

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

Augusto Peiró

Síntese e avaliação biológica de peptídeos contra o SARS-CoV-2

Araraquara – SP

2022

P378s	Peiró, Augusto Síntese e avaliação biológica de peptídeos contra o SARS-CoV-2 / Augusto Peiró. -- Araraquara, 2022 55 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Eduardo Maffud Cilli Coorientador: Paulo Ricardo da Silva Sanches 1. Agentes antivirais. 2. Metabólitos. 3. Peptídeos. 4. Inibidores. 5. Sobrevivência celular. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Augusto Peiró

Síntese e avaliação biológica de peptídeos contra o SARS-CoV-2

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

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Coorientador: Paulo Ricardo da Silva
Sanches

Araraquara – SP

2022

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

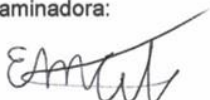
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese e avaliação biológica de peptídeos contra o SARS-CoV-2"

AUTOR: AUGUSTO PEIRÓ

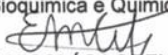
ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

COORIENTADOR: PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES

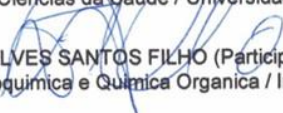
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



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. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 20 de maio de 2022

Dedicatória

Aos meus pais, Marcos e Elisabete, e a meu irmão André, que sempre me apoiaram em minhas escolhas pessoais e profissionais, sendo meu alicerce, meu refúgio, minha inspiração e fortaleza. Que um dia eu consiga fazer jus a todo o amor, carinho e força que vocês sempre me deram. Que Deus os abençoe!

Agradecimentos

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por ter me dado a chance de integrar ao seu grupo de pesquisa onde, tanto pude aprender e crescer. Também agradeço ao Eduardo pela paciência e por não desistir de mim me fazendo chegar até o final.

Ao meu coorientador o Dr. Paulo Ricardo da Silva Sanches por todo o suporte prestado, ensinamentos e auxílio nos experimentos.

A todos os meus colegas de Laboratório Mariana, Leticia, Sarah, Natália Costa, Marina, João, Lucas, Gabriela e Allison por compartilharem o seu companheirismo, fazendo com que o trabalho fosse mais fácil e divertido.

A minha amiga Natália Vitória que me ensinou muito mais que a síntese de peptídeos.

Aos professores Dr. Arnaldo Alves Cardoso do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pelo uso do Espectrofluorímetro. Prof. Lúcio de Freitas do Instituto de Biociências da USP pelos ensaios antivirais. Prof. Glaucius Oliva e Rafael V. C. Guido do CEPID/CIBFAR pelos ensaios de M^{pro} e PL^{pro}.

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

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

Aos meus amigos Barbara, Marco e Felipe por todo o companheirismo e amizade.

A minha família por todo apoio e carinho que tem comigo.

Resumo

Pandemias como a causada pelo SARS-CoV-2 afetam todos os setores da sociedade trazendo danos difíceis de serem superados. A alta e rápida disseminação da COVID-19 promoveu a saturação de hospitais e centros de saúde, fato que contribuiu para o aumento de mortes em todo o mundo. Diante do atual quadro de pandemia e do grande problema de saúde pública mundial que o vírus SARS-CoV-2 representa, além da necessidade de desenvolvimento de tratamentos eficazes para essa doença e possíveis epidemias/pandemias futuras, é de suma importância o estudo voltado para a identificação de novos compostos com ação antiviral. O presente estudo tem por objetivo sintetizar e avaliar o potencial de dois peptídeos e um bioconjugado contra o SARS-CoV-2. Neste trabalho, estes compostos foram sintetizados, purificados e avaliados quanto a sua atividade antiviral, capacidade de inibição de protease e toxicidade em células Vero. Além disso, estudos de dicroísmo circular e permeabilização de vesículas também foram realizados. Todos os compostos mostraram tendência em estruturar em α -hélice, principalmente em TFE. Os estudos de permeabilização mostraram que os peptídeos AG-M5 e o dímero M5 possuem uma grande capacidade de interagir e permeabilizar a membrana, enquanto que o peptídeo M5 demonstrou uma baixa capacidade de permeabilização. Esses resultados estão de acordo com os dados de citotoxicidade, onde o peptídeo dímero M5 demonstrou ser bastante tóxico, sendo que o peptídeo M5 mostrou a menor citotoxicidade. Os compostos não mostraram atividade antiviral contra o SARS-CoV-2, no entanto, apresentaram atividade inibitória na enzima PL^{pro}. Este fato, pode ser atribuído a baixa capacidade de penetração celular destes compostos. Apesar da falta de atividade antiviral, os compostos avaliados neste projeto podem colaborar no desenvolvimento de novas moléculas visando a inibição da enzima PL^{pro}.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; PL^{pro}; peptídeos; inibidores; *Papain-like protease*;

Abstract

Pandemics as caused by SARS-Cov-2 affect all sectors of society, bringing damage that is difficult to overcome. The high and rapid spread of COVID-19 promoted the saturation of hospitals and health centers, a fact that contributed to the increase in deaths worldwide. In view of the current pandemic situation and the great global public health problem that the SARS-CoV-2 virus represents, in addition to the need to develop effective treatments for this disease and possible future epidemics/pandemics, the study aimed at the identification of new compounds with antiviral action. The present study has as its subject to synthesize and evaluate the potential of two peptides and a bioconjugate against SARS-CoV-2. In this work, these compounds were synthesized, purified and evaluated for their antiviral activity, protease inhibition capacity and toxicity in Vero cells. In addition, circular dichroism and vesicle permeabilization studies were also performed. All compounds showed a tendency to structure in α -helix, mainly in TFE. The permeabilization studies showed that the AG-M5 peptides and the M5 dimer have a great ability to interact and permeabilize the membrane, while the M5 peptide showed a low permeabilization capacity. These results are in agreement with the cytotoxicity data, where the M5 dimer peptide proved to be quite toxic, with the M5 peptide showing the lowest cytotoxicity. The compounds did not show antiviral activity against SARS-CoV-2, however they did show inhibitory activity on the PL^{pro} enzyme. This fact can be attributed to the low cellular penetration capacity of these compounds. Despite the lack of antiviral activity, the compounds evaluated in this project can collaborate in the development of new molecules aimed at inhibiting the PL^{pro} enzyme.

Key-words: SARS-CoV-2; PL^{pro}; inhibitors; peptides; Papain-like protease;

Lista de Figuras

Figura 1: Infecção Viral.....	14
Figura 2: Mini extrusor	26
Figura 3: Espectrofluorímetro	27
Figura 4: Espectro de dicroísmo circular.....	28
Figura 5: Espectropolarímetro de Dicroísmo	28
Figura 6: Perfil cromatográfico do peptídeo M5.	32
Figura 7: Perfil cromatográfico do AG-M5.....	33
Figura 8: Perfil cromatográfico do dímero M5.....	33
Figura 9: Espectro de massas do peptídeo puro M5.	34
Figura 10: Espectro de massas do peptídeo puro AG-M5.....	35
Figura 11: Espectro de massas do peptídeo puro dimérico do M5.....	35
Figura 12: Espectro de DC dos peptídeos M5, AG-M5 e dímero do M5.....	36
Figura 13: Ensaio de permeabilização de vesículas	38
Figura 14: Viabilidade celular das células Vero 24 h	39
Figura 15: Viabilidade celular das células Vero 48 h	40
Figura 16: Curva dose-resposta M5.....	41
Figura 17: Curva dose-resposta AG-M5.	41
Figura 18: Curva dose-resposta Dímero M5.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequência dos peptídeos sintetizados	22
Tabela 2: Tempo de retenção dos peptídeos	33
Tabela 3: Dados de Inibição das proteases M ^{pro} e PL ^{pro}	40
Tabela 4: Ensaio antiviral	42

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Coronavírus.....	11
1.2	SARS-CoV-2	12
1.3	As variantes do SARS-CoV-2.....	15
1.4	Diagnóstico.....	17
1.5	Vacinas e terapias.....	18
1.6	Uso de peptídeos como antivirais.....	20
2	OBJETIVO	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Síntese de Peptídeos	23
3.2	Purificação dos Peptídeos e caracterização.....	23
3.3	Cultura Celular.....	24
3.4	Viabilidade Celular.....	24
3.5	Permeabilização de Vesículas	25
3.6	Dicroísmo Circular	27
3.7	Inibição de Proteases.....	28
	PL ^{pro}	28
	M ^{pro}	29
3.8	Ensaio antiviral	30
4	Resultados.....	32
4.1	Síntese e caracterização dos peptídeos.....	32
4.2	Espectrometria de Massas	33
4.3	Dicroísmo Circular (DC)	36

4.4	Permeabilização de vesícula.....	36
4.5	Viabilidade Celular.....	39
4.6	Inibição de Proteases.....	40
4.7	Ensaio antiviral	42
5	Discussão	43
6	Conclusão	46
	Referências	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Coronavírus

São classificados como coronavírus os vírus pertencentes à família *Coronaviridae*. Estes vírus foram identificados pela primeira vez na década de 60, no hospital São Thomas em Londres, onde a pesquisadora June Almeida observou, por meio de um microscópio eletrônico, um novo tipo de vírus, sendo este, na época classificado como influenza, mas que apresentava o formato de uma coroa (ALMEIDA; TYRRELL, 1967).

Segundo classificação do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), os coronavírus estão inseridos na ordem *Nidovirales*, subfamília *Orthocoronaviridae* e família *Coronaviridae* (CHEN et al., 2020). Quatro gêneros fazem parte da família Coronavirinae: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, sendo os *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* os causadores de problemas respiratórios e associados a infecções intestinais (SU et al., 2016).

Os coronavírus passaram a ser destaque a partir do ano de 2002, quando um *Betacoronavirus* surgido na província de Guandong, China, foi responsável por uma pandemia que afetou 29 países com cerca de 8.000 casos registrados (CHERRY; KROGSTAD, 2004; PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004). Devido as complicações no sistema respiratório, o vírus recebeu o nome de SARS-CoV (sigla em inglês para Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus). Sua disseminação foi controlada após dois anos de seu surgimento (STADLER et al., 2003).

Em 2012, um novo surto de síndrome respiratória foi provocado por um coronavírus que ficou conhecido como MERS-CoV (sigla em inglês para Medium East Respiratory Syndrome – Coronavirus) (AMER et al., 2018). Essa síndrome afetou principalmente os países do Oriente Médio, pois camelos e dromedários eram os principais reservatórios para o vírus e seus principais disseminadores. Foram confirmados cerca de 2.494, com 858 mortes associadas à doença (CUI; LI; SHI, 2019).

1.2 SARS-CoV-2

No final do ano de 2019, surgiram vários casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China. Após os primeiros casos, um novo tipo de coronavírus foi identificado como causador desta enfermidade. Esse foi então nomeado de nCoV-19 (Novo Coronavírus 2019), sendo chamada de Covid-19 (Coronavírus 2019) a doença por ele causada. Entretanto, alguns estudos logo revelaram a similaridade entre o nCoV-19 e o SARS-CoV (AL-KURAISHY; AL-GAREEB, 2020; LI et al., 2020), levando o vírus a ser rebatizado como SARS-CoV-2 (sigla em inglês para Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus 2 ou em português Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus 2) (ZHOU et al., 2020).

Após o surgimento do vírus na China e sua rápida disseminação por Irã, Itália, posteriormente atingindo as Américas, Oceania e África, a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou estado de emergência mundial (pandemia) em março de 2020, devido à rápida disseminação mundial do vírus e progressiva letalidade. Até abril de 2022, mais de 6 milhões de óbitos foram registrados, totalizando quase 500 milhões de casos em todo mundo (COVID-19 MAP - JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2022).

Um terço dos primeiros pacientes a apresentarem tal enfermidade tinham em comum serem fregueses do mercado de frutos do mar da cidade de Wuhan (HUANG et al., 2020), local onde mamíferos silvestres eram vendidos. Entretanto, nenhum dos animais vendidos ali testou positivo para SARS-CoV-2 (LI et al., 2021). Dentre os animais ali comercializados, o pangolim, espécie ameaçada e protegida por leis internacionais (WANG; TURVEY; LEADER-WILLIAMS, 2020), teria sido o possível hospedeiro intermediário para o SARS-CoV-2. Isso se deve à similaridade genética encontrada entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus presentes em pangolins (P2V e P4L), sendo estes 96% similares a um tipo de coronavírus encontrado em morcegos (RaTG13), qualificando os morcegos como os possíveis hospedeiros primários (WROBEL et al., 2021; ZHANG et al., 2020b), contudo mais estudos são necessários para averiguar a real origem do SARS-CoV-2 (LI et al., 2021).

O SARS-CoV-2 é um clado dentro da família Coronaviridae e do gênero *Betacoronavirus* (MURUGAN et al., 2021). O genoma do SARS-CoV-2 é composto

por RNA de fita simples positiva, não segmentado e com um comprimento de cerca de 30 quilobases (Kb). O genoma viral codifica 29 proteínas, incluindo 25 proteínas não estruturais (PNE) e quatro proteínas estruturais (WU et al., 2022). As proteínas não estruturais desempenham papéis cruciais na replicação do RNA viral e na evasão do sistema imune do hospedeiro, na sobrevivência e transmissão entre as células hospedeiras. As proteínas estruturais são responsáveis pela montagem da partícula viral e compõem o vírion (WU et al., 2022). São proteínas fundamentais para a proteção do material genético viral e interação com os receptores da célula hospedeira.

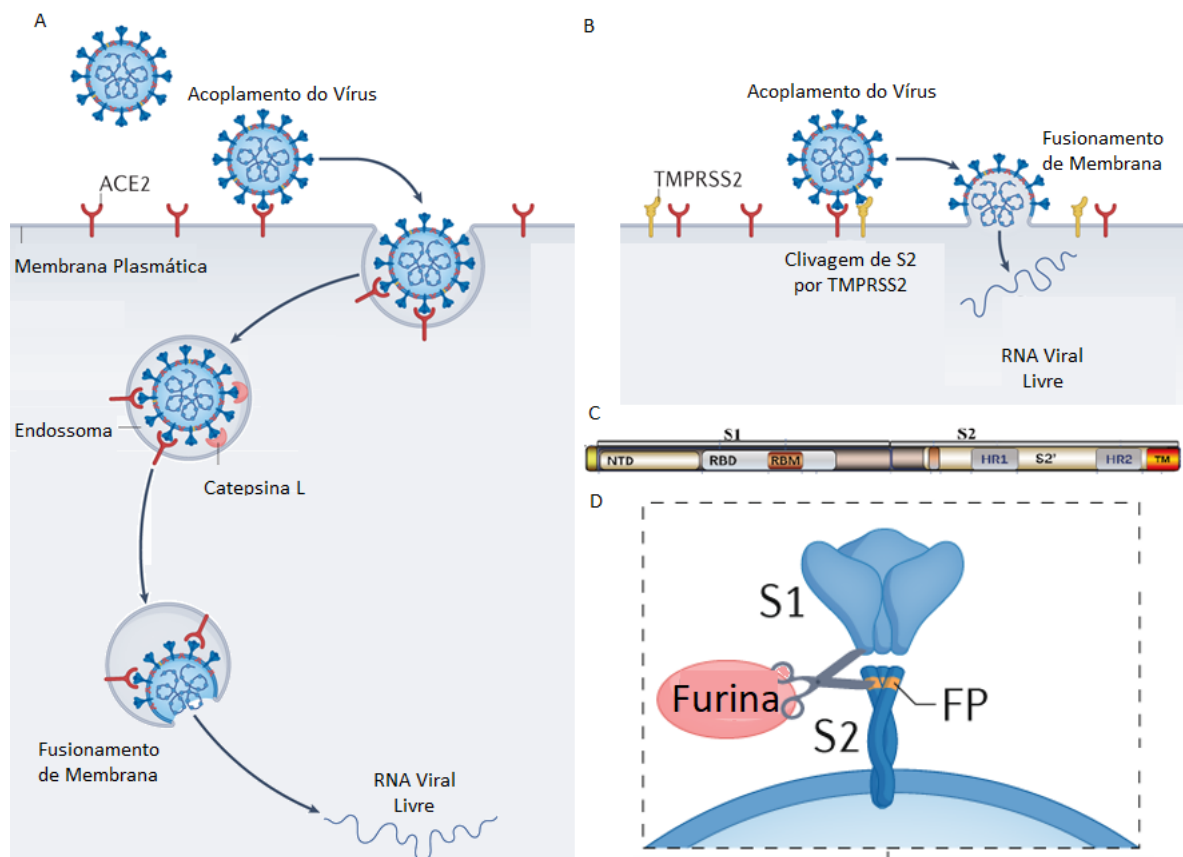
Os genes que codificam as janelas abertas de leitura, denominados de ORFs (sigla em inglês para Open Reading Frame), apresentam as ORF1a e ORF1b posicionadas nos dois terços proximais da extremidade 5' do genoma do SARS-CoV-2. A partir destas são originadas 16 proteínas não estruturais (FINKEL et al., 2020). O outro terço do genoma na extremidade 3' apresenta ORFs que irão codificar outras nove proteínas não estruturais, mas que aparecem mescladas as quatro ORFs que codificam proteínas estruturais do vírus (LOWERY; SARIOL; PERLMAN, 2021). As proteínas estruturais são a proteína Spike (S), proteína de membrana (M), proteína de envelope (E) e proteína do nucleocapsídeo (N), onde S, E e M estão presentes na superfície do envelope do vírion e a proteína N está envolvida na ligação e empacotamento do genoma de RNA viral (MALONE et al., 2021).

A proteína Spike (S), composta por duas subunidades S1 e S2, é a proteína responsável pela interação do vírus com os receptores celulares (WALLS et al., 2020). A subunidade S1 é a principal responsável pela ligação ao receptor, e a subunidade S2 medeia a fusão da membrana/endossomo com o envelope viral (WALLS et al., 2020).

A subunidade S1 pode ser subdividida em domínio N-terminal, dois subdomínios (SD1 e SD2) e domínio C-terminal, sendo este último, também chamado como domínio de ligação ao receptor ou RBD (sigla em inglês para Receptor-Binding Domain) (LAN et al., 2020; WU et al., 2022). O RBD é responsável por reconhecer o receptor de enzima conversora de angiotensina 2 ou ACE2 (sigla em inglês para angiotensin-converting enzyme 2) do hospedeiro (LAN et al., 2020). A expressão da glicoproteína ACE2 no exterior das células epiteliais alveolares do pulmão permite a infecção do trato respiratório por SARS-CoV-2 (ZHAO et al., 2020). A subunidade S2

consiste em componentes multiestruturais, incluindo um peptídeo de fusão hidrofóbico, dois padrões de repetição de sete aminoácidos chamados de repetições heptadas ou HR1 e HR2 (sigla em inglês para heptad repeats 1 e 2, respectivamente) e domínio transmembranar (WU et al., 2022). A subunidade S2 contém um sítio de clivagem S', que é clivado por proteases do hospedeiro como as serinoproteases transmembranares do tipo 2 (TMPRSS2), expondo o peptídeo a fusão entre o envelope do vírus e a membrana da célula hospedeira (HOFFMANN et al., 2020; ZHANG et al., 2020a). Diferentes proteases do hospedeiro, como tripsina, catepsina L, furina e TMPRSS-4, também podem ser necessárias, dependendo dos tipos de células, para a clivagem da proteína S (MURGOLO et al., 2021; MURUGAN et al., 2021) (Figura 1).

Figura 1: Infecção Viral. **A:** Entrada do vírus na célula hospedeira por meio do receptor ACE2. **B:** Entrada do vírus na célula mediado por ACE2 e TMPRSS2. **C:** Segmentos S1 e S2 da proteína Spike. **D:** Maturação do vírion a partir da clivagem da proteína S por uma furina. Adaptado de (JACKSON et al., 2021).



Após o fusonamento da partícula viral, o genoma do vírus é então liberado no citosol, iniciando a tradução de ORF1a e ORF1ab que irá originar as poliproteínas (pp) pp1a e pp1b. Por ação da Papaina-Like protease (PL^{pro}), e M^{pro} (também chamada de

3CL^{pro}) (YAN; GAO, 2021), essas duas pp serão clivadas, originando 16 proteínas não estruturais responsáveis pelo processo de transcrição e replicação viral (MURUGAN et al., 2021; RUT et al., 2020). Uma dessas proteínas é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) que forma o complexo RNA replicase-transcriptase (RTC). O complexo RTC desempenha um papel importante no processo de replicação, pois gera RNAs genômicos de sentido negativo complementares, que atuam como molde a síntese do RNA viral original (+RNA) e RNAs subgenômicos (sgRNAs) (GAO et al., 2020).

Os sgRNAs são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso onde origina as proteínas estruturais (S, M e E). Em contrapartida, o +RNA combina com proteínas N e forma um complexo de ribonucleoproteína (RNP) helicoidal no citoplasma da célula hospedeira (ROBSON et al., 2020). Posteriormente, os complexos de proteínas estruturais e RNP entram separadamente no compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi, um compartimento de brotamento. O RNP interage inicialmente com a proteína M para formar estruturas internas e gera a estrutura viral básica interagindo ainda mais com as proteínas S e E (OLWENYI et al., 2020). A proteína S é clivada proteoliticamente na região PRRAR (resíduos 681-685) pela furina em S1 e S2, para formar um heterodímero S1/S2, que será posteriormente montado em formato trimérico, tornando o vírus ativo e capaz de infectar outras células, processo denominado de maturação (CHAN; ZHAN, 2022; WU et al., 2022) (Figura 1). O brotamento viral amadurecido é liberado mais tarde do aparelho de Golgi. Depois de completar o ciclo de replicação viral, a progênie do SARS-CoV-2 montada é liberada das células hospedeiras por exocitose (OLWENYI et al., 2020; YE et al., 2020).

A ocorrência de mutações principalmente na proteína Spike tem provocado o surgimento de novas variantes (SANCHES et al., 2021). A recombinação genômica, também tem se feito muito presente no processo de replicação do material genético do SARS-CoV-2, gerando subvariantes do vírus original, como é o caso da Omicron. A recombinação é um processo fundamental na evolução, pois pode gerar novas variações genéticas sobre as quais a seleção natural pode atuar (JACKSON et al., 2021a).

1.3 As variantes do SARS-CoV-2

Devido a rápida disseminação do SARS-CoV-2, um grande sistema de monitoramento foi desenvolvido, acarretando em um alto número de amostras do vírus isoladas e sequenciadas geneticamente. Este fato permitiu identificar as mutações e recombinações sofridas pelo vírus no decorrer de sua disseminação pelos cinco continentes. Com isso, também foi possível identificar novas variantes que apresentavam maior capacidade de infecção e geravam quadros mais graves da doença (TAO et al., 2021).

Desde dezembro de 2020, a identificação de quatro linhagens do vírus vem causando grande preocupação, inaugurando uma nova etapa da pandemia (SINGH et al., 2021). As quatro variantes foram nominadas pela OMS com letras do alfabeto grego para facilitar a propagação da informação, promovendo um melhor combate às mesmas (TAO et al., 2021). O grande alarme em torno destas variantes é devido a sua maior infectividade ocasionada, principalmente por mudanças na proteína S (KRAUSE et al., 2021; SANCHES et al., 2021). Sendo assim, elas podem se disseminar mais rapidamente e podem gerar quadros mais graves da doença (HARVEY et al., 2021).

Cada variante teve sua origem em diferentes localidades, sendo elas a variante Alpha (B.1.1.7), originalmente identificada no Reino Unido, a variante Beta (B.1.351), originalmente identificada na África do Sul, a variante Gama (P.1), originalmente identificada no Brasil e a variante Delta (B.1.617), originalmente identificada na Índia (SINGH et al., 2021; TAO et al., 2021). Ainda é possível destacar que elas compartilham várias mutações entre si. Destaca-se também, um número crescente de outras variantes SARS-CoV-2 recentemente identificadas (HARVEY et al., 2021).

Recentemente, uma nova variante foi identificada e nominada Omicron (B.1.1.529). Essa variante surgiu na África do Sul, sendo detectada pela primeira vez em novembro de 2021 e classificada pela OMS como uma variante de preocupação e que rapidamente se espalhou por todo o mundo (CAO et al., 2021), levando países como a China, onde a pandemia estava controlada, a apresentarem forte alta no número de casos da doença (KHANDIA et al., 2022). A variante Omicron possui 60 mutações em comparação com SARS-CoV-2 original (WU et al., 2022), apresentando 37 substituições de aminoácidos na proteína S (CAO et al., 2021). Quinze destas mutações estão localizadas no RBD (LIU et al., 2021).

Devido a essas mutações, a Omicron tem apresentado uma taxa de transmissão mais elevada que as demais variantes do SARS-CoV-2, contudo, os sintomas da infecção têm sido mais brandos nas pessoas infectadas por essa variante (HU et al., 2022; WU et al., 2022). Isso se deve ao fato de várias dessas mutações terem sido identificadas em variantes descobertas anteriormente, o que explicaria a eficácia das vacinas (ANDREATA-SANTOS; JANINI; DURÃES-CARVALHO, 2022; YU et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

A principal forma de transmissão do SARS-CoV-2 e suas variantes é o contato direto com gotículas aerossóis, provenientes de indivíduos contaminados e que são formadas a partir da fala, tosse ou espirro (STADNYTSKYI et al., 2020). Estima-se que o SARS-CoV-2 possa permanecer por até 5 dias em metais, 9 dias em plásticos, 4 dias em madeira e até 5 dias em papel e vidro (KAMPF et al., 2020; VAN DOREMALEN et al., 2020).

1.4 Diagnóstico

A infecção por SARS-CoV-2 é observada principalmente no trato respiratório, sendo o pulmão o principal alvo viral. Entretanto, o vírus também pode afetar os sistemas cardiovascular, cerebral, renal, hepático e imunológico, estando ligada à expressão celular específica dos receptores da ACE2 (MACHHI et al., 2020; WANG et al., 2020). Os sintomas mais comuns da Covid-19 são tosse, febre e dispneia. Devido à grande capacidade de se replicar e a alta transmissibilidade, a detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é um fator primordial para o controle da sua disseminação. O diagnóstico da infecção viral leva em consideração, não apenas os sintomas, mas também, testes que visam detectar a presença de material genético viral ou antígenos virais presentes no hospedeiro (KEVADIYA et al., 2021).

A obtenção de amostras para a realização dos testes pode ser feita de diferentes maneiras, todavia, a carga viral difere entre amostras respiratórias, de saliva, fezes e soro, apresentando ampla variação na carga viral (KEVADIYA et al., 2021). Amostras provenientes do trato respiratório têm se mostrado as mais eficazes para analisar os quadros de infecção, já que são provenientes da região mais afetada pelo vírus. Para a coleta dessas amostras pode ser introduzido um swab (bastão estéril, longo e flexível contendo algodão em uma de suas extremidades) na região

nasofaringea. Após a coleta da amostra, o material deve ser submetido a um teste de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR sigla em inglês para *reverse transcription polymerase chain reaction*) (LIU et al., 2020; WANG et al., 2020). Até o momento, os testes de RT-PCR têm se mostrado os mais eficientes na detecção do SARS-CoV-2. (WINICHAKOON et al., 2020).

A utilização de testes sorológicos para a detecção do SARS-CoV-2 pode ser vista como um complemento para os exames com RT-PCR, visando aprimorar o diagnóstico. Essa metodologia é focada na detecção da formação de anticorpos contra o vírus no corpo da pessoa infectada, podendo ser encontrado em até 50% dos infectados após o sétimo dia dos primeiros sintomas e em 100% das pessoas contaminadas em até 14 dias após os primeiros sintomas (KEVADIYA et al., 2021).

Os anticorpos são detectados por imunoensaio enzimático usando uma detecção qualitativa para três tipos de imunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM) que tem sua atividade aumentada frente a infecção pelo vírus, especialmente como uma resposta imune a proteína S, responsável pela interação viral com receptores ACE2 (PADOAN et al., 2020; PAN et al., 2020).

Outros testes que usando saliva e fezes, também podem ser utilizados na detecção do SARS-CoV-2, entretanto não são tão eficientes quanto os anteriores, no entanto, são interessantes para rápida detecção do vírus ou para avaliar a presença viral presentes em sistemas de saneamento básico (KEVADIYA et al., 2021; WYLLIE et al., 2020; XIAO et al., 2020).

1.5 Vacinas e terapias

As vacinas contra SARS-CoV-2 têm se mostrado primordiais no controle da pandemia. Até o presente momento, quatro vacinas foram aprovadas e estão ou foram aplicadas nos Brasil, sendo elas CoronaVac (Sinovac), AZD1222 (Oxford-AstraZeneca), JNJ-78436735 (Johnson & Johnson) e BNT162b2 (Pfizer BioNTech).

A vacina CoronaVac utiliza a tecnologia de vírus inativado e utiliza hidróxido de alumínio como adjuvante. Ao ser injetado no organismo, esse vírus não é capaz de causar doença, mas induz uma resposta imunológica a partir da inflamação gerada pelo hidróxido de alumínio (TANRIOVER et al., 2021). Sua eficiência é 65,9% para a

prevenção da Covid-19, 87,5% para a prevenção de hospitalização e 90,3% para prevenção de internação na UTI (JARA et al., 2021).

As vacinas de Oxford-AstraZeneca e Johnson & Johnson são baseadas na tecnologia do DNA recombinante. Este tipo de vacina se utiliza de um adenovírus modificado geneticamente para carregar o gene da proteína S para o interior das células do indivíduo a ser imunizado, possibilitando a tradução e síntese da proteína em larga escala, afim de provocar uma resposta imune sobre a mesma (CREECH; WALKER; SAMUELS, 2021). A vacina de Oxford-AstraZeneca apresenta uma eficácia de 70,4% na prevenção da doença, evitando até o momento 100% dos casos de óbito (KNOLL; WONODI, 2021). Já a vacina da Johnson & Johnson possui eficácia de 66,9% na prevenção da doença (FRANCIS et al., 2021).

Por fim, a vacina da Pfizer BioNTech utiliza a tecnologia de entrega de RNA mensageiro (mRNA). Nesta técnica, nanopartículas lipídicas são usadas para proteger e internalizar o mRNA que codifica a proteína S. As células usam o mRNA para produzir a proteína alvo (proteína S), que induz uma resposta imune coordenada (CREECH; WALKER; SAMUELS, 2021). Esta vacina apresentou uma eficácia de até 90% na prevenção da infecção por SARS-CoV-2 (CREECH; WALKER; SAMUELS, 2021).

Além destas vacinas aplicadas nos brasileiros, ainda é possível encontrar outras vacinas ao redor do mundo como a vacina Sputnik V que usa a tecnologia de vetor viral não replicante (CHIRICO; KHAN, 2022), a vacina Moderna que utiliza mRNA (CREECH; WALKER; SAMUELS, 2021), as vacinas Sinopharm, a CoVaxin (Bharat Biotech) e BBIBP-CorV que utilizam o vírus inativado (SIMÕES; RODRÍGUEZ-LÁZARO, 2022). Existem ainda vacinas que usam DNA plasmidial como plataforma, sendo o caso da INO-4800, enquanto a vacina da Novavax utiliza a proteína S (SIMÕES; RODRÍGUEZ-LÁZARO, 2022).

Após o início das campanhas de vacinação ao redor do mundo foi possível observar um grande declínio no número de óbitos causados pela infecção do SARS-CoV-2. No entanto, mesmo após a vacinação, foram relatados casos de infecção viral (ENAYATHULLAH et al., 2022). O principal fator para a ocorrência deste fato está atrelado ao surgimento das novas variantes com capacidade de fugir da imunidade previamente gerada pela vacinação (LIU et al., 2021). A atividade neutralizante do

plasma de indivíduos que receberam a vacina Pfizer BioNTech é reduzida contra a variante Omicron (CAMERONI et al., 2021).

Portanto, se faz necessário a busca por novos agentes antivirais capazes de tratar a infecção por SARS-CoV-2 e suas variantes. Várias tentativas foram feitas no sentido de redirecionar medicamentos para tratar a Covid-19. No entanto, o resultado foi muito limitado no tratamento da infecção por SARS-CoV-2 (ENAYATHULLAH et al., 2022). Dentre eles, apenas o remdesivir que age sobre a RdRp se mostrou promissor (KOKIC et al., 2021).

Dois novos medicamentos da Pfizer (Paxlovid) e da Merck (Molnupiravir) têm se mostrado promissores contra o SARS-CoV-2. O Molnupiravir, interfere sobre a replicação viral e atua sobre a RdRp (KABINGER et al., 2021). Já o Paxlovid age sobre a M^{pro}, inibindo sua atividade e consequentemente bloqueando a clivagem da pp1a de maneira a interromper a replicação viral (REINA; IGLESIAS, 2022). Ele apresenta uma eficácia de até 89% em casos graves da doença (MAHASE, 2021).

1.6 Uso de peptídeos como antivirais

O uso de peptídeos tem sido cada vez mais aprimorado. Dentre as diversas vantagens no uso destes compostos no combate as enfermidades é possível destacar sua biodegradabilidade e uma ação rápida e específica, como é o caso de insulina e losartana, que são considerados o melhor tratamento para suas respectivas doenças (HADDADZADEGAN; DORKOOSH; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2022).

Entretanto, a biodegradabilidade pode ser considerada também uma desvantagem, pois dependendo do tipo de aplicação, o composto será rapidamente degradado, especialmente se for administrado por via oral. Sendo assim, novas técnicas de “drug delivery” vêm sendo desenvolvidas a fim de melhorar a utilização desses materiais (BRAYDEN et al., 2020). As SEDDS (sigla em inglês para *self emulsifying drug delivery systems* ou em português sistemas de entrega de drogas auto-emulsionantes) é um exemplo de técnica que poderia ser utilizada para proteger o peptídeo da ação de peptidases ao transpassar o trato gastrointestinal (HADDADZADEGAN; DORKOOSH; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2022). A bioconjugação com outras moléculas, pode ser também uma alternativa não só para

melhorar o desempenho do peptídeo, mas também para aumentar a sua resistência a degradação.

Sendo assim, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) vêm sendo cada vez mais empregados no combate a infecções por microrganismos (MAITI, 2020). Alguns AMPs têm demonstrado grande potencial frente às infecções virais, como é o caso de infecções por Zika vírus e Dengue (AHMED et al., 2019). Alguns destes peptídeos que têm demonstrado ação antiviral são provenientes da catelicidina humana LL-37 (ALAGARASU et al., 2017; HE et al., 2018). Além disso, análogos de partes da LL-37 como o KR-12-a5 (KRIVKLILKWLR-NH₂), poderiam ser utilizados para amenizar os sintomas causados por SARS-CoV-2, já que este peptídeo apresenta como característica um efeito anti-inflamatório (CAIAFFA et al., 2017; KIM; RAJASEKARAN; SHIN, 2017).

Recentemente, AMPs foram avaliados no combate a infecções virais. Um desses peptídeos é o bioconjugado Ácido Gálico-Hecate (AG-Hecate), que se mostrou eficiente no controle da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) (BATISTA et al., 2018). Além disso, um outro estudo demonstrou ainda que o AG-Hecate e fragmentos provenientes de sua degradação no sangue humano como o metabólito-5 (M5) tem demonstrado alta eficiência no controle da infecção pelo Zika vírus (SANCHES, 2020), no entanto, não foram testados contra o SARS-CoV-2.

Os peptídeos antivirais podem atuar em diferentes momentos da infecção, podendo destruir a partícula viral, inativá-la, competir pelo sítio de ligação na célula hospedeira, interferir sobre a replicação viral ou ainda bloquear a saída de novas partículas virais do interior da célula (BATISTA et al., 2018). Recentemente, o peptídeo (pBthTX-I)₂K ((KKYRYHLKPF)₂K) demonstrou ser um potente agente contra o SARS-CoV-2. Sua ação se dá principalmente sobre a PL^{pro}. Uma vez inibida, a PL^{pro} deixa de atuar sobre as pps provenientes das ORFs 1a e 1ab, inibindo o processo de replicação do material genético do vírus, reduzindo significativamente a carga viral (FREIRE et al., 2021).

Desta forma, os peptídeos são potenciais agentes no combate a infecção por SARS-CoV-2.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo sintetizar, purificar e avaliar a toxicidade e o potencial antiviral de dois peptídeos e de um bioconjugado peptídico contra o SARS-CoV-2, buscando compostos que sejam capazes de diminuir a carga viral.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar os compostos: Metabólito 5 (M5), AG-M5 e Dímero M5 (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos peptídeos sintetizados neste projeto.

Nome	Sequência	Massa Molar
Metabólito 5 (M5)	FALALKALKKALKKL-COOH	1656,2 g/mol
AG-M5	Ácido Gálico-FALALKALKKALKKL-COOH	1808,3 g/mol
Dímero M5	(FALALKALKKALKKL) ₂ K-CONH ₂	3422,5 g/mol

- Elucidar a estrutura secundária dos peptídeos sintetizados.
- Analisar a capacidade de permeabilização dos compostos frente às vesículas lipídicas.
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos sintéticos em linhagem celular Vero (ATCC CCL-81, linhagem de rim de macaco).
- Avaliar a capacidade de inibição dos compostos frente às proteases PL^{pro} e M^{pro}.
- Avaliar a capacidade de ação destas moléculas contra o SARS-CoV-2 *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese de Peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados manualmente via síntese peptídica em fase sólida (SPPS), utilizando o protocolo padrão Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila), onde os grupamentos Fmoc (base lábil) são utilizados como protetores do grupo α -amino. Para remover o grupo protetor Fmoc, a peptidil-resina foi exposta a uma solução básica de 20% 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) durante os tempos de 1 e 20 min, liberando o grupo amino na forma desprotonada para a fase seguinte de acoplamento. A resina utilizada para a síntese dos peptídeos com carboxila livre na região C-terminal foi a Fmoc-Leu-Wang e para o peptídeo amida foi utilizada resina Rink.

No caso dos monômeros, os aminoácidos foram acoplados com excesso de 2 vezes e para a síntese do dímero foi utilizado 4 vezes de excesso em relação a escala (número de mol) inicial. Em todas as sínteses, os aminoácidos foram adicionados a uma solução de DMF contendo N,N'-diisopropilcarbodiimida e hidroxibenzotriazolil para promover o acoplamento. Após 2 h de reação, a eficácia do acoplamento foi avaliada usando o teste de ninidrina (KAISER et al., 1970).

Após todas as etapas de síntese, os peptídeos foram clivados utilizando um coquetel de clivagem composto por 95% de ácido trifluoracético (TFA), 2,5% de H₂O e 2,5% triisopropilsilano (TIS), sendo utilizada uma proporção de 10 mL para cada grama de peptidil-resina. Após 2 h, o material foi precipitado em éter gelado e centrifugado por 4 min. O ciclo de precipitação em éter foi repetido 3 vezes. Após as repetições, os peptídeos foram extraídos utilizando solução composta por 80% solvente B e 20% solvente A, ambos descritos na metodologia do CLAE. Por fim, os peptídeos foram liofilizados em liofilizador (K105, Liobras Ind, São Carlos, SP, Brasil).

3.2 Purificação dos Peptídeos e caracterização

Os compostos foram avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (em inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC) analítico (LC-10, Shimadzu) e purificados em CLAE semi-preparativo (LC-20, Shimadzu). O aparelho

de CLAE analítico continha uma coluna C18 de fase reversa (5 μm , 15 cm x 0,46 cm) (AAPTEC). Os compostos foram analisados em um fluxo de 1 mL/min com gradiente de 5 a 95% de solvente B (solução de acetonitrila contendo 0,036% de TFA) em 30 min. A solvente “A” continha 0,045% de TFA em água ultrapura. A partir da avaliação do material foi possível determinar qual a concentração de solvente B era necessária para saída do material da coluna, sendo esta informação utilizada para determinar o gradiente da purificação do material em escala semi-preparativa. O sistema de CLAE semi-preparativo possuía uma coluna C18 de fase reversa (10 μm , 25 cm x 1 cm Phenomenex), e o fluxo utilizado foi de 5 mL/min. Para a purificação do M5 foi utilizado o programa onde a concentração de solvente B variou de 25 à 55 em 30 min, já na purificação do AG-M5 foi utilizado o programa onde a concentração de solvente B variou de 35 à 65 em 30 min e na purificação do Dímero M5 foi utilizado o programa onde a concentração de solvente B variou de 30 à 60 em 30 min. Em ambos os equipamentos foi utilizado o comprimento de onda de 220 nm para detecção do material. Apenas moléculas com pureza acima ou igual a 95% foram utilizadas nos experimentos a seguir.

Após a purificação, a massa molar dos peptídeos foi determinada por meio da razão massa/carga (m/z) obtida pela espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo positivo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

3.3 Cultura Celular

Para este trabalho foram cultivadas culturas de células de uma linhagem suscetível à replicação viral, as células de rim de macaco verde Vero (ATCC CCL-81). Para a proliferação celular foi utilizado o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 1x de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina em garrafas de cultura plásticas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 .

3.4 Viabilidade Celular

Para os ensaios de viabilidade celular, 5×10^3 células Vero/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h antes de serem expostas aos peptídeos. Após o período de incubação foram removidos os sobrenadantes, sendo adicionados em seu lugar 100 μ L de meio de cultura DMEM suplementado com peptídeos em concentrações de 100 a 1,56 μ mol/L. Após os períodos de 24 e 48 h de incubação, os sobrenadantes foram novamente removidos para a adição de 100 μ L de uma solução a 1 mg/mL de MTT em meio sem soro em cada poço, e a placa foi incubada durante 30 min a 37°C. A viabilidade celular foi definida pela formação ou não de cristais de formazan que foram posteriormente solubilizados com 100 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO). A absorbância das soluções contidas em cada poço foi medida a 570 nm usando um leitor de placas. Os experimentos foram realizados em triplicata em três eventos distintos.

As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA com teste Tukey(T) usando o Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

3.5 Permeabilização de Vesículas

Classicamente é conhecido que, em solução, os fosfolipídeos se organizam em bicamadas formando estruturas vesiculares (NELSON, 2018). Essas estruturas vesiculares são um bom modelo para estudar a interação peptídeo/membrana, já que sua bicamada lipídica em muito se assemelha as membranas celulares. No entanto, este modelo não apresenta proteínas e carboidratos em sua composição, sendo mais simples que as membranas celulares.

Devido a possibilidade de a composição do envelope viral do SARS-CoV-2 ser formada em parte por lipídeos da membrana do retículo endoplasmático, a composição lipídica escolhida para avaliar a interação com os peptídeos foi a contendo 95% de 1-Palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e 5% de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE). Esta composição corresponde aos principais fosfolipídios encontrados na membrana do retículo endoplasmático (VAN MEER; DE KROON, 2011). Para estes estudos, soluções-estoque concentradas de lipídeos (15 mM) foram preparadas. Todos os lipídeos foram adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids.

Após serem pesados, os lipídeos foram suspensos em solução de clorofórmio e metanol (4:1; v:v), e evaporados com gás nitrogênio (N₂) até formar um filme fino aderido na parede do tubo de vidro. Este filme foi mantido sob vácuo durante 12 h para eliminação dos solventes. Posteriormente, o filme foi suspenso em 1 mL de solução de carboxifluoresceína (CF) (Sigma Aldrich) 80 µM. Após a adição de CF, o filme foi submetido repetidamente a 12 ciclos de 5 min em banho ultrassom a 60°C e vórtex. Esse processo foi realizado para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas multilamelares obtidas fosse reduzido. Para se obter as vesículas unilamelares, a solução obtida foi submetida a 40 ciclos de filtração em um mini extrusor, contendo filtro de polycarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Avanti Polar Lipids - figura 1).

Figura 2: Mini extrusor (Avanti Polar Lipids) utilizado para a confecção das vesículas unilamelares.



A carboxifluoresceína (CF) não incorporada às vesículas foi removida por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-25 (Sigma Aldrich) estabilizada com tampão PBS pH 7,4.

A interação peptídeo/membrana foi analisada utilizando o Espectrofluorímetro Modelo RF-1501 da Shimadzu (figura 2). Após 120 s da adição da solução de vesículas (utilizada para verificar a estabilidade), os peptídeos foram adicionados e medições foram realizadas até 480 s, tempo no qual foi adicionado o detergente Triton x-100 para a obtenção do valor de 100% de permeabilização. Este detergente provoca a dissolução total das vesículas. A liberação da CF foi observada pelo aumento da intensidade de fluorescência usando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e emissão de 520 nm. As análises foram realizadas em PBS pH 7,4.

Figura 3: Espectrofluorímetro Modelo RF-1501 da Shimadzu. Equipamento do laboratório de Química Analítica e Ambiental do instituto de química da UNESP Araraquara.

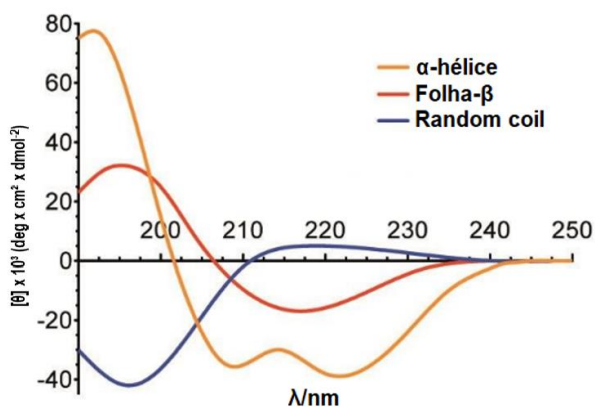


3.6 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (DC) permite visualizar a estrutura secundária de moléculas opticamente ativas, como os peptídeos. Essas estruturas são indicadas por bandas elípticas específicas no intervalo de 260 a 190 nm. Ao interagir com uma luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, a diferença de absorção da molécula indica a estrutura existente.

Em peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são a ligação amida, e as cadeias laterais aromáticas do triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto. A figura 3 apresenta os espectros característicos de CD das estruturas secundárias mais encontradas nos peptídeos.

Figura 4: Espectro de dicroísmo circular. Em alaranjado perfil de estrutura secundária organizada em α -hélice. Em vermelho perfil de estrutura secundária organizada em folha- β . Em azul perfil de estrutura secundária aleatória (*Random Coil*). Adaptado de (GREENFIELD, 2007).



Os estudos de CD foram realizados no Instituto de Química – UNESP Araraquara. Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J-815 (figura 4), no qual foi utilizado uma cubeta de 300 μL com caminho óptico de 10 mm. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos diferentes peptídeos em PBS, para posterior diluição à 10 μM em solução aquosa, 60% de trifluoretanol (TFE) e 10 mM de lisofosfatidilcolina (LPC).

Os espectros foram obtidos em millidegrees e convertidos a elipticidade molar $[\theta]$ ($\text{deg} \text{ cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

Figura 5: Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular J-815 da JASCO. Equipamento do laboratório multiusuário do instituto de química da UNESP Araraquara.



3.7 Inibição de Proteases

O clone da enzima PL^{pro} e os resultados abaixo foram obtidos pelo grupo dos professores Glaucius Oliva e Rafael V. C. Guido do CEPID/CIBFAR (FREIRE et al., 2021).

Os ensaios enzimáticos de inibição foram realizados usando como concentração final por reação, 20 µM do substrato FRET-peptídeo Abz-TLKGG APIKEDDPS-EDDnp, o ensaio foi padronizado utilizando 70 nM da enzima PL^{pro} e os potenciais inibidores foram testados inicialmente a uma concentração de 10 µM. A reação foi carregada em tampão de reação (50 mM HEPES pH 7,5; 5 mM DTT; 0,01% Triton) e incubada com cada potencial inibidor a 37°C por 30 min, após a incubação o substrato foi adicionado e a atividade enzimática medida pela fluorescência em leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM (λ excitação / λ emissão de 320/420 nm) a cada 30 s durante 30 min.

Para as medidas de IC₅₀, diferentes amostras de reação foram pré-incubadas com diferentes concentrações dos inibidores pré-selecionados (Seriada 1/2 partindo de 40 µM até 11 nM) a 37° C por 30 min. A diluição do composto foi feita em DMSO e reações controle contendo o mesmo volume de DMSO sem a presença do inibidor foram realizadas na presença e ausência da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas no leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as velocidades iniciais foram derivadas da inclinação da fase linear de cada reação. O gráfico de inibição e o valor de IC₅₀ foi obtido usando Origin Pro 9.5.1 Software (OriginLab).

M^{pro}

O clone da enzima M^{pro} e os resultados abaixo foram feitos pelo grupo dos professores Glaucius Oliva e Rafael V. C. Guido do CEPID/CIBFAR.

Os ensaios enzimáticos de inibição foram realizados usando como concentração final por reação, 20 µM do substrato FRET DABCYL-KTSAVLQSGFRKM-E(EDANS)-NH₂, 0,015 µM da proteína M^{pro} e os potenciais inibidores foram testados inicialmente a uma concentração de 10 µM. A reação foi carregada em tampão de reação (20 mM Tris pH 7,3; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,01% Triton) e incubada com cada potencial inibidor a 37°C por 10 min, após a incubação o substrato foi adicionado e a atividade enzimática medida pela fluorescência em leitor

de microplacas SpectraMax Gemini EM (λ excitação / λ emissão de 360/460 nm) a cada 30 s durante 30 min.

3.8 Ensaio antiviral

Todos os procedimentos envolvendo o vírus SARS-CoV-2 foram realizados no laboratório de biossegurança nível 3 do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela pesquisadora Cecília Gomes do grupo do Prof. Lúcio de Freitas (ICB/USP). O vírus SARS-CoV-2 utilizado neste estudo (HIAE-02:SARS-CoV-2 / SP02 / humano / 2020 / BRA, GenBank No. de Acesso MT126808.1) foi isolado de uma amostra nasofaríngea de um paciente confirmado de covid-19 no Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo (SP) Brasil (ARAUJO et al., 2020).

Resumidamente, para a triagem fenotípica dos compostos, 2000 células Vero CCL-81 (ATCC) foram semeadas por poço em placas de 384 poços em meio DMEM de alta glicose (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Thermo Scientific) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina (Thermo Scientific). As células foram incubadas por 24 h a 37°C com 5% de CO₂. Os compostos foram diluídos para 2 mg/mL em DMSO.

Antes de realizar o tratamento das células, os compostos foram diluídos por um fator de diluição final de 200x. Os compostos foram testados na concentração única de 10 µg/mL. Como controle de inibição viral foi utilizada Cloroquina (Sigma-Aldrich). Após adsorção viral, foi adicionado meio DMEM com alto teor de glicose suplementado com 6% de soro fetal bovino. Após 33 h de incubação a 37°C, 5% de CO₂ a placa foi fixada em paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 e submetida à detecção por imunofluorescência indireta de infecção celular viral (FERREIRA SALES-MEDINA et al., 2020; FREIRE et al., 2021). Foram realizados três ensaios independentes.

Para a detecção da infecção viral por SARS-CoV-2 foi utilizado como anticorpo primário o soro hiperimune de um paciente brasileiro convalescente COVID-19 diluído 1:1000 em 5% BSA em PBS (v/v). Após incubação, os poços foram lavados e uma solução contendo IgG anti-humano de cabra conjugado com Alexa488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 5 µg/mL de DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:1000 em 5% BSA (v/v) foi adicionado a cada poço.

A aquisição das imagens foi realizada no Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) usando uma objetiva de ampliação de 20X e a análise das imagens foi realizada no software Harmony (Perkin Elmer), versão 3.5.2. A análise consistiu na identificação e contagem de células Vero CCL-81 com base na segmentação nuclear e infecção viral com base na coloração citoplasmática detectada pelo ensaio de imunofluorescência. A taxa de infecção (IR) foi calculada como a razão entre o número de células infectadas e o número de células totais contadas em cada poço. A taxa de sobrevivência celular foi calculada como o número de células contadas em cada poço dividido pelo número médio de células nos poços de controle positivo (células infectadas tratadas com DMSO), multiplicado por 100. A atividade antiviral foi determinada pela normalização do IR ao controle negativo (células infectadas e não infectadas tratadas com DMSO), conforme descrito. As curvas de resposta à concentração foram traçadas usando a atividade normalizada e a sobrevivência celular de cada concentração. Esses dois parâmetros foram usados para calcular a concentração de EC_{50} e CC_{50} , concentrações de compostos que reduzem a taxa de infecção e a sobrevivência celular em 50%, respectivamente, em comparação com controles infectados não tratados de cada composto usando GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, EUA).

4 Resultados

4.1 Síntese e caracterização dos peptídeos

Os compostos M5 e AG-M5 foram sintetizados a partir de uma resina Wang para obtenção de grupamento carboxila na extremidade C-terminal (o grau de substituição da resina foi de 0,57 mmol/g). Já o peptídeo dímero do M5 foi sintetizado a partir uma resina Rink, apresentando um grupo amida na extremidade C-Terminal (o grau de substituição da resina foi de 0,52 mmol/g). Foi utilizado para todos os peptídeos 2 vezes de excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes de acoplamento.

O acoplamento do AG foi realizado após a síntese do peptídeo M5 utilizando DIC/HOBt com 2 vezes de excesso em 5 procedimentos diferentes. Destacamos que, foi possível observar a presença do peptídeo M5 no material bruto AG-M5, indicando dificuldade de acoplamento do AG, mesmo após 5 tentativas de acoplamento.

Após as etapas de clivagem, extração e liofilização dos peptídeos, os peptídeos brutos foram purificados em CLAE semipreparativa. Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos obtidos e após a purificação estão apresentados nas figuras 5 a 7. Todos os peptídeos puros apresentaram pureza acima de 95%. O tempo de retenção de cada composto pode ser observado na tabela 2.

Figura 6: Perfil cromatográfico do peptídeo M5. A) peptídeo bruto. B) peptídeo purificado. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1 mL e detecção em 220 nm.

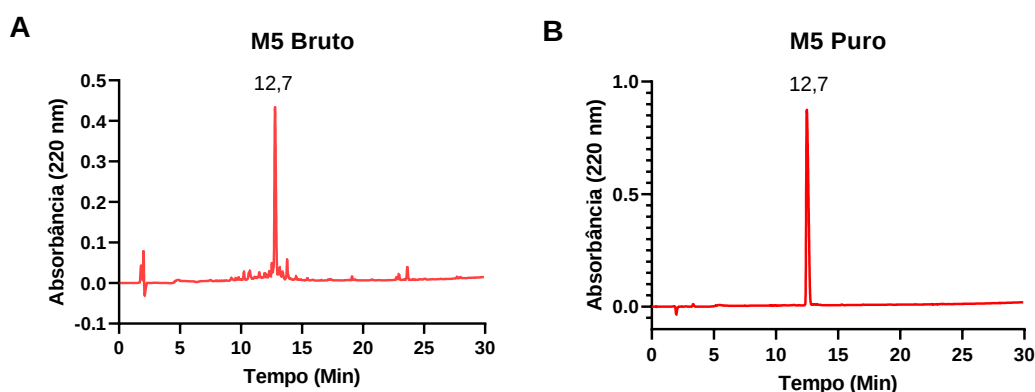


Figura 7: Perfil cromatográfico do AG-M5. A) peptídeo bruto. B) peptídeo purificado. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1 mL e detecção em 220 nm.

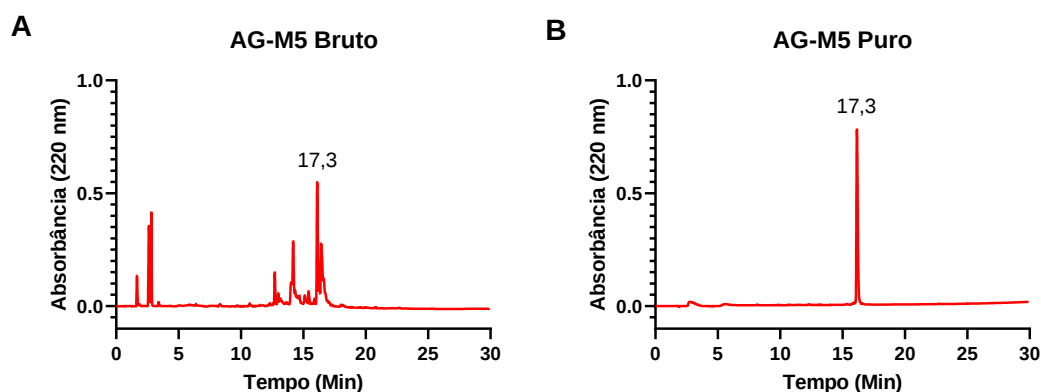


Figura 8: Perfil cromatográfico do dímero M5. A) peptídeo bruto. B) peptídeo purificado. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1 mL e detecção em 220 nm.

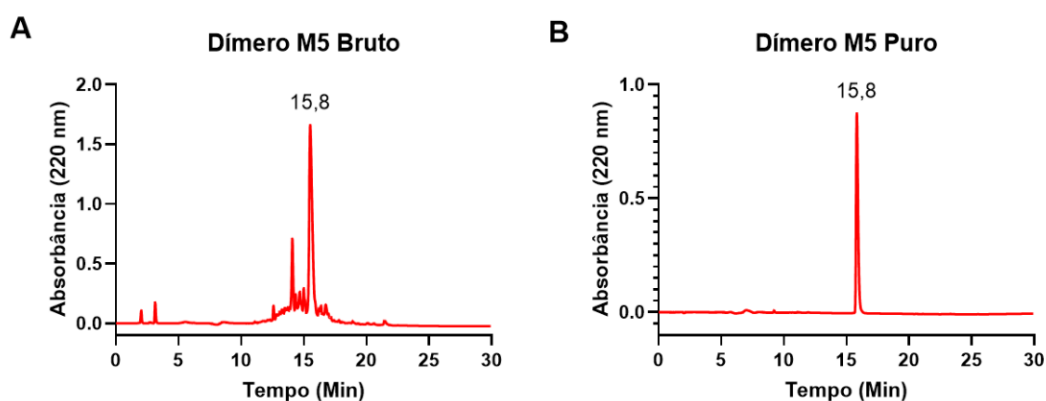


Tabela 2: Tempo de retenção dos peptídeos na cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de C18.

Peptídeos	Tempo de Retenção (min)
M5	12,7
AG-M5	17,3
Dímero M5	15,8

4.2 Espectrometria de Massas

Os peptídeos puros foram caracterizados por meio da espectrometria de massas. O peptídeo M5 (MM = 1656,15 g/mol) apresentou picos de 828,44 (carga +2), 552,82 (carga +3) e 414,86 (carga +4), figura 8. O peptídeo AG-M5 (MM = 1808,25 g/mol) mostrou picos de 905,21 (carga +2) e 603,92 (carga +3). O peptídeo dimérico M5 (MM = 3422,5 g/mol) apresentou picos de 1710,36 (carga +2), 1140,83 (carga +3) e 571,24 (carga +6), figura 10. Estes dados indicam a obtenção dos materiais desejados em todas as sínteses realizadas.

Figura 9: Espectro de massas do peptídeo puro M5.

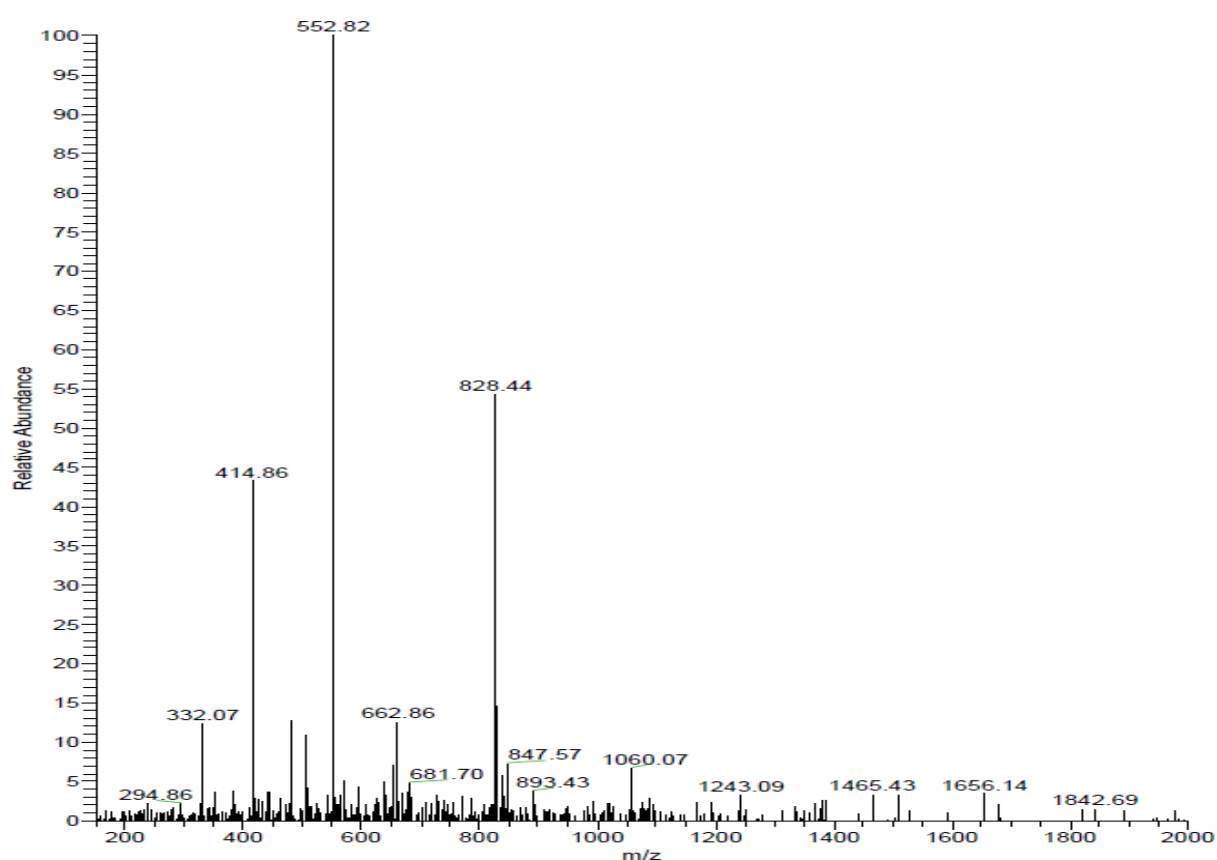


Figura 10: Espectro de massas do peptídeo puro AG-M5.

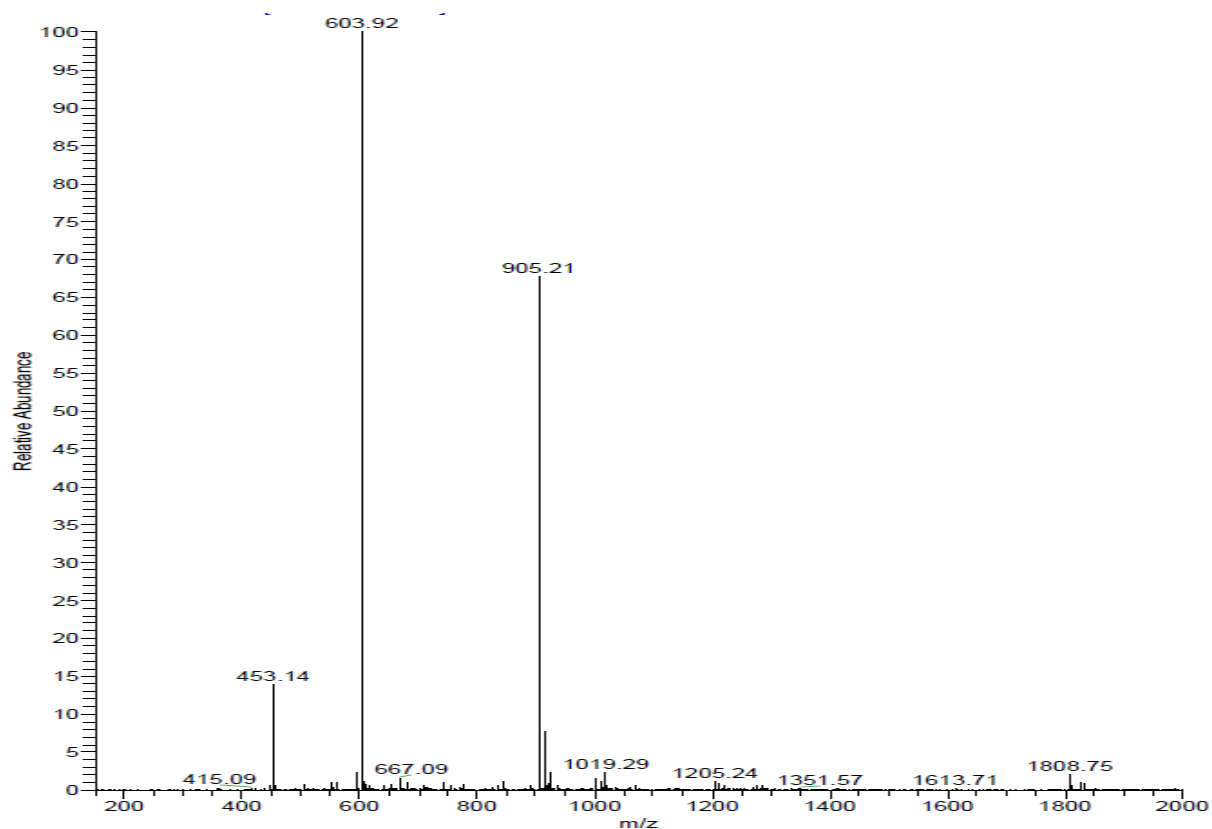
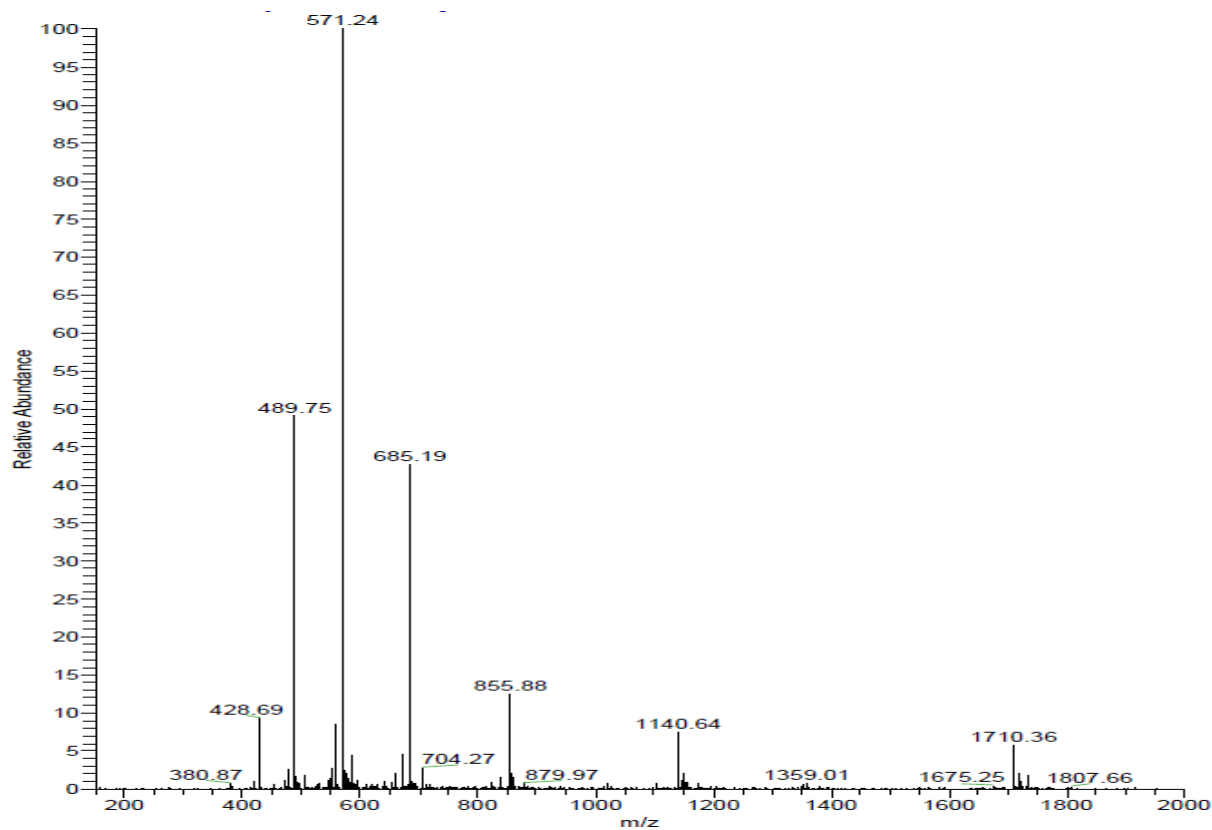


Figura 11: Espectro de massas do peptídeo puro dimérico do M5.

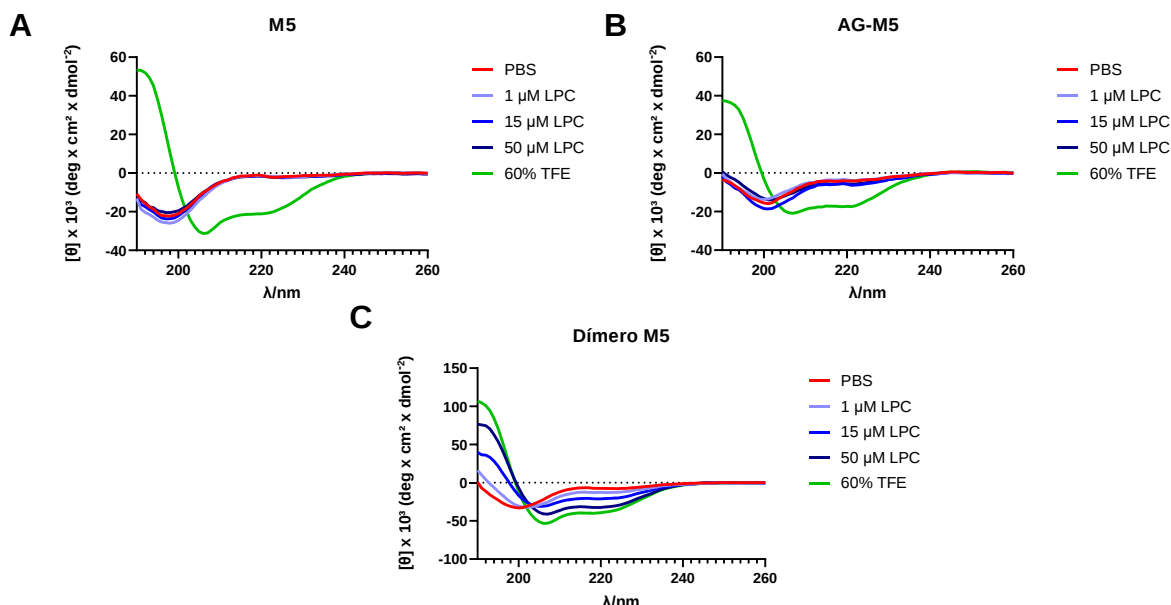


4.3 Dicroísmo Circular (DC)

Os peptídeos foram submetidos a diferentes condições de estruturação, cujo objetivo foi avaliar possíveis mudanças conformacionais na estrutura das moléculas estudadas. Sendo assim, os peptídeos foram solubilizados em tampão PBS pH 7,4 e expostos a diferentes concentrações de LPC, que simula o ambiente da membrana celular, e ao solvente TFE, que promove estruturação de biomoléculas.

O M5 estruturou em α -hélice em solução de 60% TFE, sendo que nas demais condições o peptídeo não apresentou estrutura secundária definida. A versão com AG apresentou os mesmos resultados do peptídeo sem o AG. Entretanto, a forma dimérica do M5 demonstrou interação com LPC e uma tendência em se estruturar a partir da concentração de 15 μ M de LPC. Com o aumento da concentração de LPC a estruturação aumentou. Na presença de 60% de TFE o dímero apresentou o maior teor de α -hélice, de acordo com a maior absorção em 208 e 222 nm (Figura 11).

Figura 12: Espectro de DC dos peptídeos M5, AG-M5 e dímero do M5. **A)** M5 com estrutura α -hélice em 60% de TFE e estrutura random coil nas demais condições. **B)** AG-M5 com estrutura em α -hélice em TFE 60% e estrutura random coil nas demais condições. **C)** Dímero M5 com estrutura random coil em PBS e 1 μ M LPC, tendência a estruturação em α -hélice em 15 μ M LPC, 50 μ M LPC e 60% TFE.

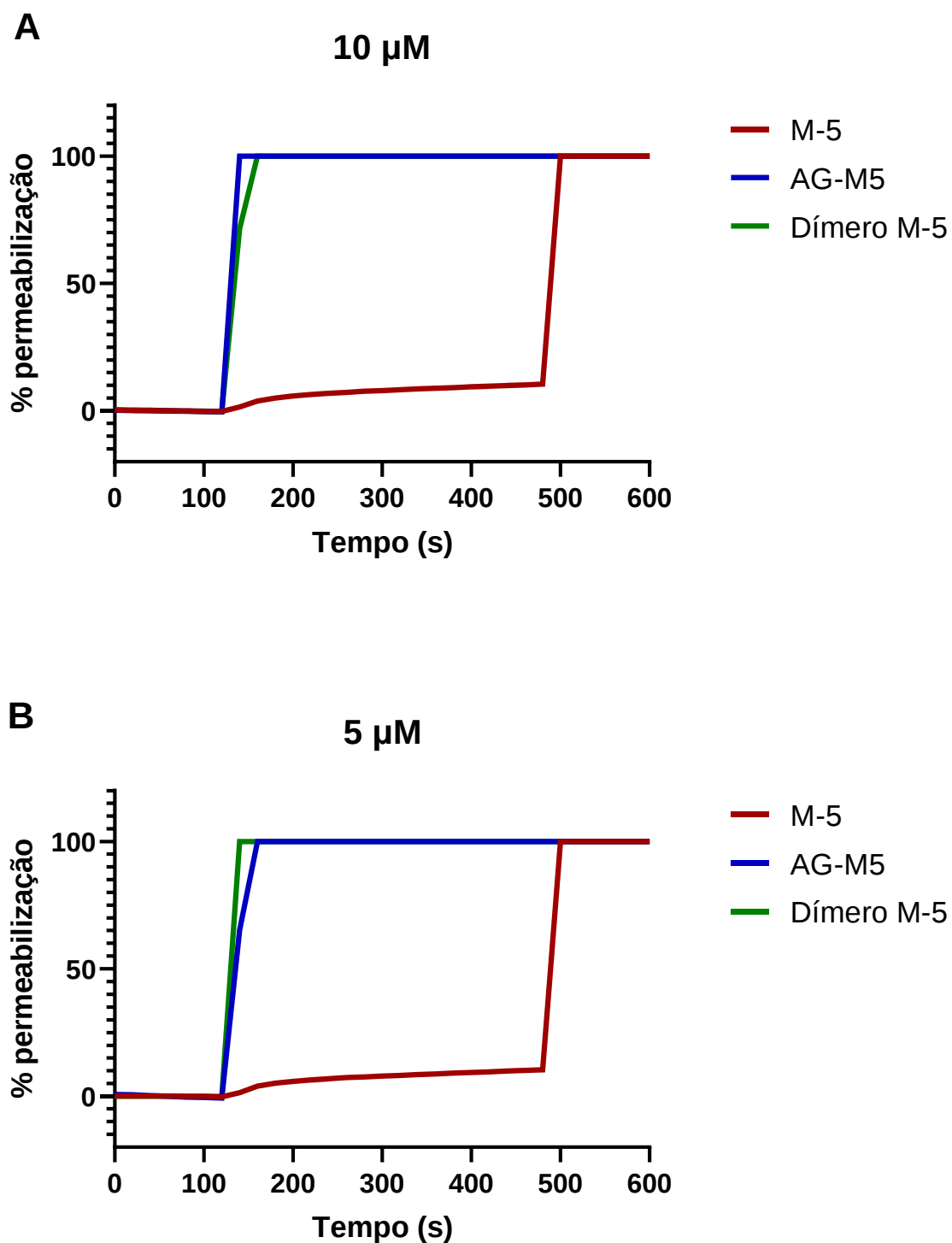


4.4 Permeabilização de vesículas

Para avaliar a capacidade dos peptídeos em permeabilizar uma membrana lipídica foram realizados os ensaios de permeabilização de vesículas contendo carboxifluoresceína (CF). A composição de 95% POPC:5% POPE foi usada para a construção das vesículas. Esta composição lipídica foi empregada visando mimetizar a composição do capsídeo viral do SARS-CoV-2, que é, segundo Robson et al, apresenta composição próxima a do retículo endoplasmático da célula hospedeira (ROBSON et al., 2020). Para confirmar a estabilidade das vesículas essas foram avaliadas durante 2 min, com posterior adição do peptídeo. A liberação total da carboxifluoresceína (100 %) foi obtida com a adição do Triton (Figura 12).

O peptídeo M5 nas concentrações de 5 e 10 μ M provocou um pequeno aumento da liberação de carboxifluoresceína, cerca de 10% (Figura 12). O peptídeo AG-M5 e o dímero de M5 quando em contato com a vesícula provocaram permeabilização total da vesícula com liberação quase que instantânea da CF (Figura 12).

Figura 13: Ensaio de permeabilização de vesículas nos peptídeos M5, AG-M5 e dímero do M5. **A)** concentração 10 μM . **B)** concentração de 5 μM . M5 (vermelho), AG-M5 (Azul), Dímero M5 (verde). Vesículas compostas por 95% POPC e 5% POPE.



4.5 Viabilidade Celular

Os gráficos de viabilidade celular (Figura 13 e 14) foram obtidos a partir da relação da porcentagem de células viáveis (viabilidade celular) pelas concentrações de peptídeos utilizadas. Os resultados mostraram que os compostos M5 e AG-M5 apresentam baixos índices de morte celular, principalmente em concentrações menores e/ou iguais a 50 μM nos tempos de 24 e 48 h. No entanto, o composto dimérico M5 apresentou viabilidade celular abaixo de 20% nas concentrações de acima de 12,5 $\mu\text{mol/L}$, sendo que em 6,25 $\mu\text{mol/L}$ apresentou viabilidade celular em torno de 70%. Estes dados, mostraram que os compostos M5 e AG-M5 são moléculas promissoras para a continuação dos ensaios para determinação da atividade antiviral.

Figura 14: Viabilidade celular das células Vero tratadas com diferentes concentrações dos compostos M5, AG-M5 e dímero M5, após 24 h de incubação. As barras representam os desvios padrões obtidos a partir da triplicata das concentrações nos dois eventos realizados. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. As linhas pontilhadas em azul representam 100 % de viabilidade celular e as pontilhadas em vermelho representam 80 % de viabilidade celular, utilizado como limite de toxicidade.

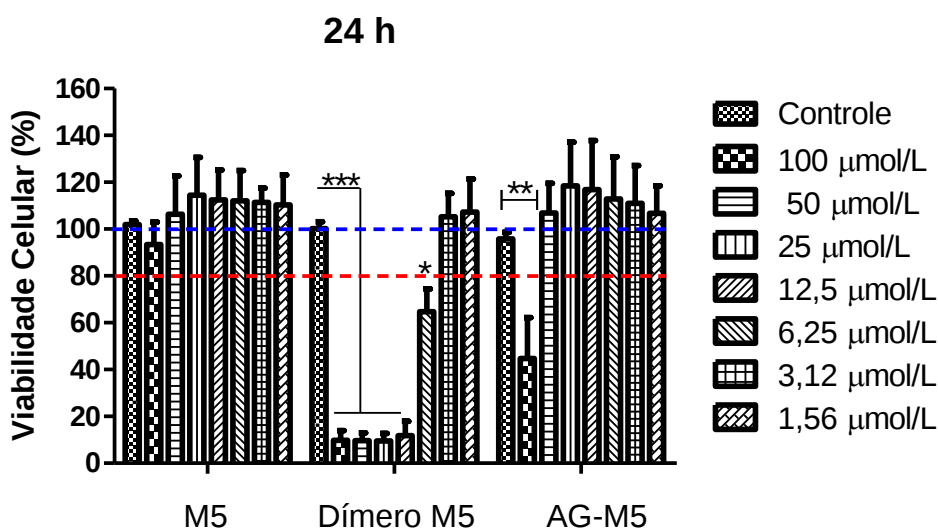
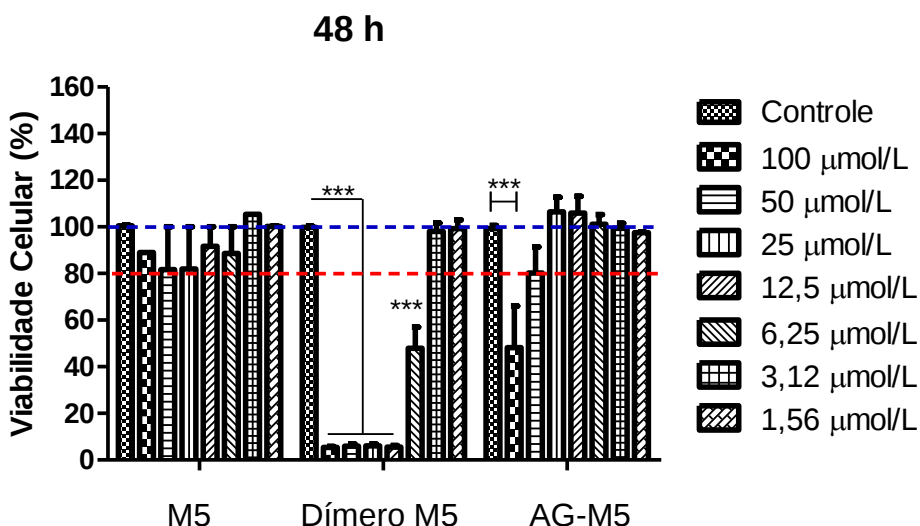


Figura 15: Viabilidade celular das células Vero tratadas com diferentes concentrações dos compostos M5, AG-M5 e dímero M5, após 48 h de incubação. As barras representam os desvios padrões obtidos a partir da triplicata das concentrações nos dois eventos realizados. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. As linhas pontilhadas em azul representam 100 % de viabilidade celular e as pontilhadas em vermelho representam 80 % de viabilidade celular, utilizado como limite de toxicidade.



4.6 Inibição de Proteases

Os peptídeos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição de duas proteases presentes no processo de replicação viral. Neste teste o peptídeo M5 promoveu a inibição de 4% da atividade da M^{pro} e 93% da atividade da PL^{pro} , com IC_{50} de 3,1 μM neste último ensaio. Já os peptídeos AG-M5 e Dímero M5 não se mostraram capazes de inibir M^{pro} , entretanto, na concentração de 10 μM , os peptídeos inibiram a atividade da PL^{pro} em 89% e 92%, respectivamente. Para a PL^{pro} os valores de IC_{50} foram de 2,3 μM para o AG-M5 e 2,2 μM para o Dímero M5 (Tabela 3 e figuras de 16 a 18).

Tabela 3: Dados de Inibição das proteases M^{pro} e PL^{pro} pelos peptídeos testados

Composto	M^{pro} % de inibição em 10 μM	PL^{pro} % de inibição em 10 μM	$IC_{50} PL^{\text{pro}}$ (μM)
M5	4 $\pm$ 3	93 $\pm$ 3	3,1 $\pm$ 0,9
AG-M5	0 $\pm$ 1	89 $\pm$ 3	2,3 $\pm$ 0,5
Dímero M5	0 $\pm$ 1	92 $\pm$ 3	2,2 $\pm$ 0,6

Figura 16: Curva dose-resposta utilizada para a determinação do valor de IC_{50} para M5.

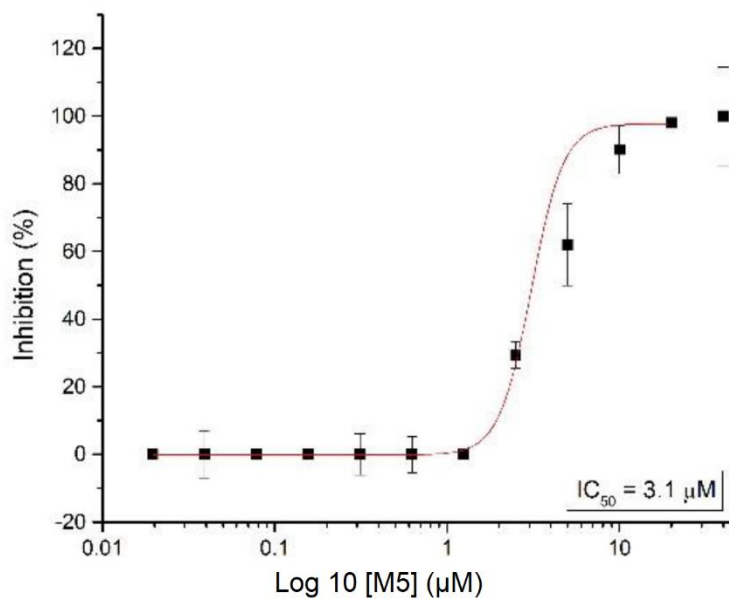


Figura 17: Curva dose-resposta utilizada para a determinação do valor de IC_{50} para o AG-M5.

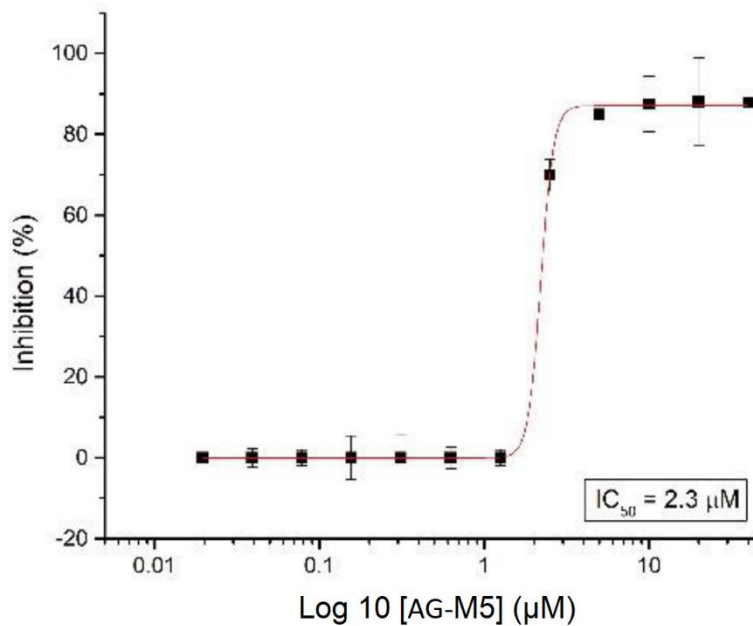
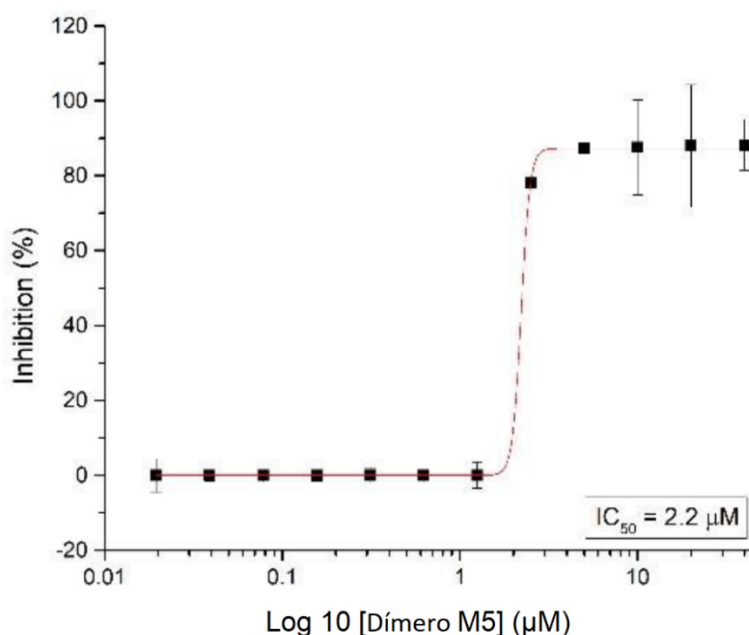


Figura 18: Curva dose-resposta utilizada para a determinação do valor de IC_{50} para o Dímero M5.



4.7 Ensaio antiviral

Devido ao resultado não favorável no ensaio de viabilidade celular para o peptídeo Dímero M5, apenas os peptídeos M5 e AG-M5 foram submetidos ao ensaio antiviral.

Neste ensaio, o peptídeo M5 não afetou a atividade antiviral e tão pouco a viabilidade celular. O bioconjugado AG-M5 mostrou atividade antiviral, no entanto, também reduziu a taxa de sobrevivência celular (Tabela 4).

Tabela 4: Ensaio antiviral realizado na concentração de composto de 10 µg/mL. O composto **M5** não afetou atividade antiviral. O composto **AG-M5** reduziu em 85% a atividade antiviral, reduzindo também a 16% a viabilidade celular.

Compostos	Atividade antiviral (%)	Taxa de sobrevivência celular (%)
M5	-7,31	153,00
AG-M5	85,21	16,18

5 Discussão

Durante as últimas duas décadas, o mundo testemunhou a infecção por três coronas vírus humanos altamente patogênicos, sendo eles SARS-CoV, MERS e SARS-CoV-2. Eles pertencem ao gênero β -coronavírus e foram capazes de atravessar as barreiras animal-humano e causar doenças graves em humanos (ENAYATHULLAH et al., 2022). Portanto, o desenvolvimento de antivirais específicos é de extrema importância. Até o momento, não há medicamento 100% eficaz para SARS-CoV-2. O reposicionamento de medicamentos, já conhecidos por seus efeitos terapêuticos, foi extensivamente rastreado e testado quanto à inibição do SARS-CoV-2. Embora muitos medicamentos avaliados para reposicionamento tenham mostrado excelente atividade anti-SARS-CoV-2 *in vitro* (LIU et al., 2020), eles foram pouco eficazes quando usados clinicamente (CUI et al., 2021).

Portanto, há claramente uma necessidade de desenvolver moléculas terapêuticas que neutralizem efetivamente o vírus. No caso do HIV, medicamentos específicos para o vírus têm se mostrado eficazes no tratamento da doença, embora ainda não exista vacina eficaz (WANG et al., 2022). Em 2011, os medicamentos peptídicos antivirais boceprevir e telaprevir foram aprovados para o tratamento clínico do vírus da HCV (WANG et al., 2022).

Em estudos de nosso laboratório, o peptídeo AG-Hecate mostrou ser eficaz contra a replicação do vírus HCV (BATISTA et al., 2018), sendo que seu metabólito AG-M5 demonstrou atividade contra o Zika vírus (SANCHES, 2020).

Neste trabalho, o peptídeo M5 foi avaliado contra o SARS-CoV-2, a fim de averiguar seu potencial como antiviral. O peptídeo em questão, também foi avaliado em sua forma dimérica e conjugado a uma molécula de AG, visando potencializar um possível efeito antiviral.

Os três compostos foram sintetizados por SPFS. Os dados obtidos por espectrometria de massas e por CLAE mostraram a presença do peptídeo M5 no material bruto da síntese do bioconjugado AG-M5, indicando dificuldade de acoplamento do AG ao peptídeo mesmo após 5 tentativas de acoplamento.

Os peptídeos apresentaram grande variação em seu tempo de retenção na CLAE, que está diretamente relacionado a sua hidrofobicidade, indicando diferentes propriedades físico-químicas após sua dimerização ou conjugação ao AG (tabela 2),

(KIM; KIM; LEE, 2005; SPICER et al., 2010). O AG é uma molécula anfipática e sua adição a sequência de aminoácidos do M5 (AG-M5) provocou um aumento no tempo de retenção. A forma dimérica do M5 também apresentou um aumento no seu tempo de retenção, entretanto menor do que o peptídeo com AG.

Nos ensaios de dicroísmo circular, os três peptídeos apresentaram estruturação em α -hélice na presença de 60% TFE, contudo apenas o dímero M5 se estruturou nas concentrações de 15 e 50 μ M de LPC (Figura 11), mostrando uma maior facilidade de estruturação, o que poderia apresentar uma maior interação com estruturas lipídicas. Os ensaios de permeabilização de vesícula corroboram para essa ideia.

O peptídeo M5 mostrou baixa capacidade de permeabilizar a membrana, promovendo a liberação de apenas 10% de CF nas duas concentrações estudadas (Figura 12). Os demais peptídeos, na concentração de 5 e 10 μ M, provocaram 100% da liberação de CF, demonstrando não apenas a capacidade desses materiais em interagir com essas vesículas, mas também que a permeabilização não é concentração dependente. Apesar de apenas duas concentrações serem avaliadas, acreditamos que o mecanismo por meio do qual os compostos agem na membrana é do tipo *carpet-like*, ou seja, o material vai se acumulando na superfície da vesícula até atingir uma concentração crítica em que promove a micelização e o rompimento da vesícula (JÄRVÅ et al., 2018). Se a permeabilização ocorresse de forma concentração dependente o mecanismo de ação seria por meio da formação de poros, sejam eles no modelo de barril (onde as moléculas peptídicas interagem entre si para a formação de um poro na bicamada lipídica) ou *toroidal* (onde a formação de poros ocorre com a participação dos lipídeos) (MESA-GALLOSO et al., 2019).

Os peptídeos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir proteases fundamentais no processo de replicação viral. Este ensaio buscava averiguar se os peptídeos trabalhados neste estudo poderiam apresentar atividade em enzimas do processo de replicação viral como outros medicamentos já disponíveis no mercado, como o paxlovid, que inibe a M^{pro} (REINA; IGLESIAS, 2022) ou como Molnupiravir que age sobre a RdRp (KABINGER et al., 2021). Outros compostos também têm mostrado atividade frente a RdRp como é o caso da quercetina (SAAKRE; MATHEW; RAVISANKAR, 2021), um flavonoide encontrado em maçãs, cebolas, chás, brócolis e vinho tinto. Metabólitos de cianobactérias, como a cilindrospermopsina,

desoxicildropermopsina, carragenina, criptoficina 52, eucapsitriona, tjipanazol, toliporfina e apratoxina A também apresentaram potencial inibitório contra a M^{pro}, enquanto que a riptoficina 1, criptoficina 52 e desoxicildropermopsina apresentaram atividades inibitórias significativas contra o PL^{pro} (NAIDOO et al., 2020).

Os resultados obtidos mostraram que os peptídeos estudados apresentaram inibição na atividade da PL^{pro}. e não para a M^{pro}, mostrando especificidade ao alvo molecular. Esta especificidade pode estar relacionada ao tipo de ligação peptídica clivadas pelas enzimas. A PL^{pro} cliva poliproteínas que contenham preferencialmente a sequência LXGG, na ligação peptídica no lado carboxílico da glicina, existente entre as proteínas virais nsp1 e nsp2, nsp2 e nsp3, e nsp3 e nsp4 (KAUR et al., 2021). Diferentemente a M^{pro} cliva ligações peptídicas preferencialmente da sequência LQSAG, entre os resíduos de Gln e Ser (RUT et al., 2020b). Como as sequências dos compostos avaliados não possuem a sequência colocada acima para a PL^{pro} e foram capazes de inibir esta enzima, o estudo atual pode colaborar no desenvolvimento de novas moléculas na inibição deste alvo molecular.

Para avaliar a atividade antiviral dos peptídeos, os compostos M5 e AG-M5 foram avaliados. O peptídeo M5 não afetou a carga viral, enquanto que o AG-M5 reduziu a replicação do SARS-CoV-2 em 85%. No entanto, essa redução na carga viral pode ser atribuída a morte celular e não necessariamente a ação do peptídeo na replicação viral. Contudo, novas replicações deste teste com este peptídeo se fazem necessárias para se ter uma real dimensão de qual é a verdadeira atividade deste peptídeo, já que na avaliação inicial de viabilidade celular ele não havia se mostrado citotóxico nesta concentração. Devido à baixa viabilidade celular apresentada pelo peptídeo dímero M5 este não foi selecionado para o ensaio antiviral.

A atividade do peptídeo na enzima PL^{pro} e não no processo de replicação, pode ser atribuído a baixa capacidade de penetração celular do peptídeo M5, o que impede a inibição da enzima.

6 Conclusão

Este estudo mostrou que a síntese de peptídeos em fase sólida foi eficiente na obtenção das 3 moléculas avaliadas. Os dados de dicroísmo circular revelaram que todos os peptídeos apresentaram estrutura em α -hélice em 60% TFE, no entanto com diferentes teores de estruturação. Os estudos de permeabilização mostraram que os peptídeos AG-M5 e o dímero M5 possuem uma grande capacidade de interagir e permeabilizar a membrana, enquanto que o peptídeo M5 demonstrou uma baixa capacidade de permeabilização. Esses resultados estão de acordo com os dados de citotoxicidade, no qual a maior viabilidade celular foi encontrada para o peptídeo M5. A diferença encontrada entre os dados de permeabilização e citotoxicidade para os peptídeos AG-M5 e dímero M5 pode ser devido a composição da membrana, que possui além de lipídeos, outros componentes celulares.

Os resultados negativos de atividade antiviral divergem dos resultados dos ensaios de atividade enzimática da enzima PL^{pro}, que mostraram uma inibição destes compostos. Este fato, pode ser atribuído a baixa capacidade de penetração celular destes compostos.

Portanto, estudos complementares se fazem necessários, com o intuito de melhor elucidar a real atividade dos peptídeos aqui trabalhados frente a infecção por SARS-CoV-2.

De qualquer forma, os compostos avaliados neste projeto podem colaborar no desenvolvimento de novas moléculas visando a inibição da enzima PL^{pro}.

Referências

- AHMED, A. et al. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. **Viruses** **2019**, Vol. **11**, Page **704**, v. 11, n. 8, p. 704, 1 ago. 2019.
- ALAGARASU, K. et al. In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2. **Peptides**, v. 92, p. 23–30, 1 jun. 2017.
- AL-KURAI SHY, H.; AL-GAREEB, A. I. From SARS-CoV to nCoV-2019: Ruction and Argument. 2020.
- ALMEIDA, J. D.; TYRRELL, D. A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. **The Journal of general virology**, v. 1, n. 2, p. 175–178, 1 abr. 1967.
- AMER, H. et al. Unusual presentation of Middle East respiratory syndrome coronavirus leading to a large outbreak in Riyadh during 2017. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 9, p. 1022–1025, 1 set. 2018.
- ANDREATA-SANTOS, R.; JANINI, L. M. R.; DURÃES-CARVALHO, R. From Alpha to Omicron SARS-CoV-2 variants: What their evolutionary signatures can tell us? **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 1773–1776, 1 maio 2022.
- ARAUJO, D. B. et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. 1–8, 23 out. 2020.
- BATISTA, M. N. et al. 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. 1–12, 1 dez. 2018.
- BRAYDEN, D. J. et al. Systemic delivery of peptides by the oral route: Formulation and medicinal chemistry approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 157, p. 2–36, 1 jan. 2020.
- CAIAFFA, K. S. 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, 26 nov. 2017.
- CAO, Y. et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. **Nature** **2021** **602:7898**, v. 602, n. 7898, p. 657–663, 23 dez. 2021.

CHAN, Y. A.; ZHAN, S. H. The Emergence of the Spike Furin Cleavage Site in SARS-CoV-2. **Molecular Biology and Evolution**, v. 39, n. 1, 7 jan. 2022.

CHEN, B. et al. **Overview of lethal human coronaviruses** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0190-2>>. Acesso em: 19 ago. 2020

CHERRY, J. D.; KROGSTAD, P. SARS: The first pandemic of the 21st century. **Pediatric Research**, v. 56, n. 1, p. 1–5, 2004.

CHIRICO, F.; KHAN, S. Safety & effectiveness of COVID-19 vaccines: A narrative review Graduate Research Projects View project Establishing a Universal Classification System and Minimum Reporting Requirements for Platelet-Rich Plasma (PRP) based Biological Therapy View project. **Article in Indian Journal of Medical Research**, 2022.

COVID-19 MAP - JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER. **COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center**. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

CREECH, C. B.; WALKER, S. C.; SAMUELS, R. J. SARS-CoV-2 Vaccines. **JAMA**, v. 325, n. 13, p. 1318–1320, 6 abr. 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 1 mar. 2019. Disponível em: <www.nature.com/nrmicro>. Acesso em: 8 ago. 2020

CUI, X. et al. Effects of chloroquine or hydroxychloroquine treatment on non-SARS-CoV2 viral infections: A systematic review of clinical studies. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 6, p. e2228, 1 nov. 2021.

ENAYATHULLAH, M. G. et al. Gramicidin S and melittin: potential anti-viral therapeutic peptides to treat SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 3446, 2 dez. 2022.

FERREIRA SALES-MEDINA, D. et al. Discovery of clinically approved drugs capable of inhibiting SARS-CoV-2 in vitro infection using a phenotypic screening strategy and network-analysis to predict their potential to treat covid-19. **bioRxiv**, p. 2020.07.09.196337, 13 jul. 2020.

FINKEL, Y. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. **Nature** 2020 **589:7840**, v. 589, n. 7840, p. 125–130, 9 set. 2020.

FRANCIS, A. I. et al. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. **Postgraduate Medical Journal**, v. 0, p. 1–6, 6 ago. 2021.

FREIRE, M. C. L. C. et al. Non-Toxic Dimeric Peptides Derived from the Bothropstoxin-I Are Potent SARS-CoV-2 and Papain-like Protease Inhibitors. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **4896**, v. 26, n. 16, p. 4896, 12 ago. 2021.

GAO, Y. et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6492, p. 779–782, 10 abr. 2020.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols** **2007** **1:6**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 25 jan. 2007.

HADDADZADEGAN, S.; DORKOOSH, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 182, p. 114097, 1 mar. 2022.

HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology** **2021** **19:7**, v. 19, n. 7, p. 409–424, 1 jun. 2021.

HE, M. et al. Cathelicidin-derived antimicrobial peptides inhibit Zika virus through direct inactivation and interferon pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 722, 12 abr. 2018.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 16 abr. 2020.

HU, J. et al. Increased immune escape of the new SARS-CoV-2 variant of concern Omicron. **Cellular & Molecular Immunology** **2022** **19:2**, v. 19, n. 2, p. 293–295, 11 jan. 2022.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, p. 497–506, 2020.

JACKSON, B. et al. Generation and transmission of interlineage recombinants in the SARS-CoV-2 pandemic. **Cell**, v. 184, n. 20, p. 5179- 5188.e8, 30 set. 2021.

JARA, A. et al. Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 10, p. 875–884, 2 set. 2021.

JÄRVÅ, M. et al. X-ray structure of a carpet-like antimicrobial defensin-phospholipid membrane disruption complex. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

KABINGER, F. et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. **Nature Structural & Molecular Biology** 2021 28:9, v. 28, n. 9, p. 740–746, 11 ago. 2021.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1 abr. 1970.

KAMPF, G. et al. **Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents** *Journal of Hospital Infection* W.B. Saunders Ltd, , 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>>. Acesso em: 9 ago. 2020

KAUR, M. et al. SARS-CoV-2: Insights into its structural intricacies and functional aspects for drug and vaccine development. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 45–60, 15 maio 2021.

KEVADIYA, B. D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature Materials** 2021 20:5, v. 20, n. 5, p. 593–605, 15 fev. 2021.

KHANDIA, R. et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic. **Environmental Research**, v. 209, p. 112816, 1 jun. 2022.

KIM, E. Y.; RAJASEKARAN, G.; SHIN, S. Y. LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its D-amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 428–441, 18 ago. 2017.

KNOLL, M. D.; WONODI, C. Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 72–74, 9 jan. 2021.

KOKIC, G. et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. **Nature Communications** 2021 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–7, 12 jan. 2021.

KRAUSE, P. R. et al. SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 2, p. 179–186, 8 jul. 2021.

LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature** **2020** **581:7807**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, 30 mar. 2020.

LI, J. et al. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. **Nature** **2021** **600:7889**, v. 600, n. 7889, p. 408–418, 8 dez. 2021.

LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020.

LIU, J. et al. Cell Discovery Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. [s.d.].

LIU, L. et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. **Nature** **2021** **602:7898**, v. 602, n. 7898, p. 676–681, 23 dez. 2021.

LIU, R. et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. **Clinica Chimica Acta**, v. 505, p. 172–175, 1 jun. 2020.

LOWERY, S. A.; SARIOL, A.; PERLMAN, S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1052–1062, 14 jul. 2021.

MACHHI, J. et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 359–386, 1 set. 2020.

MAHASE, E. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. **BMJ**, v. 375, p. n2713, 8 nov. 2021.

MAITI, B. K. Potential Role of Peptide-Based Antiviral Therapy against SARS-CoV-2 Infection. **ACS Pharmacology and Translational Science**, v. 3, n. 4, p. 783–785, 14 ago. 2020.

MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. 2021.

MESA-GALLOSO, H. et al. Membrane Remodeling by the Lytic Fragment of SticholysinII: Implications for the Toroidal Pore Model. **Biophysical Journal**, v. 117, n. 9, p. 1563–1576, 5 nov. 2019.

MURGOLO, N. et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 2, p. e1009225, 17 fev. 2021.

MURUGAN, C. et al. COVID-19: A review of newly formed viral clades, pathophysiology, therapeutic strategies and current vaccination tasks. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, n. Pt B, p. 1165–1200, 25 out. 2021.

NAIDOO, D. et al. Cyanobacterial metabolites as promising drug leads against the Mpro and PLpro of SARS-CoV-2: an in silico analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–13, 2020.

NELSON. **Princípios de Bioquímica de Lehninger - 7.ed. - Google Books**. Disponível em: <https://www.google.com.br/books/edition/Princ%C3%ADpios_de_Bioqu%C3%ADmica_de_Lehninger/nYR-DwAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=1&dq=bioquimica+lehninger&printsec=frontcover>. Acesso em: 22 nov. 2021.

OLWENYI, O. A. et al. Immuno-epidemiology and pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 98, n. 10, p. 1369–1383, 18 ago. 2020.

PADOAN, A. et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, p. 164–166, 1 ago. 2020.

PAN, Y. et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e28–e32, 1 jul. 2020.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12S, p. S88–S97, 2004.

REINA, J.; IGLESIAS, C. [Nirmatrelvir plus ritonavir (Paxlovid) a potent SARS-CoV-2 3CLpro protease inhibitor combination]. **Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, 21 fev. 2022.

ROBSON, F. et al. Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. **Molecular Cell**, v. 79, n. 5, p. 710–727, 4 ago. 2020.

RUT, W. et al. SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging. **Nature Chemical Biology** 2020 17:2, v. 17, n. 2, p. 222–228, 22 out. 2020a.

RUT, W. et al. SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging. **Nature Chemical Biology** 2020 17:2, v. 17, n. 2, p. 222–228, 22 out. 2020b.

SAAKRE, M.; MATHEW, D.; RAVISANKAR, V. Perspectives on plant flavonoid quercetin-based drugs for novel SARS-CoV-2. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2021.

SANCHES, P. R. DA S. [UNESP]. Desenvolvimento de novos peptídeos e bioconjugados com atividade contra infecção por Zika Vírus. 15 set. 2020.

SANCHES, P. R. S. et al. Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). **Journal of Virus Eradication**, v. 7, n. 3, p. 100054, 1 set. 2021.

SIMÕES, R. S. DE Q.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. Classical and Next-Generation Vaccine Platforms to SARS-CoV-2: Biotechnological Strategies and Genomic Variants. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2022, Vol. 19, Page 2392, v. 19, n. 4, p. 2392, 18 fev. 2022.

SINGH, J. et al. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. **Nature Medicine** 2021 27:7, v. 27, n. 7, p. 1131–1133, 27 maio 2021.

STADLER, K. et al. SARS — beginning to understand a new virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 209–218, 2003.

STADNYTSKYI, V. et al. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 22, p. 11875–11877, 2 jun. 2020.

SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. 2016.

TANRIOVER, M. D. et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. **The Lancet**, v. 398, n. 10296, p. 213–222, 17 jul. 2021.

TAO, K. et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. **Nature Reviews Genetics** 2021 **22:12**, v. 22, n. 12, p. 757–773, 17 set. 2021.

VAN DOREMALEN, N. et al. **Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1** *New England Journal of Medicine* Massachusetts Medical Society, , 16 abr. 2020. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2004973>>. Acesso em: 9 ago. 2020

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5–8, 1 jan. 2011.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 abr. 2020.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 17 mar. 2020.

WANG, L. et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2022 **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–27, 14 fev. 2022.

WANG, Y.; TURVEY, S. T.; LEADER-WILLIAMS, N. Knowledge and attitudes about the use of pangolin scale products in Traditional Chinese Medicine (TCM) within China. **People and Nature**, v. 2, n. 4, p. 903–912, 1 dez. 2020.

WINICHAKOON, P. et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swabs do not rule out COVID-19. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, 1 maio 2020.

WROBEL, A. G. et al. Structure and binding properties of Pangolin-CoV spike glycoprotein inform the evolution of SARS-CoV-2. **Nature Communications** 2021 **12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 5 fev. 2021.

WU, C. RONG et al. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica** 2022, p. 1–13, 20 jan. 2022.

WYLLIE, A. L. et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. **medRxiv**, v. 3, n. 2, p. 2020.04.16.20067835, 22 abr. 2020.

XIAO, F. et al. Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19 - Volume 26, Number 8—August 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1920–1922, 1 ago. 2020.

YAN, F.; GAO, F. An overview of potential inhibitors targeting non-structural proteins 3 (PLpro and Mac1) and 5 (3CLpro/Mpro) of SARS-CoV-2. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 4868–4883, 1 jan. 2021.

YE, Q. et al. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Protein Science**, v. 29, n. 9, p. 1890–1901, 1 set. 2020.

YU, J. et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 Variants. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 16, p. 1579–1580, 21 abr. 2022.

ZHANG, H. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 4, p. 586–590, 1 abr. 2020a.

ZHANG, J. et al. Insights into the cross-species evolution of 2019 novel coronavirus. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 671–693, 1 jun. 2020b.

ZHANG, N. N. et al. Rapid development of an updated mRNA vaccine against the SARS-CoV-2 Omicron variant. **Cell Research 2022 32:4**, v. 32, n. 4, p. 401–403, 14 fev. 2022.

ZHAO, Y. et al. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 5, p. 756–759, 1 set. 2020.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, 2012.