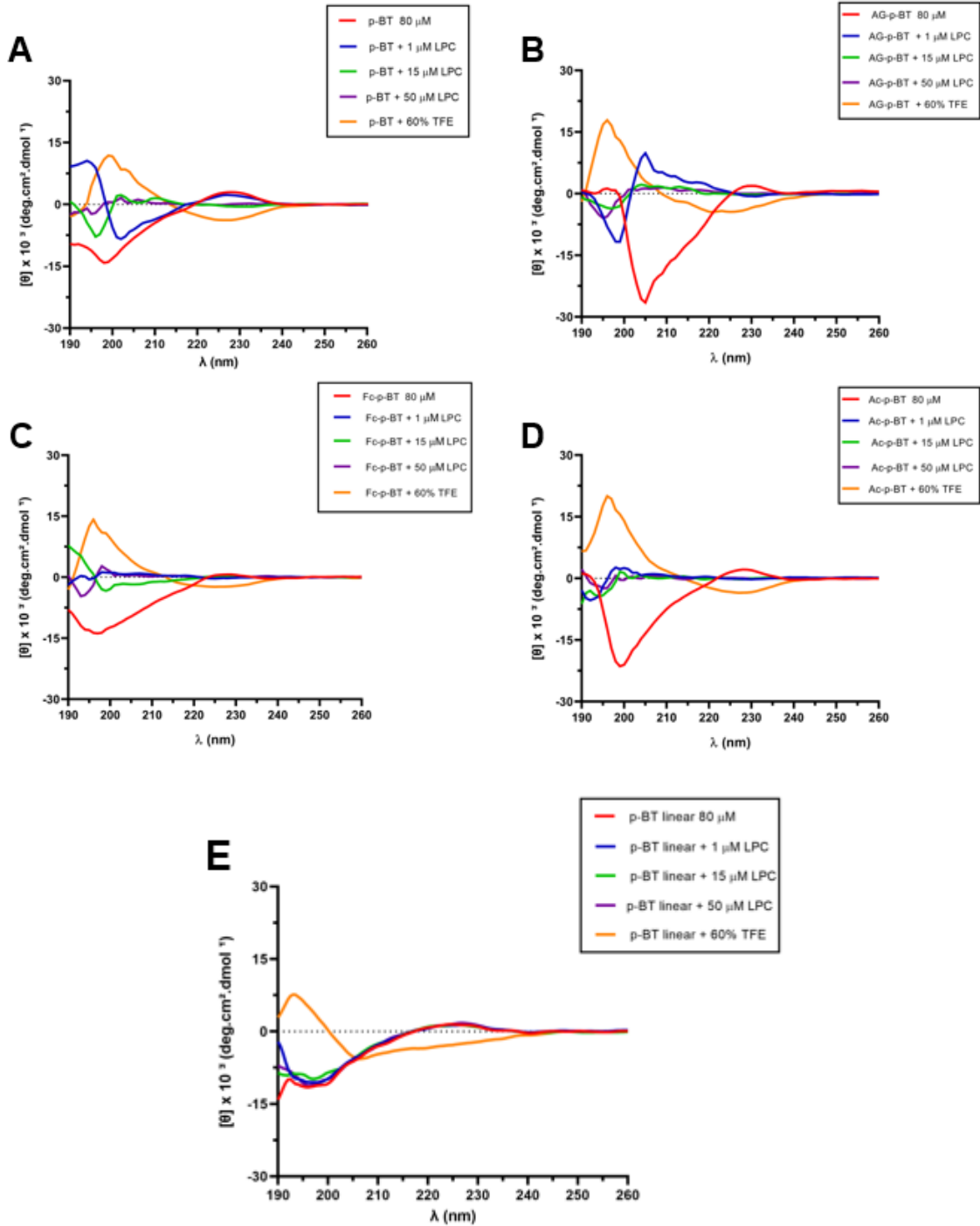
Os espectros foram realizados com soluções de peptídeos de 80 μ M. Os ensaios de CD em tampão PBS e em LPC mostraram que o peptídeo p-BT apresentou predominantemente uma conformação desordenada (random coil), com banda negativa em torno de 195 nm, semelhante ao encontrado por Santos-filho *et al.* (2015) para o peptídeo contendo a dimerização do peptídeo originalmente extraído da toxina por ponte dissulfeto. No mesmo espectro observamos que p-BT apresenta uma banda fraca positiva próximo a 230 nm, podendo indicar a presença de uma dobra na estrutura do peptídeo como descrito por Migliore e parceiros (2020). Alguns autores propuseram que, bandas diferentes podem significar dois estados conformacionais diferentes, como acreditamos que acontece no peptídeo em estudo. O mesmo peptídeo em solvente indutor de estrutura (TFE), apresenta um espectro com formato correspondente em β -turn do tipo I, com banda negativa próximo à 225 nm e banda positiva fraca próximo a 200 nm (GREENFIELD, 2004; BYRNE *et al.*, 2019). Nessa estrutura todos os aminoácidos presentes são importantes, sendo impossível a substituição de qualquer resíduo (KHATRI *et al.*, 2020; MIGLIORE *et al.* 2020) sem a perda da estrutura e conseqüentemente da atividade biológica. Santos-filho e colaboradores (2021), mostraram que a atividade antibacteriana é perdida em grande parte com a substituição de quaisquer aminoácidos aromáticos ou básicos pela alanina. Na presença de LPC, apesar de ocorrerem diferenças nos espectros em função da concentração de detergente, não foi possível verificar a estruturação do

peptídeo. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Santos-filho e parceiros (2015) que não observaram permeabilização de vesículas quando na presença do peptídeo dimerizado com o resíduo de cisteína. Em outro estudo foi proposto que o peptídeo p-BT apresenta mecanismos de ação diferentes para *E. coli* (internalização do peptídeo) e *S. aureus* (ação direta na superfície da bactéria) (SANTOS-FILHO *et al.*, 2021). Essas informações indicam diferentes alvos biológicos e ajudam a compreender as diferentes estruturas encontradas.

Os peptídeos Fc-p-BT, AG-p-BT, Ac-p-BT e p-BT linear nos ensaios de CD em PBS também mostraram a predominância da conformação desordenada. Em solvente indutor de estrutura (TFE), os peptídeos (Fc-p-BT, AG-p-BT e Ac-p-BT) mostraram espectros similares, caracterizando a presença de uma β -turn do tipo I. Já o peptídeo p-BT linear em TFE apresenta uma tendência em α -hélice (banda negativa 208 nm e positiva em 195 nm) (Figura 18-E) (BIAGGI, 1998).

Em LPC os peptídeos p-BT, AG-p-BT, Fc-p-BT e Ac-p-BT não apresentaram estruturação significativa, indicando que os peptídeos não interagem com a membrana e não possuem mecanismo de ação na bicamada lipídica.

Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos p-BT (A), Fc-p-BT (B), AG-p-BT (C), Ac-p-BT (D) e p-BT linear (E) em tampão PBS, micelas de LPC e em TFE.



4.5 – Ensaios Biológicos

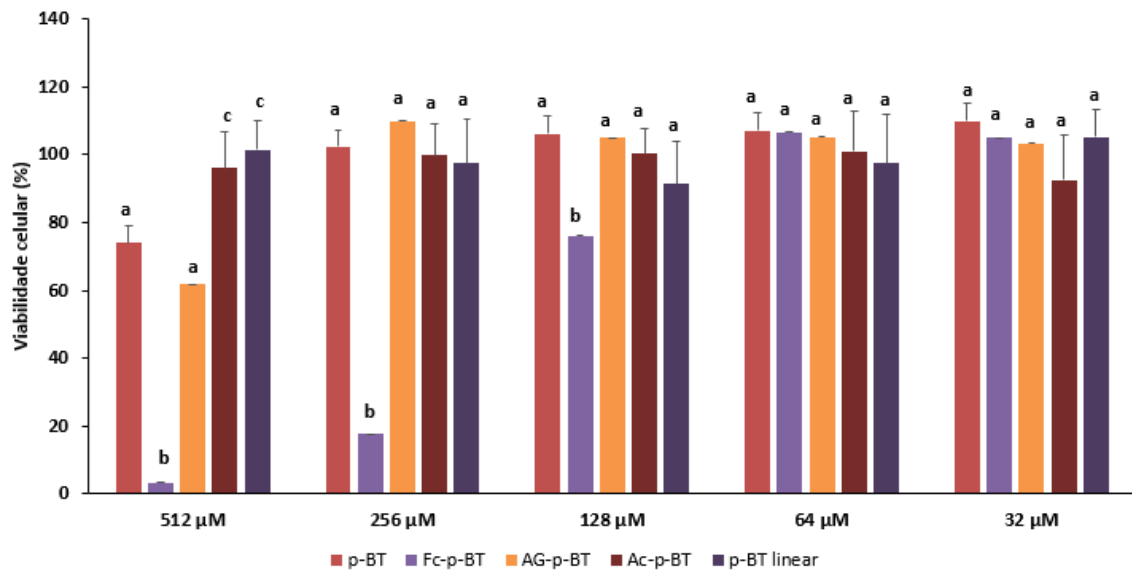
4.5.1 – Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade é fundamental para definir a capacidade do composto de causar danos e/ou matar célula do hospedeiro (COURA, 2014). Para um composto ser considerado biocompatível é necessário que o mesmo não apresente citotoxicidade na concentração em que ele exerce a atividade desejada. Os estudos iniciais são realizados sem a utilização de animais, sendo chamados de estudos *in vitro* (BRUM, 2017; CANELLA *et al.*, 2019). A viabilidade celular é considerada boa quando a porcentagem de células crescentes e saudáveis no meio é superior à 90% ou 80%, dependendo do estudo. Na concentração que os compostos apresentam os valores acima, estes causam pouco danos à linhagem celular, podendo ser utilizados nos estudos posteriores.

Diversas linhagens celulares são utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos, neste trabalho foi utilizada a NIH/3T3, que é uma linhagem de fibroblastos provenientes de embriões de camundongos albinos (TODARO; GREEN, 1963).

Os peptídeos p-BT e AG-p-BT (Figura 19 – rosa e laranja) apresentaram viabilidade celular >90% nas concentrações de 32 à 256 μM . Em 512 μM , ambos os peptídeos promoveram uma redução na viabilidade celular de 20% e 38%, respectivamente. Desta forma, essas moléculas são promissoras para o uso como antimicrobianos, já que apresentam baixa toxicidade. Somado a isso, as concentrações em essas duas moléculas foram ativas em bactérias gram-negativas foram inferiores à 256 μM (Tabela 6).

Figura 19 – Viabilidade celular (%) dos peptídeos em fibroblastos (linhagem NIH/3T3).



Já o peptídeo Fc-p-BT apresentou viabilidade celular acima de 90% apenas nas concentrações de 32 e 64 μM (Figura 19 – roxo claro). A partir de 128 μM, a viabilidade é reduzida para aproximadamente 80%. Em contrapartida, o CIM e a CBM para bactérias gram-negativas foi entre 4 e 8 μM.

Com exceção do AG-p-BT, os peptídeos não são possíveis de serem empregados em bactérias gram-positivas, pois apresentam valores de toxicidade próximas ao CIM e CBM.

Os peptídeos Ac-p-BT e p-BT linear apresentaram viabilidade celular superior à 90% em todas as concentrações avaliadas (Figura 19 – vermelho escuro e roxo escuro), isto é, foram menos tóxicos que os demais. No entanto, ao determinar as concentrações necessárias para lesar e/ou matar as bactérias, os resultados foram negativos em relação aos encontrados para os peptídeos anteriormente estudados, principalmente para as bactérias gram-negativas.

O Fc e o AG não foram analisados individualmente, mas estudos anteriores mostraram que essas moléculas apresentam baixa citotoxicidade (WANG *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2021).

4.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A avaliação antibacteriana em cepas Gram-negativas e positivas mostraram resultados diferentes para o peptídeo p-BT (Tabela 6). Em *E. coli* (gram-negativa), o peptídeo mostrou CIM e CBM de 4 μM . Para a *S. aureus*, a concentração de 128 μM foi estabelecida para a CIM.

Os peptídeos AG-p-BT e Fc-p-BT em bactérias de *E. coli* não apresentaram melhora em relação ao peptídeo original, mostrando que a conjugação com o composto orgânico não foi eficaz (Tabela 6). O peptídeo contendo Fc apresentou a mesma CIM do peptídeo original, isto é, 4 μM . Apesar dos valores serem iguais, devemos lembrar que a toxicidade do peptídeo contendo o Fc é maior.

Tabela 6 – CIM e CBM dos peptídeos em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Peptídeos	<i>E. coli</i> (μM)		<i>S. aureus</i> (μM)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
p-BT	4	4	128 (128-256)	256
AG-p-BT	32	32	64	64
Fc-p-BT	4 (4-8)	8	64 (64-128)	128
Ac-p-BT	128	256	128	256
p-BT linear	64 (64-128)	128	>512	>512
Ácido Gálico	>512	>512	256	256
Ferroceno	>512	>512	>512	>512
Ciprofloxacina	0,0315	0,0315	1 (1-2)	1 (1-2)

O acoplamento da molécula de ácido gálico, no entanto, promoveu um aumento da CIM e CBM para 32 μM , mostrando que a adição da molécula orgânica atrapalha a atividade do peptídeo original contra bactérias gram-negativas.

Para a bactéria Gram-positiva, o acoplamento dos compostos orgânicos melhorou a atividade do peptídeo. O peptídeo dimérico p-BT mostrou CIM e CBM de 128 μM e 256 μM respectivamente, enquanto os peptídeos contendo o ferroceno e o ácido gálico apresentaram CIM de 32 μM e 64 μM , respectivamente.

A melhora na atividade antimicrobiana na bactéria gram-positiva poderia estar relacionada à diminuição da carga positiva na região N-terminal do peptídeo, modificando sua estrutura e conseqüentemente a sua interação. Crusca e colaboradores (2011), mostraram que modificações na extremidade N-terminal do peptídeo antimicrobiano Hyl-a1 altera sua atividade. Para avaliar o efeito da carga na

atividade do peptídeo, esse foi avaliado na forma acetilada, que retira a carga positiva da extremidade.

O peptídeo Ac-p-BT apresentou uma grande piora na atividade antimicrobiana contra *E. coli*, mostrando que o efeito da carga existe na atividade antibacteriana desse peptídeo. A retirada da carga positiva da região N-terminal faz o peptídeo p-BT perder completamente sua atividade. Esses dados estão em sintonia com os apresentados com Santos-filho e colaboradores (2017), que mostrou que os aminoácidos positivos (Lys) na extremidade N-terminal são importantes para a atividade do peptídeo.

Estudos realizados por Albada e Metzler-Nolte (2017) avaliaram as modificações de peptídeos com organometálicos (OM-PAMs). A adição de ferroceno, rutenoceno ou osmoceno aumentou a atividade do composto obtido contra bactérias gram-positivas. Estudos mais detalhados do composto contendo o rutenoceno mostraram que a melhora na atividade estava diretamente relacionada com enzimas importantes para estruturação da membrana celular.

O AG mostra atividade antibacteriana agindo em diferentes alvos. Estudos de revisão, como de Gupta e parceiros (2021), mostraram que a formação de biofilme é prejudicada pelo AG, além disso a molécula pode promover perturbação na membrana e desestabilização. Já nos estudos de Liu e colaboradores (2017) foi observado que em bactérias gram-negativa e gram-positiva o ácido gálico chegava no interior da célula, provavelmente agindo em um alvo intracelular, sendo que em gram-negativas sua atividade também estava relacionada com a membrana celular.

Esses trabalhos corroboram os resultados observados por nós, onde, o acoplamento do Fc e do AG à região N-terminal potencializou a atividade para *S. aureus*. Os dados acima apresentados mostram que o acoplamento do ferroceno e do ácido gálico na extremidade N-terminal do peptídeo p-BT afeta a atividade das moléculas diferentemente em bactérias gram-positiva e gram-negativa. No entanto, experimentos adicionais precisam ser realizados, para o entendimento dessas modificações. De qualquer forma, acreditamos que essas moléculas são promissoras para o desenvolvimento de novas pesquisas e compreensão dos mecanismos de ação que ainda não são completamente entendidos.

4.6 – Permeabilização em vesícula

Para avaliar se as modificações realizadas poderiam promover a interação desses peptídeos com a membrana e a formação de poros e/ou dissolução via mecanismo de carpete, estudos de permeabilização foram realizados.

Esses modelos são importantes para compreender as interações e os mecanismos de ação de várias moléculas, como os PAMs. Os principais miméticos empregados são as vesículas, que são fáceis de serem obtidas e possuem um ambiente mais parecido com uma bicamada lipídica (ARIMA, 2010).

As composições lipídicas podem ser variadas, o que proporciona a obtenção de vesículas apenas com lipídeos zwitteriônicos, que mimetizam em parte as membranas de eucariotos (MUNIZ *et al.*, 2020); e contendo lipídios com cargas negativas (aniônicas), que mimetizam a membrana das bactérias (THOMBARE *et al.*, 2018; CASTELLETTO *et al.*, 2018).

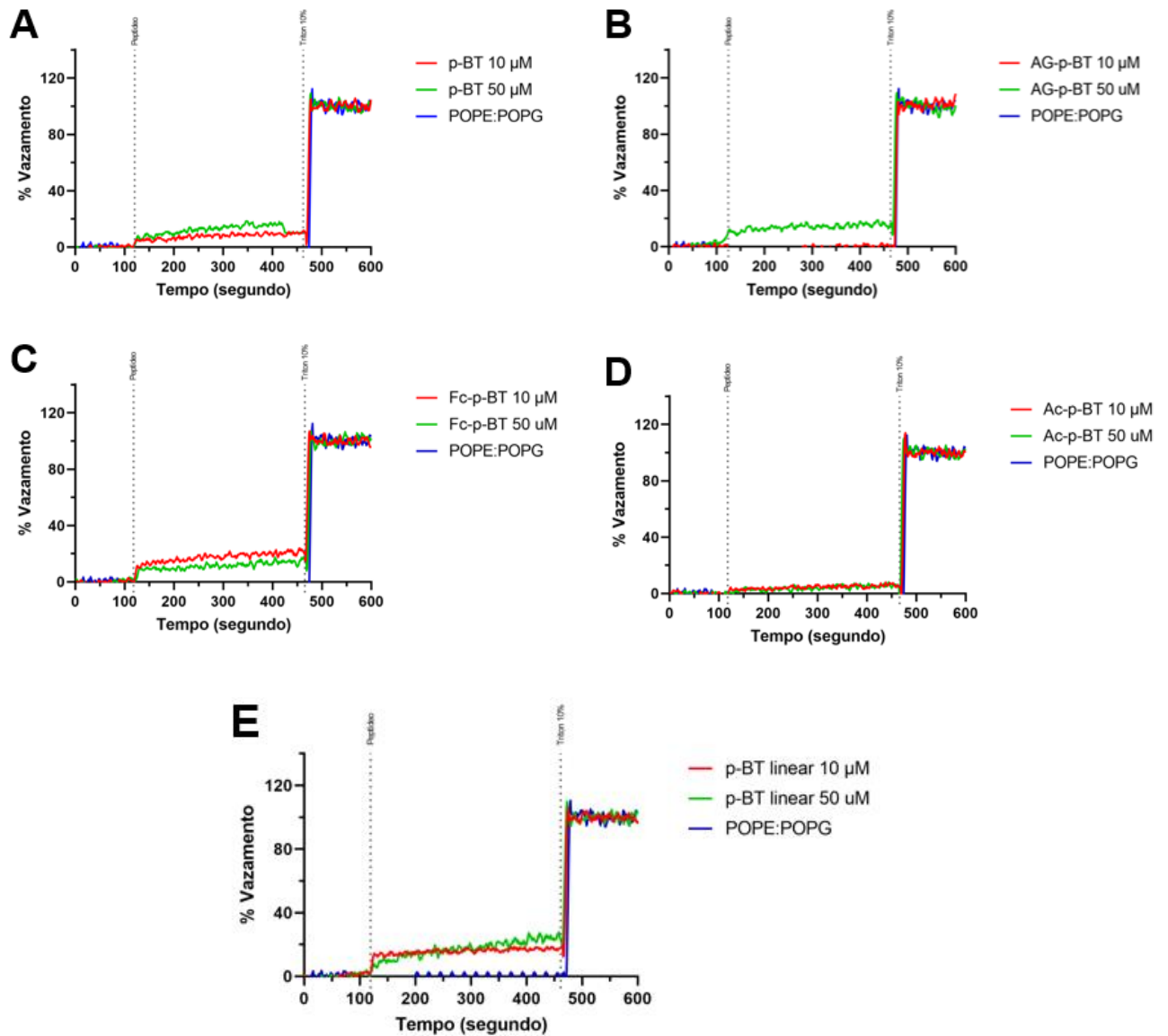
Lipídeos com a cabeça polar contendo a fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG) são carregados negativamente, favorecendo a interação eletrostática de peptídeos positivo, a maioria dos PAMs (HITCHNER *et al.*, 2021).

Algumas composições lipídicas já foram estudadas com o peptídeo (p-BthTX-l)₂, que foi a inspiração para o desenho do peptídeo p-BT e seus bioconjugados. Santos-filho e parceiros (2015), observaram que nas composições lipídicas de 80% POPE e 20% POPG o peptídeo não teve vazamento de carboxifluoresceína. Esse mesmo resultado foi observado por nós nesse estudo (figura 20), para as vesículas compostas de 80% POPE e 20% POPG, modelo simples membrana de bactérias (VAN MEER; KROON, 2011), onde mesmo em concentrações muito elevadas, os peptídeos não promoveram vazamento de carboxifluoresceína em grande quantidade.

Apesar de composições lipídicas diferentes, estudos como de Cespedes e parceiros (2012) mostraram que o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha na concentração de 0,01 µM induziu o vazamento de aproximadamente 90 e 50% de carboxifluoresceína em vesículas constituídas de contendo DDPA/DPPC/SM (5/80/15%) DPA/DPPC/DPPE (5/80/15%), respectivamente. Lorenzón e colaboradores (2013) mostrou que em 16 µM o peptídeo Aureína 1.2 apresentou 100% de permeabilização em vesículas de DPPA/DPPC (5/95%). Em estudos com o peptídeo W⁶-Hy-a1 na concentração de 4

μM apresentou 90% de permeabilização enquanto seus análogos mostraram valores entre 50 e 70%. Os peptídeos aqui testados mesmo na concentração de 50 μM , muito acima das concentrações estudadas acima, não promoveram permeabilização acima de 20%, mostrando pouca ação na membrana celular (CRUSCA *et al.*, 2011).

Figura 20 – Permeabilização em vesículas 80% POPE e 20% POPG.

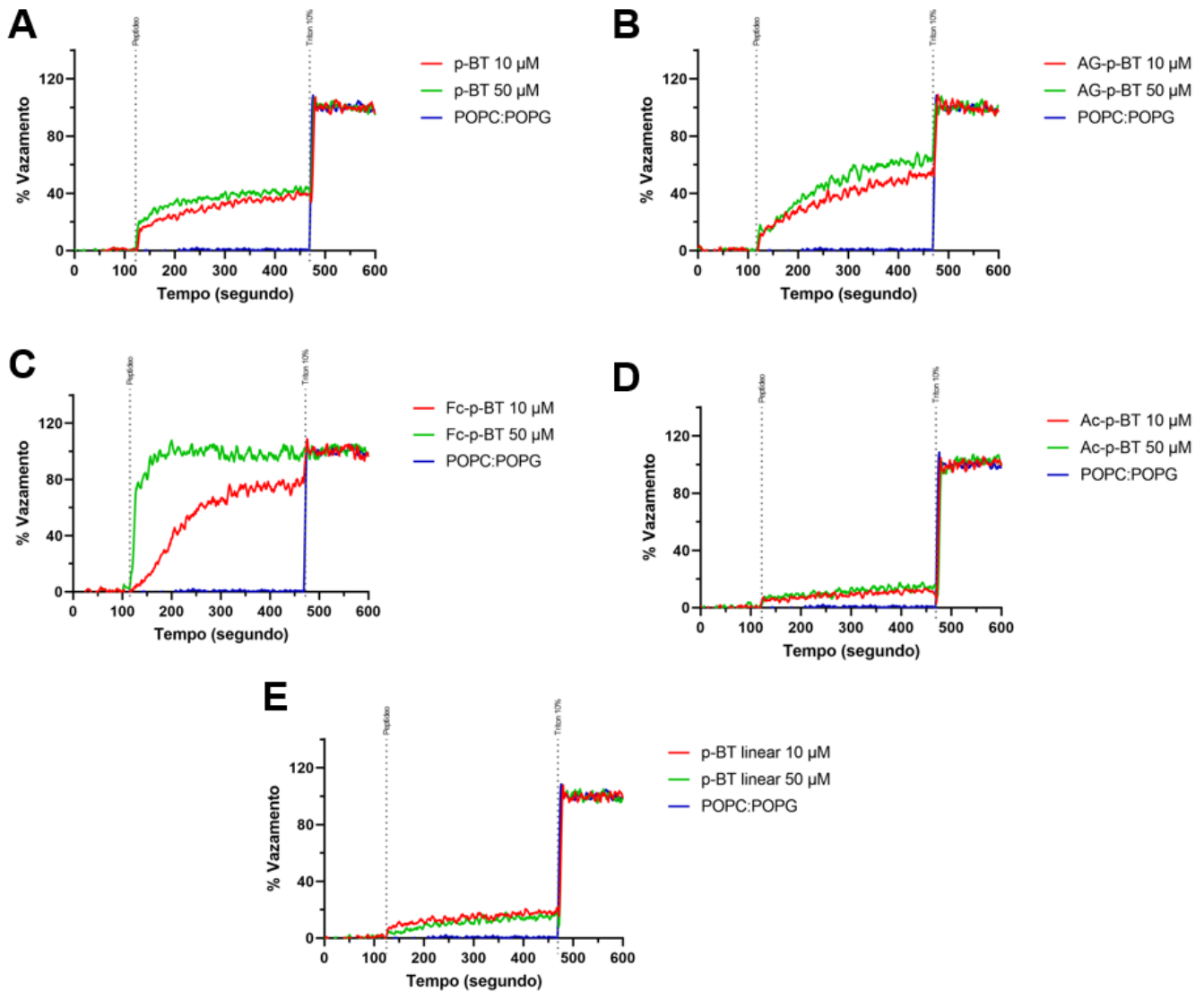


Os resultados observados mantêm a proposta de um mecanismo de ação diferente daquele encontrado normalmente para PAMs, isto é ação na bicamada lipídica da membrana. O alvo do peptídeo pode ser intracelular ou em outros compostos presentes na parede e/ou membrana das bactérias, o que explicaria a falta da liberação de carboxifluoresceína (CF).

Outra composição lipídica estudada por Santos-filho e colaboradores (2015),

foi 95% POPC e 5% POPG. Esse lipossoma mimetiza células eucarióticas, pois possuem alta porcentagem de fosfolipídios (PC), formando uma membrana com alto teor de lipídios zwitteriônicos (GONG et al., 2019). Os resultados obtidos com o peptídeo (p-BthTX-I)₂ mostraram quase nenhuma permeabilização das vesículas mesmo em 64 µM, indicando pouca ou nenhuma interação com a bicamada lipídica. O peptídeo p-BT apresentou aproximadamente 20% de permeabilização em 10 µM e alta permeabilização em 50 µM (Figura 21), indicando um mecanismo de ação, em alta concentração, na membrana. Estes resultados podem explicar os resultados de viabilidade celular desse peptídeo em fibroblastos em alta concentração, que mostra, apesar de baixa, uma toxicidade em 512 µM. Ressaltamos, no entanto, que esse peptídeo não apresenta atividade hemolítica considerável (SANTOS-FILHO *et al.*, 2021 – em submissão), mostrando que apesar de permeabilizar membranas, ele possui baixa toxicidade.

Figura 21 – Permeabilização em vesículas 95% POPC e 5% POPG.



O acoplamento de duas moléculas de Fc nas regiões N-terminais do p-BT (Figura 21-C) promoveram um aumento da liberação de CF, na concentração de 10 μM . Quanto maior a concentração deste peptídeo, maior a liberação de fluoróforo, sendo resultados coerentes com a formação de poros (MÁTYUS *et al.*, 2007; MARRINK *et al.*, 2009). O Fc possui a capacidade de perturbar a membrana por meio da peroxidação lipídica, consequentemente causando lise celular (ZHRANI *et al.*, 2020). Com isso a molécula orgânica acoplada ao peptídeo apresentou uma toxicidade maior, como observado nos estudos descritos anteriormente (Citotoxicidade – página 50).

A presença de moléculas de AG aos grupos N-terminais (Figura 21-B), mostrou

um comportamento singular, onde a liberação de CF foi independente da concentração, mas não atinge o platô de 100% de liberação de fluoróforo. Sendo que estudos adicionais são necessários para entender esses dados.

Os peptídeos linear e acetilado mostraram pouca permeabilização, mesmo na concentração de 50 μM , resultados semelhantes ao da composição lipídica da bactéria.

5- Conclusões

A síntese de peptídeo em fase sólida possibilitou a obtenção dos bioconjugados diméricos contendo as moléculas orgânicas Fc e AG. Pequenas dificuldades foram observadas na purificação do Fc-p-BT, que inicialmente apresentou baixo grau de pureza, sendo necessária uma nova purificação. Esse dado mostra uma baixa estabilidade deste composto no meio utilizado na clivagem e purificação.

Os peptídeos p-BT, AG-p-BT, Fc-p-BT e Ac-p-BT, analisados pela técnica de dicroísmo circular, apresentaram estruturas em *random coil*, com tendência em estruturação em dobra β do tipo I ao entrar em contato com solventes estruturantes.

O peptídeo p-BT linear apresentou tendência em se estruturar em α -hélice em contato com TFE. Esse dado mostra que o peptídeo p-BT necessita de uma estrutura *random coil* para a interação inicial com as bactérias, e qualquer estruturação diminui sua atividade.

Não foi observado aumento da atividade antibacteriana sobre *E. coli* (Gram-negativa) com a adição dos compostos orgânicos ao peptídeo p-BT. No entanto, Fc-p-BT e AG-p-BT apresentam uma melhora na atividade contra *S. Aureus* (Gram-positiva). Adicionalmente, a adição do Fc na região N-terminal também promoveu um aumento na citotoxicidade em fibroblastos, o que pode inviabilizar o seu uso como molécula antimicrobiana em uso sistêmico. Esta toxicidade pode estar relacionada a capacidade de permeabilização de membrana deste bioconjugado, que apresentou os maiores vazamentos de carboxifluoresceína.

A região N-terminal acetilada e o peptídeo linear, Ac-p-BT e p-BT linear, respectivamente, não apresentaram melhora na atividade antimicrobiana, são sendo modificações vantajosas, mesmo não apresentando citotoxicidade. Estes resultados mostram a importância da estrutura dimérica na atividade do peptídeo. Somado a isso,

a pouca atividade do peptídeo acetilado mostra a importância da carga da extremidade N-terminal na atividade do peptídeo. Desta forma, a adição do FC e do AG em outra região da molécula poderia ser uma alternativa para melhorar a atividade do peptídeo.

Os resultados obtidos neste trabalho são significativos para compreensão da influência da bioconjugação e de outras modificações ao peptídeo p-BT.

6- Referências

AHMED, Tamer AE; HAMMAMI, Riadh. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of food biochemistry*, v. 43, n. 1, p. e12546, 2019.

ALBADA, Bauke; METZLER-NOLTE, Nils. Highly potent antibacterial organometallic peptide conjugates. *Accounts of chemical research*, v. 50, n. 10, p. 2510-2518, 2017.

ALVARES, Dayane S.; WILKE, Natalia; NETO, João Ruggiero. Effect of N-terminal acetylation on lytic activity and lipid-packing perturbation induced in model membranes by a mastoparan-like peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1860, n. 3, p. 737-748, 2018.

AMBLARD, Muriel et al. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology*, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006.

ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid; KUBICEK-SUTHERLAND, Jessica Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, v. 26, p. 43-57, 2016.

ANVISA BRASIL. “Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos”. Outubro, 2018.

ARIMA, Anderson Akira. Estudo comparativo entre as alterações produzidas pelas biomoléculas floretina e barbalóina na estrutura e na hidratação de membranas modelo negativamente carregadas de DMPG. 2010.

AVITABILE, Concetta et al. Circular dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. *Scientific reports*, v. 4, p. 4293, 2014.

BADEA, Mihaela et al. Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses. *Science of The Total Environment*, v. 672, p. 129-140, 2019.

BAI, Jinrong et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, p. 110985, 2021.

- BAINDARA, Piyush; GHOSH, Ananta K.; MANDAL, Santi M. Coevolution of resistance against antimicrobial peptides. *Microbial Drug Resistance*, v. 26, n. 8, p. 880-899, 2020.
- BAPTISTA, M. G. de F. M. et al. Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. Dissertação de Mestrado
- BATISTA, M. N., SANCHES, P. R. S., CARNEIRO, B. M., BRAGA, A. C. S., CAMPOS, G. R. F., CILLI, E. M., RAHAL, P. GA-Hecate antiviral properties on HCV whole cycle represent a new antiviral class and open the door for the development of broad spectrum antivirals. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 14329, 2018.
- BECHINGER, Burkhard; LOHNER, Karl. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006.
- BEHRENDT, Raymond; WHITE, Peter; OFFER, John. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, v. 22, n. 1, p. 4-27, 2016.
- BIAGGI, Márcia Helena. Interação de Peptídeos Melanotrópicos com Membranas Lipídicas-Um Estudo por Ressonância Paramagnética Eletrônica e Dicroísmo Circular. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BORGES, Anabela et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.
- BROTZU, G. Ricerche su di un nuovo antibiotico. *Lavori dell'Istituto di Igiene di Cagliari* 4-18 (1948)
- BRUM, Renata Scheeren et al. Produção, caracterização e avaliação da citotoxicidade de poli-éter-éter-cetona sulfonado para aplicação em implantodontia. 2017.
- BYRNE, Cillian et al. Electronic circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies of peptides derived from the FKBP52-interacting β -turn of the hER α ligand-binding domain. *Peptide Science*, v. 111, n. 4, p. e24113, 2019.
- CAIAFFA, Karina Sampaio et al. KR-12-a5 is a non-cytotoxic agent with potent antimicrobial effects against oral pathogens. *Biofouling*, v. 33, n. 10, p. 807-818, 2017.
- CANNELLA, Vincenza et al. Cytotoxicity evaluation of endodontic pins on L929 cell line. *BioMed research international*, v. 2019, 2019.
- CASALLANOVO, Fábio et al. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.
- CASTELLETTO, Valeria et al. Arginine-containing surfactant-like peptides: interaction with lipid membranes and antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 7, p. 2782-2794, 2018.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.

CESPEDES, Graziely Ferreira et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein and peptide letters*, v. 19, n. 6, p. 596-603, 2012.

COSTA F. G. Caracterização do efeito antifúngico de peptídeos presentes na peçonha de escorpiões em linhagens de *Cryptococcus neoformans*. Tese Mestrado. Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas. Brasília. 2014.

COSTA, Natália Caroline Silva. Potencial antimicrobiano do peptídeo RP1 conjugado com ferroceno. 2018.

COSTA, Natalia CS et al. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. *Plos one*, v. 15, n. 3, p. e0228740, 2020.

COURA, Gustavo dos Santos et al. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana: avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA. 2004.

CRUSCA JR, Edson et al. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. *Peptide Science*, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

DAVIES, Julian. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 7, p. 496-499, 2006.

DENG, Jie-Ren et al. N-Terminal selective modification of peptides and proteins using 2-ethynylbenzaldehydes. *Communications Chemistry*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2020.

DHEMAN, Nidhi et al. An analysis of antibacterial drug development trends in the US, 1980–2019. *Clinical Infectious Diseases*, 2020.

DI SOMMA, Angela et al. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules*, v. 10, n. 4, p. 652, 2020.

Disponível em: <<http://pepdraw.com/>>. Acesso em: 03/05/2021

Disponível em: <<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>>. Acesso em: 03/05/2021

Disponível em: <<https://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/>>. Acesso em: 28/05/2021

DIVYASHREE, Mithoor et al. Clinical applications of antimicrobial peptides (AMPs): where do we stand now? *Protein and peptide letters*, v. 27, n. 2, p. 120-134, 2020.

DOMAGK, G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 61, 250–253 (1935)

DU, Xiaoxian et al. Rapid and Easy Enrichment Strategy for Naturally Acetylated N Termini Based on LysN Digestion and Amine-Reactive Resin Capture. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 12, p. 8315-8322, 2020.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *J. Exp. Med.* 70, 1–10 (1939)

DUGGAR, B. M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 177–181 (1948)

FENG, Yaoyao et al. Self-Assembly of Ferrocene Peptides: A Nonheme Strategy to Construct a Peroxidase Mimic. *Advanced Materials Interfaces*, v. 6, n. 20, p. 1901082, 2019.

FRIBERG, L. E.; GUEDJ, J. Acute bacterial or viral infection—What's the difference? A perspective from PKPD modellers. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 9, p. 1133-1136, 2020.

FRY, Bryan G. et al. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 7, n. 2, p. 215-246, 2008.

GHOSH, Chandradhish et al. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in microbiology*, v. 27, n. 4, p. 323-338, 2019.

GONG, Haoning et al. Hydrophobic control of the bioactivity and cytotoxicity of de novo-designed antimicrobial peptides. *ACS applied materials & interfaces*, v. 11, n. 38, p. 34609-34620, 2019.

GREENFIELD, Norma J. Analysis of circular dichroism data. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 2004. p. 282-317.

GRIMSEY, Elizabeth et al. The effect of lipidation and glycosylation on short cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1862, n. 8, p. 183195, 2020.

GUPTA, Rani Dinesh et al. Gallic Acid: A Versatile Molecule with Promising Pharmacological Effect, 2021.

HASAN, Thualfakar Hayder; AL-HARMOOSH, Raad A. Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. *Systematic Reviews in Pharmacy*, v. 11, n. 6, p. 817-823, 2020

HITCHNER, Morgan A. et al. Effect of non-natural hydrophobic amino acids on the efficacy and properties of the antimicrobial peptide C18G. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 13, n. 2, p. 527-541, 2021.

HUDECZ, Ferenc. 13 Synthesis of Peptide Bioconjugates. In: *Peptide Synthesis and Applications*. Humana Press, 2005. p. 209-223.

JONES, R. N. & Biedenbach, D. J. Antimicrobial activity of RU-66647, a new ketolide. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 7–12 (1997)

KAHKESHANI, Niloofar et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 22, n. 3, p. 225, 2019

KEALY, T. J.; PAUSON, P. L. A new type of organo-iron compound. *Nature*, v. 168, n. 4285, p. 1039-1040, 1951.

KEIDERLING, T. A. Structure of Condensed Phase Peptides: Insights from Vibrational Circular Dichroism and Raman Optical Activity Techniques. *Chemical Reviews*, 2020.

KHATRI, Bhavesh et al. Increasing protein stability by engineering the $n \rightarrow \pi^*$ interaction at the β -turn. *Chemical science*, v. 11, n. 35, p. 9480-9487, 2020.

KING, DAVID S.; FIELDS, CYNTHIA G.; FIELDS, GREGG B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *International journal of peptide and protein research*, v. 36, n. 3, p. 255-266, 1990.

KOEHBACH, Johannes; CRAIK, David J. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 40, n. 7, p. 517-528, 2019.

KUMAR, Prashant; KIZHAKKEDATHU, Jayachandran N.; STRAUS, Suzana K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, v. 8, n. 1, p. 4, 2018.

KUZMIN, D. V. et al. Effect of N-and C-terminal modifications on cytotoxic properties of antimicrobial peptide tachyplesin I. *Bulletin of experimental biology and medicine*, v. 162, n. 6, p. 754-757, 2017.

LANGFORD, Bradley J. et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020.

LAU, Jolene L.; DUNN, Michael K. Peptídeos terapêuticos: perspectivas históricas, tendências atuais de desenvolvimento e direções futuras. *Química bioorgânica e medicinal*, v. 26, n. 10, pág. 2700-2707, 2018.

LEADBETTER, M. R. et al. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). *J. Antibiot.* 57, 326–336 (2004)

LESHER, G. Y. et al. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 1063–1065 (1962)

LIU, Hanlan et al. Metabolism of bioconjugate therapeutics: why, when, and how?. *Drug metabolism reviews*, v. 52, n. 1, p. 66-124, 2020.

LIU, Jun et al. Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 174, p. 999-1017, 2017.

LOCATELLI, C. Derivados sintéticos do ácido gálico: compostos de baixa toxicidade e importantes propriedades antitumorais em modelos in vitro e in vivo. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

LOHNER, Karl. Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 17, n. 5, p. 508-519, 2017.

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; CALDERÓN, Leonel. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LORENZON, E. N. et al. Dimerization of Antimicrobial Peptides: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Peptide Activity. *Protein and peptide letters*, v. 26, n. 2, p. 98-107, 2019.

LORENZÓN, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. *Amino Acids*, v. 44, n. 6, p. 1521-1528, 2013.

LORENZÓN, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

LUDWIG, Beatrice S.; CORREIA, João DG; KÜHN, Fritz E. Ferrocene derivatives as anti-infective agents. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 396, p. 22-48, 2019.

LUONG, Huy Xuan; THANH, Tung Truong; TRAN, Tuan Hiep. Antimicrobial peptides—Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, p. 118407, 2020.

MAGANA, Maria et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020.

MANZINI, M. C. Efeito da carga dos lipídios na interação do BP100 em modelos de membrana. Tese de Mestrado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

MARRINK, Siewert J.; DE VRIES, Alex H.; TIELEMAN, D. Peter. Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1788, n. 1, p. 149-168, 2009.

MARTIĆ, Sanela et al. Ferrocene-peptide conjugates: from synthesis to sensory applications. *Dalton Transactions*, v. 40, n. 28, p. 7264-7290, 2011.

MATYUS, Edit; KANDT, Christian; TIELEMAN, D. Peter. Computer simulation of antimicrobial peptides. *Current medicinal chemistry*, v. 14, n. 26, p. 2789-2798, 2007.

MBABA, Mziyanda et al. Novobiocin–ferrocene conjugates possessing anticancer and antiplasmodial activity independent of HSP90 inhibition. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 24, n. 2, p. 139-149, 2019.

MEIER-MENCHES, Samuel M.; CASINI, Angela. Design Strategies and Medicinal Applications of Metal-Peptidic Bioconjugates. *Bioconjugate chemistry*, v. 31, n. 5, p. 1279-1288, 2020.

MESSINA, Marco S. et al. Preparation of biomolecule-polymer conjugates by grafting-from using ATRP, RAFT, or ROMP. *Progress in Polymer Science*, v. 100, p. 101186, 2020.

METSEMAKERS, Willem-Jan et al. Antimicrobial resistance, the COVID-19 pandemic, and lessons for the orthopaedic community. *JBJS*, v. 103, n. 1, p. 4-9, 2021.

MIASAKI, Kenneth MF et al. N-terminal acetylation of a mastoparan-like peptide enhances PE/PG segregation in model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 232, p. 104975, 2020.

MIGLIORE, Mattia et al. Characterization of β -turns by electronic circular dichroism spectroscopy: A coupled molecular dynamics and time-dependent density functional theory computational study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 22, n. 3, p. 1611-1623, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Protocolo de manejo clínico da Covid-19 na Atenção Especializada. 2020.

MOHR, Kathrin I. History of antibiotics research. How to Overcome the Antibiotic Crisis, p. 237-272, 2016.

MUNAWAR, Aisha et al. Snake venom peptides: Tools of biodiscovery. *Toxins*, v. 10, n. 11, p. 474, 2018.

MUNIZ, Gabriel S. Vignoli et al. Interaction of synthetic antimicrobial peptides of the Hylin a1 family with models of eukaryotic structures: Zwitterionic membranes and DNA. *Biochemistry and biophysics reports*, v. 24, p. 100827, 2020.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines. NIH: Bethesda, MD, USA, 2020.

NGUYEN, Leonard T.; HANEY, Evan F.; VOGEL, Hans J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.

NICOLAOU, Kyriacos C.; RIGOL, Stephan. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of antibiotics*, v. 71, n. 2, p. 153-184, 2018.

NOURI, Ali; HEIBATI, Fatemeh; HEIDARIAN, Esfandiar. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, p. 1-9, 2020.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *Stemming the Superbug Tide: Just a Few Dollars More*. Publishing, 2018.

OLIVEIRA, Eliandre et al. Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2002, n. 21, p. 3686-3694, 2002.

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde – OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:omspublica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticosurgentemente&Itemid=812>

ORREN, David K.; MACHWE, Amrita. Lysine acetylation of proteins and its characterization in human systems. In: Protein Acetylation. Humana, New York, NY, 2019. p. 107-130.

PEREIRA, Claudio MP; VENZKE, Dalila; TROSSINI, Gustavo HG. Síntese de heterociclos bioativos derivados do ferroceno. Química Nova, v. 36, n. 1, p. 143-152, 2013.

PHILLIPS, Rob. Membranes by the Numbers. In: Physics of Biological Membranes. Springer, Cham, 2018. p. 73-105.

ROOPE, Laurence SJ et al. The challenge of antimicrobial resistance: what economics can contribute. Science, v. 364, n. 6435, 2019

SAMY, Ramar Perumal et al. Animal venoms as antimicrobial agents. Biochemical pharmacology, v. 134, p. 127-138, 2017.

SANCHES, Paulo Ricardo da Silva. Estudo do peptídeo lítico Hecate e sua conjugação com ácido gálico: atividade contra o carcinoma cervical humano, mecanismo de ação e toxicidade. 2016.

SANCHES, Paulo RS et al. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. Amino Acids, v. 47, n. 7, p. 1433-1443, 2015.

SANTOS FILHO, N. A.; CAMARGO, I.L.B.C.; RIGETTO, G. M.; LEAL, T. C. Processo de obtenção dos peptídeos diméricos desCys11, Lys12, Lys13-(p-BthTXI) K, [Trp3,5] des-Cys11, Lys12, Lys13- (p-BthTX-I)K E [Trp3,5,10] des-Cys11, Lys12, Lys13- (p-BthTX-I)K e seus usos como antimicrobiano, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020180719149. Data de depósito: 24/10/2018

SANTOS, Juliana Izabel dos. Estudos estruturais com miotoxinas do tipo fosfolipases A2 homólogas do veneno de serpentes do gênero Bothrops: avanços no entendimento da relação estrutura-função. 2011.

SANTOS-FILHO, Norival A. et al. Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTX-I) 2 and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. Molecules, v. 22, n. 11, p. 1898, 2017.

SANTOS-FILHO, Norival A. et al. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. Toxicon, v. 103, p. 160-168, 2015.

SANTOS-FILHO, Norival Alves et al. Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) 2 derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA2)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Toxicon*, v. 196, p. 44-55, 2021.

SCHATZ, A., et al. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp. Biol. Med.* 55, 66–69 (1944)

SENSI, P., Margalith, P. & Timbal, M. T. Rifomycin, a new antibiotic; preliminar report. *Farmaco. Sci.* 14, 146–147 (1959)

SHAGAGHI, Nadin et al. Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 4, p. 1-13, 2018.

SHAO, Dongyan et al. Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Journal of food science*, v. 80, n. 6, p. M1299-M1305, 2015.

SLEE, A. M. et al. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1791–1797 (1987)

SUN, Gui-Li; WANG, Dong. Gallic acid from *Terminalia chebula* inhibited the growth of esophageal carcinoma cells by suppressing the Hippo signal pathway. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2020.

SUN, Shih-Wen et al. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of food composition and analysis*, v. 19, n. 2-3, p. 112-117, 2006.

TANIGUCHI, Masayuki et al. Effect of substituting arginine and lysine with alanine on antimicrobial activity and the mechanism of action of a cationic dodecapeptide (CL (14-25)), a partial sequence of cyanate lyase from rice. *Peptide Science*, v. 102, n. 1, p. 58-68, 2014.

THOMBARE, Varsha J. et al. Antimicrobial activity of simplified mimics of celogentin C. *Tetrahedron*, v. 74, n. 12, p. 1288-1293, 2018.

TODARO, George J.; GREEN, Howard. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*, v. 17, n. 2, p. 299-313, 1963.

TORRES, Marcelo DT et al. Peptide design principles for antimicrobial applications. *Journal of molecular biology*, v. 431, n. 18, p. 3547-3567, 2019.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiologia*. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VAN DEN BERGEN, Glen et al. Curved or linear? Predicting the 3-dimensional structure of α -helical antimicrobial peptides in an amphipathic environment. *FEBS letters*, v. 594, n. 6, p. 1062-1080, 2020.

VAN MEER, Gerrit; DE KROON, Anton IPM. Lipid map of the mammalian cell. *Journal of cell science*, v. 124, n. 1, p. 5-8, 2011.

VIKESLAND, Peter et al. Differential drivers of antimicrobial resistance across the world. *Accounts of chemical research*, v. 52, n. 4, p. 916-924, 2019.

WANG, Jiajun et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal research reviews*, v. 39, n. 3, p. 831-859, 2019.

WANG, Ruo et al. Ferrocene-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, mechanisms of action and structure-activity relationships. *European journal of medicinal chemistry*, v. 190, p. 112109, 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019.

YACOUB, Tania et al. Antimicrobials from venomous animals: An overview. *Molecules*, v. 25, n. 10, p. 2402, 2020.

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

ZAHRANI, Nourah A. AL; EL-SHISHTAWY, Reda M.; ASIRI, Abdullah M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European journal of medicinal chemistry*, p. 112609, 2020.

ZANIN, Luciana Puia Moro. Novos peptídeos sintéticos e estudo da interação com membranas modelo: efeito de modificações no N-terminal na atividade lítica e antimicrobiana. 2014.

ZEH, Gina et al. Anticancer Effect of an Electronically Coupled Oligoferrocene. *Organometallics*, v. 39, n. 17, p. 3112-3120, 2020.