

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Ingrid Melchior Ferreira

Síntese e atividade biológica de peptídeos derivados da molécula de Andersonin-D1

Santo André
NOVEMBRO – 2021

Ingrid Melchior Ferreira

Síntese e atividade biológica de peptídeos derivados da molécula de Andersonin-D1

Monografia de Trabalho de
Conclusão de Curso, apresentado ao
Bacharelado em Química da UFABC
para obtenção do título de Bacharel
em Química
Orientador: Prof. Dr. Vani X. Oliveira Jr

ASSINATURA
DISCENTE

ASSINATURA
ORIENTADOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vani Xavier de Oliveira Junior, pela oportunidade, orientações, paciência e confiança em mim na realização desse trabalho, que me introduziu ao universo do que é ser um químico.

À minha mãe que sempre me significou força e me ensinou a enfrentar todos os desafios da vida com muita coragem.

À minha tia Rose que desde sempre me ensina a ser a minha melhor versão, vem sendo uma grande incentivadora, e que tem toda a minha admiração.

Ao meu tio Ricardo e prima Sofia que são sinônimos de amor, carinho e cuidado, e sempre estiveram por perto em momentos de descontração durante a minha graduação.

À minha amiga Nataly, pela grande parceria que tivemos e que fez desse processo muito mais leve e divertido.

Aos meus amigos de dentro e de fora da UFABC que foram essenciais durante momentos de distração, risadas e companheirismo.

À todos do LACOMB, em especial aos alunos da pós-graduação do grupo de pesquisa do Prof. Vani: Cibele, Katielle, Cyntia e Gustavo que foram grandes mentores e parceiros do início ao fim desse processo.

RESUMO

A descoberta dos antimicrobianos apresentou um grande avanço científico, podendo ser considerado um marco na história da saúde pública. Através dos agentes responsáveis pela ação de inibição ou destruição dos patógenos, incontáveis doenças infecciosas podem ser tratadas. Contudo, nas últimas décadas o avanço da resistência antimicrobiana (RAM) tem se mostrado um grande desafio no combate a doenças com raízes nesses micro-organismos. A natureza mostra-se repleta de recursos complexos, evidenciando a sua competência no quesito sobrevivência. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão presentes em distintas fontes na natureza, sendo o estudado nesse projeto, encontrado na mucosa da pele do sapo *Odorous frogs*. Com base nesses compostos, esse projeto pretendeu estudar a atividade antimicrobiana do peptídeo Andersonin-D1, no intuito de aprimorar essa bioatividade, por intermédio de análogos com alterações pontuais da posição de aminoácidos, adicionando-se carga a molécula. A etapa sintética foi realizada por síntese em fase sólida. O material foi purificado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) obtendo pureza adequada para os posteriores testes e caracterizados por LC/MS. Os materiais passaram em seguida por ensaio estrutural por meio de um espectropolarímetro. Foram realizados três testes biológicos: antimicrobiano, com bactérias gram-negativas; ensaio de degradação enzimática, em soro fetal bovino e ensaio hemolítico, na presença de eritrócitos humanos. Os peptídeos análogos apresentaram propriedades antimicrobianas promissoras. Todos os peptídeos inibiram o crescimento bacteriano da *Escherichia coli* entre 2 e 4 μM (MIC); porém, mostraram pouca atividade contra *Enterobacter cloacae*. Nas duas cepas estudadas da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, o $[\text{K}]^3\text{-AD1-NH}_2$ foi o menos ativo, com inibições entre 16 e 64 μM . Contra essas mesmas cepas, os outros análogos apresentaram resultados similares ao controle positivo, com atividades em 8 e 16 μM . Os análogos apresentaram significativa frações helicoidais em TFE, sendo este o meio que mais induz tal conformação. No teste de degradação enzimática, o análogo $[\text{K}]^3\text{-AD1-NH}_2$ foi o mais resistente, no tempo máximo testado de 6h, demonstrando correlações entre degradação e a estruturação do peptídeo. Além disso, nenhum dos compostos foi hemolítico nas concentrações testadas. Diante dos resultados obtidos, tais materiais mostram-se favoráveis a estudos futuros e aprofundamentos.

Palavras-chave: Antimicrobianos, PAM, *Odorous frogs*, Andersonin-D1.

ABSTRACT

The discovery of antimicrobials presented a great scientific advance and can be considered a milestone in the history of public health. Due to the agents responsible for inhibiting or destroying pathogens, countless infectious diseases can be treated. However, in recent decades the advance of antimicrobial resistance (RAM) has been a major challenge in combating diseases rooted in microorganisms. Nature is full of complex resources, showing its competence in terms of survival. Antimicrobial peptides (AMPs) are present in different sources in nature, and the one studied in this project is found in the skin mucosa of the odorous frogs. Based on these compounds, this project intends to study an antimicrobial activity of the Andersonin-D1 peptide, in order to improve this bioactivity, through analogues with punctual changes in the position of amino acids, adding charge to the molecule. The synthetic step was carried out by solid phase synthesis. The material was purified in a high performance liquid chromatography (HPLC) system obtaining purity for further tests and characterization by LC/MS. Then, a structural test was carried out with the materials obtained, using a spectropolarimeter. Three biological tests were performed: antimicrobial, with gram-negative bacteria; enzyme degradation assay, in fetal bovine serum and hemolytic assay, in the presence of human erythrocytes. Analogous peptides showed promising antimicrobial properties. All peptides inhibited the bacterial growth of *Escherichia coli* between 2 and 4 μM (MIC); however, they showed little activity against *Enterobacter cloacae*. In the two strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* studied, [K]³-AD1-NH₂ was the least active, with inhibitions between 16 and 64 μM . Against these same strains, the other analogues showed results similar to the positive control, with activities at 8 and 16 μM . The analogues showed significant helical fractions in TFE, which is the medium that most induces such a conformation. In the enzymatic degradation test, the analog [K]³-AD1-NH₂ was the most resistant, in the maximum tested time of 6h, demonstrating correlations between degradation and the structuring of the peptide. Furthermore, none of the compounds were hemolytic at the concentrations tested. Given the results obtained, such materials are favorable for future studies and deepening.

Keywords: Antimicrobials, PAMS, Odorous frogs, Andersonin-D1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Projeção helicoidal do Andersonin-D1 com as alterações realizadas em destaque. Os aminoácidos representados pelas cores roxa e rosa apresentam resíduos hidrofílicos, aqueles representados pelas cores amarela, verde e cinza apresentam resíduos hidrofóbicos e aqueles com representação azul tem característica hidrofílica carregados positivamente (básicos). Sua hidrofobicidade, igual a 0,597 e seu momento hidrofóbico é igual a 0,320 e tem carga líquida igual a 3. 10
- Figura 2.** Estrutura da Rink Amide utilizada como suporte sólido durante a etapa de síntese. 15
- Figura 3.** Estrutura básica dos aminoácidos. 15
- Figura 4.** Estrutura química do grupo protetor fluorometiloxicarbonila (Fmoc). 16
- Figura 5.** Reações relacionadas à etapa sintética do peptídeo. (a) Ancoramento do primeiro aminoácido protegido pelo grupo Fmoc à resina Rink Amide; (b) Desproteção do grupo Fmoc e (c) Reação de acoplamento na presença de DIC e HOBt. 16
- Figura 6.** Mecanismos de reação relacionados à etapa sintética do peptídeo. (a) Ancoramento do primeiro aminoácido protegido pelo grupo Fmoc à resina Rink Amide; (b) Desproteção do grupo Fmoc e (c) Reação de acoplamento na presença de DIC e HOBt. 18
- Figura 7.** Cromatograma do peptídeo bruto [K]¹-AD1-NH₂. Os perfis em LC/ESI-MS foram obtidos nas seguintes condições: Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3,5 µm; Sistema de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O, B: 0,1% TFA em 60% ACN/H₂O; Gradiente: 5-95% de B em 20 minutos; Fluxo: 0,4 mL min⁻¹; λ = 190-300 nm; Volume de injeção: 30 µL; Concentração da amostra: 1,0 mg mL⁻¹. 19
- Figura 8.** (1) Cromatograma do análogo [K]¹-AD1-NH₂ purificado e (2) Scan de massas. Os perfis em LC/ESI-MS foram obtidos nas seguintes condições: Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3,5 µm; Sistema de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O, B: 0,1% TFA em 60% ACN/H₂O; Gradiente: 5-95% de B em 30 minutos; Fluxo: 0,4 mL/min; λ = 190-300 nm; Volume de injeção: 30 µL; Concentração da amostra: 1,0 mg/mL e Intervalo de massas: 200 – 2000 Daltons. 20
- Figura 9.** Espectro de massas do análogo [K]¹-AD1-NH₂ purificado, obtido no tempo de 11,2 minutos. 21
- Figura 10.** Espectroscopia de dicroísmo circular dos análogos em água, em tampão fosfato salino - PBS (pH 7,4), em dodecil sulfato de sódio (SDS) e em 60% 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)/Água. 23
- Figura 11.** Atividade biológica *in vitro* do AD1-NH₂ e análogos, medida em leitor de microplacas (595 nm) para verificar a inibição de bactérias em comparação ao controle e apresentados como mapas de calor de atividades antimicrobianas (µmol L⁻¹) contra as cepas de *E. cloacae*, *Escherichia coli* BL21, *Pseudomonas aeruginosa* HER-1018 e *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. 25
- Figura 12.** Resistência à degradação enzimática dos análogos do AD1-NH₂. 26

Figura 13. Ensaio da atividade hemolítica in vitro dos análogos do AD1-NH₂ apresentados como mapas de calor (μmol L⁻¹). 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Posições de modificações propostas aos análogos e nomeação para identificação. 11

Tabela 2. Condições e rendimentos dos peptídeos sintetizados. 19

Tabela 3. Dados de caracterização dos análogos. 22

Tabela 4. Concentrações peptídicas em mg mL⁻¹ e o respectivo Conteúdo Peptídico 22

Tabela 5. Frações helicoidais (f_H) em água, PBS, SDS e 60% TFE. 24

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Nome	Símbolo/Abreviação	Estrutura
Arginina	R/Arg	
Asparagina	N/Asn	
Fenilalanina	F/Phe	
Glicina	G/Gly	
Isoleucina	I/Ile	
Leucina	L/Leu	
Lisina	K/Lys	
Prolina	P/Pro	
Serina	S/Ser	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Gerais	10
2.2 Específicos	10
3. METODOLOGIA	11
3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida	11
3.2 Purificação dos peptídeos	12
3.3 Caracterização dos peptídeos	12
3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	12
3.3.2 Espectrometria de massas (LC/ESI-MS/MS)	12
3.4 Conteúdo peptídico	13
3.5 Dicroísmo circular	13
3.6 Ensaio biológico	13
3.6.1 Antimicrobianos	13
3.6.2 Ensaio de degradação enzimática	14
3.6.3 Teste hemolítico	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Síntese de peptídeos	15
4.3 Caracterização dos peptídeos	21
4.4 Conteúdo peptídico	22
4.5 Dicroísmo Circular	22
4.6 Ensaio biológico	24
4.6.1 Antimicrobianos	24
4.6.2 Degradação enzimática	26
4.6.3 Teste hemolítico	26
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

Antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas, capazes de combater micro-organismos ou de causarem a inibição do seu crescimento. Essa classe pode ser dividida entre aqueles que inibem a atividade das bactérias - antibióticos, dos fungos - antifúngicos, dos vírus - antiviral ou dos parasitas - antiparasitário. Os agentes antimicrobianos, no tratamento de doenças infecciosas, podem ser divididos entre aqueles obtidos de micro-organismos, chamados de antibióticos e os obtidos não naturalmente, apresentando compostos químicos sintéticos e semissintéticos, chamados de quimioterápicos [1]. Tais substâncias são largamente utilizadas como drogas para o tratamento de doenças causadas pelos patógenos citados acima.

O relato dos antimicrobianos, sem dúvidas, pode ser considerado um dos grandes marcos para o avanço da saúde pública, de forma a permitir a cura ou o controle de doenças infecciosas. Contudo, nas últimas décadas o avanço da resistência antimicrobiana (RAM) tem se mostrado um grande desafio no combate a doenças com raízes nesses micro-organismos. A Organização Mundial da Saúde descreve que a resistência antimicrobiana causa atualmente 700 mil mortes por ano a nível global. Hoje, a RAM já é considerada uma das maiores ameaças à saúde mundial e a longo prazo poderá fazer anualmente 10 milhões de vítimas no ano 2050 [2].

Toda a gravidade dessa questão tem alavancado cada vez mais a busca da comunidade científica por alternativas que consigam contornar essa problemática e, é nesse contexto que se inserem os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Peptídeos antimicrobianos são oligopeptídeos com um número de aminoácidos ao longo de sua cadeia que pode variar de 5 a mais de 100 substituintes, com uma ampla gama de organismos-alvos [3]. Essas moléculas podem ser encontradas na natureza, com ocorrência na mucosa de anfíbios, mamíferos e plantas [4], agindo de forma a otimizar o processo anti-inflamatório causado por eventuais micro-organismos.

Em anfíbios, essa forma de defesa ocorre - como a maioria dos processos fisiológicos desses animais - a partir da sua mucosa, por meio da produção de compostos bioativos que tem como função a proteção contra agentes patógenos como vírus, fungos e bactérias, o que contribui fortemente para a sobrevivência desses animais [5].

Yang, Lee e Zhang [6], descreveram o potencial antimicrobiano existente na pele de nove espécies de sapos nativos da China - *Odorous frogs* - a qual encontra-se diretamente exposta à diversas condições de sobrevivência, e que contém uma variedade de PAMs, o que permitiu o estudo dessas substâncias como potenciais antibióticos. Após a realização desse estudo, Yang, Lee e Zhang apontaram que alguns peptídeos purificados mostram forte atividade antimicrobiana, o que evidenciou o grande potencial para utilização como fármacos. Dentro desse experimento, encontra-se o peptídeo Andersonin-D1 que, apesar de não ter se mostrado um grande destaque no quesito atividade antimicrobiana, mostrou-se capaz de melhorar fracamente o lançamento de TNF- α induzido

por LPS, portanto criando espaço para o desenvolvimento de análogos de maneira a otimizar sua atividade antimicrobiana.

O mecanismo pelo qual o peptídeo bioativo utiliza, quando em contato com agentes patogênicos, não é de vasto conhecimento e apresenta divergências. Um de seus relatos é descrito através do rompimento da membrana – bicamada lipídica - dos micro-organismos a depender da concentração peptídica [7]. Izadpanah e Gallo [8] os descreveram como uma interação eletrostática entre as cargas catiônicas do peptídeo e a carga aniônica das membranas lipídicas dos micro-organismos a serem combatidos, o que infere na força com que essa interação deve ocorrer.

Tendo em vista o conceitual teórico apresentado, os peptídeos biologicamente ativos podem apresentar um interessante desempenho no combate a micro-organismos, e para além disso, terem as suas estruturas modificadas para que as interações mencionadas possam ser ainda mais exploradas, otimizando seu eventual mecanismo de ação.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este trabalho foi realizado como Iniciação Científica entre os anos de 2018 e 2019, o qual propôs a síntese, purificação, caracterização e testagem de novos peptídeos antimicrobianos contra diferentes agentes patológicos, tendo como base o PAM Andersonin-D1. Os análogos foram obtidos com a substituição de determinados aminoácidos pelo aminoácido lisina, de forma a acrescentar cargas positivas em posições pontuais da molécula, tanto na região hidrofílica como na hidrofóbica.

2.2 Específicos

A sequência do peptídeo nativo está apresentado a seguir com as posições de modificação sinalizadas por setas, sendo cada modificação um análogo sintetizado, Figura 1.

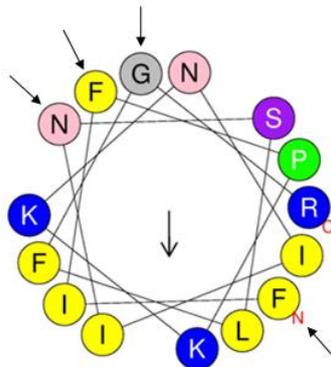


Figura 1. Projeção helicoidal do Andersonin-D1 com as alterações realizadas em destaque. Os aminoácidos representados pelas cores roxa e rosa apresentam resíduos hidrofílicos, aqueles representados pelas cores amarela, verde e cinza apresentam resíduos hidrofóbicos e aqueles com representação azul tem característica hidrofílica carregados positivamente (básicos). Sua hidrofobicidade, igual a 0,597 e seu momento hidrofóbico é igual a 0,320 e tem carga líquida igual a 3.

Foram realizadas as sínteses dos quatro análogos - apresentados na Tabela 1. As posições destacadas são aquelas nas quais ocorreram as alterações propostas, quando comparadas ao peptídeo nativo. Também estão apresentadas as correspondências para nomeação de todos os análogos de modo a ser utilizada ao longo do texto.

Tabela 1. Posições de modificações propostas aos análogos e nomeação para identificação.

Nº	Sequência	Peptídeo
I	F-I-F-P-K-K-N-I-I-N-S-L-F- K -R-NH ₂	[K] ¹⁴ - AD1- NH ₂
II	F-I- K -P-K-K-N-I-I-N-S-L-F-G-R-NH ₂	[K] ³ - AD1- NH ₂
III	F-I-F-P-K-K-N-I-I- K -S-L-F-G-R-NH ₂ -	[K] ¹⁰ - AD1- NH ₂
IV	K -I-F-P-K-K-N-I-I-N-S-L-F-G-R-NH ₂	[K] ¹ - AD1- NH ₂

Em todos os análogos, propôs-se a substituição por lisina, a qual se trata de um aminoácido hidrofílico e carregado positivamente. Em I e II a mudança proposta foi realizada substituindo aminoácidos hidrofóbicos sem carga, Glicina (G) e em IV, substituindo a Fenilalanina (F). Já em III, a troca ocorreu em um aminoácido hidrofílico e sem carga - a Asparagina (N) – logo, agregou-se carga positiva em todos os análogos propostos.

Após a realização da fase sintética do projeto, seguida de purificação e caracterização, foram realizados os estudos estruturais (conformacionais) e biológicos, tais quais antimicrobianos - com cepas de bactérias gram-negativas, ensaio hemolítico e de degradação enzimática.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados manualmente, pela estratégia Fmoc [9], com reações de aproximadamente 2 horas. Para a etapa de desproteção utilizou-se solução 20% de 4-metilpiperidina em DMF, por 40 minutos. Foram utilizados os agentes acopladores DIC/HOBt (N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol em diclorometano / dimetilformamida (DCM / DMF) (1:1, v/v), cujos acoplamentos foram monitorados pelo teste de Kaiser [10]. Em caso de acoplamentos incompletos, utilizou-se os agentes N, N-Diisopropiletilamina / tetrafluorborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurânio (DIPEA / TBTU) em dimetilsulfóxido / metilpirrolidona (DMSO / NMP) (1:1, v/v) nas etapas de reacoplamentos, com o controle de pH entre 8 e 9, sendo essas etapas também monitoradas pelo teste de Kaiser [10]. Para todos os análogos, utilizou-se a resina Rink Amide MBHA como suporte sólido, sendo a escala utilizada de 0,4 mmol.

Os peptídeos foram clivados da resina em uma reação de 2 horas com uma solução de 90% de TFA (Ácido trifluoroacético) / 5% Água e 5% de anisol, totalizando uma concentração de (10 mL/g

de peptidil-resina). Ao término da reação, os peptídeos e as resinas foram tratados com éter dietílico gelado, sendo então os peptídeos extraídos da resina com uma solução 0,1% TFA em 60% de ACN (Acetonitrila) / H₂O, sendo o material peptídico em seguida congelado e liofilizado.

3.2 Purificação dos peptídeos

As etapas de purificação dos peptídeos foram realizadas em um sistema de cromatografia semi-preparativo da Waters – Mod. Delta Prep 600, acoplado a um detector UV-Vis, que é controlado por um software Empower Persona Single System Workstation.

Os solventes utilizados foram todos de grau HPLC e a água utilizada foi obtida em um sistema de ultrapurificação de água da Elga / Veolia – Modelo Option Q7. As purificações foram realizadas utilizando-se uma coluna C₁₈ (25x250 mm), 300 Å, 15 µm.

Sistemas de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O e B: 90% ACN em água; gradiente variável: 0,33%B/min; fluxo: 10 mL/min e λ: 220 nm.

3.3 Caracterização dos peptídeos

3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A obtenção dos cromatogramas foi realizada em um sistema Waters, constituído por um módulo de separação Alliance – mod. 2695, detector UV-Vis – mod. 2489; detector de fluorescência – mod. 2475 e injetor automático com capacidade de 120 amostras. O sistema é controlado por um software Empower Persona Single System Workstation.

Os peptídeos foram analisados em uma concentração de 1 mg mL⁻¹, utilizando-se coluna C₁₈ (4,6 x 150 mm), 300 Å, 5 µm; sistemas de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O e B: 75 ou 90% ACN em A; gradiente variável: 1%B/min; fluxo: 10 mL min⁻¹ e λ: 220 nm.

3.3.2 Espectrometria de massas (LC/ESI-MS/MS)

Os espectros de massas foram obtidos em um sistema LC/ESI-MS Agilent, constituído por um módulo de separação Agilent Technologies – mod. 1260 Infinity, detector UV-Vis – mod. 1260 Infinity, injetor automático com capacidade de 100 amostras e um espectrômetro de massas Agilent Technologies, modelo 6130. O sistema é controlado por uma workstation OpenLab modelo 6130B.

Os peptídeos foram dissolvidos em solvente A, na concentração de 1 mg mL⁻¹. As condições aplicadas foram: coluna Phenomenex C₁₈ (2 x 150mm), 4µm, solventes A: 0,1% TFA/H₂O e B: 0,1% TFA em 90% ACN/H₂O, gradiente: 5% a 95% de B em 20, fluxo: 0,4 mL min⁻¹, comprimento de onda: 190-300 nm, intervalo de massas: 100-2500 Daltons, energia do íon: 5,0 V, fluxo de gás nitrogênio: 12 L min⁻¹, aquecedor do solvente: 250 °C, pressão no nebulizador: 35 psig, multiplicador: 1.0, voltagem no capilar: 3,0 kV, voltagem no cone: 35 V.

3.4 Conteúdo peptídico

O conteúdo peptídico foi determinado a partir da porcentagem de peptídeo presente na amostra liofilizada. Para tal, o material liofilizado foi dissolvido em água deionizada para a concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Foi utilizado o equipamento espectrofotômetro Nanodrop 2000 UV-Vis, da Thermo Scientific para realizar os ensaios por espectrofotometria no UV-Vis, utilizando as medidas de absorvância em 205 e 260 nm. Posteriormente, a concentração de peptídeo na amostra foi determinada a partir da Lei de Lambert-Beer e a concentração real de peptídeo em 1,0 mg mL⁻¹ de material foi determinada.

3.5 Dicroísmo circular

Para este ensaio, foi utilizado um espectropolarímetro Jasco, modelo J-815. Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos na faixa de 195 – 260 nm, depois de 4 acumulações a 20°C utilizando uma cela retangular de quartzo, com caminho óptico de 1,0 mm, em 100 nm min⁻¹ com uma largura de banda de 0,5 nm. Os peptídeos foram analisados nas seguintes condições: água, tampão fosfato salino (PBS – pH 7,4 – 15 mmol L⁻¹), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) em água (60%) e dodecil sulfato de sódio (SDS – 20 mmol L⁻¹). A concentração de peptídeo foi de 50 µmol L⁻¹. O espectro de dicroísmo circular foi subtraído e um filtro de transformada de Fourier (FFY) foi aplicado, para minimizar os efeitos de fundo.

3.6 Ensaio biológicos

3.6.1 Antimicrobianos

A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi testada em cepas de *Escherichia coli* SBS 363, *E. coli* BL21, *Enterobacter cloacae* β12, *P. aeruginosa* HER-1018 PA01 e *P. aeruginosa* UCBPP-PA14. Os micro-organismos foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC), do Instituto Butantan, e de isolados clínicos da coleção do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

A atividade antimicrobiana foi determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (BULET et al., 1993) [11], utilizando o meio pobre em nutrientes em concentração baixa de sal Peptona (PB, 0,5% NaCl, 1% Peptona em pH 7,4) para bactérias. Bactérias foram incubadas e mantidas sob agitação constante com diluições seriadas dos peptídeos (50 – 0,1 µmol L⁻¹ em uma microplaca de 96 poços à 37° C, durante 18 h). O crescimento bacteriano foi determinado pela medida de absorvância das culturas em 595 nm, em um leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan Go. Utilizou-se como controle negativo água e como controle positivo uma solução de antibióticos: penicilina e estreptomicina. A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada como a

concentração que impede em 100% o crescimento microbiano. Para tal, os ensaios foram realizados em triplicata.

Estes ensaios foram desenvolvidos em colaboração com a Prof^a. Dra. Fernanda Dias da Silva do Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) – UFABC.

3.6.2 Ensaio de degradação enzimática

O ensaio de estabilidade dos peptídeos foi realizado utilizando-se soro fetal bovino, o qual foi diluído em 25% em água deionizada. O ensaio foi estabelecido adicionando-se 20 μL da solução do peptídeo (2 mg $200 \mu\text{L}^{-1}$) a 1 mL da solução 25% de soro. A reação foi mantida sob agitação a 37°C , sendo coletadas alíquotas de 100 μL nos intervalos de 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas. Aos 100 μL coletados foram adicionados 10 μL de TFA, sendo esta solução mantida a 0°C por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos, de acordo com Powell e Col. [12].

A cinética foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência, injetando-se 30 μL do sobrenadante em três réplicas. O percentual de peptídeo remanescente, durante a cinética de degradação, foi calculado através da integração da área do pico correspondente ao peptídeo em estudo. Para tal, o experimento foi realizado em triplicata.

3.6.3 Teste hemolítico

A atividade hemolítica das amostras foi testada contra eritrócitos humanos em microplaca de 96 poços com fundo em “U”. Foi obtido sangue do banco de sangue do Hospital Universitário do Instituto Butantan, e foi coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4) e centrifugado por 15 minutos a 800 xg. Em seguida foi lavado três vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,76 mM; pH 7,4). A amostra foi diluída em 40 μL de PBS e testada em triplicata adicionando-se mais 50 μL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos em PBS. A microplaca foi incubada a 37°C por 1 hora e em seguida foi retirado seu sobrenadante e transferido para uma microplaca de fundo chato e feita a medida de absorbância a = 414 nm em um leitor de microplaca. As medidas de absorbância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 50 μL da solução 3% de hemácias em 50 μL de PBS e Triton X-100 0,1%, respectivamente. O valor da absorbância a 414 nm das hemácias em PBS e Triton X-100 0,1% foi determinado pela média em triplicata (modificado de Hao et al., 2009) [13].

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Pedro Ismael da Silva Junior do Laboratório Especial de Toxicologia Aplicada (LETA) – Butantan.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de peptídeos

Esta etapa consistiu no crescimento do peptídeo, a partir de um suporte sólido de resina styrene-1 % DVB, Figura 2, a qual apresenta a característica de ser insolúvel nos solventes utilizados para lavagem durante a síntese. De maneira a reter todo o conteúdo do material sintetizado – e a resina, durante o crescimento da cadeia, utilizou-se frascos com placas porosas filtrantes, e dessa forma, o processo sintético ocorreu em um só frasco de reação, o qual só havia possibilidade de saída dos solventes.

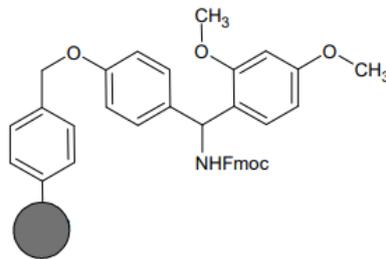


Figura 2. Estrutura da Rink Amide utilizada como suporte sólido durante a etapa de síntese.

Os aminoácidos são moléculas que apresentam um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono, chamado de carbono α [14] e, portanto, apresentam dois sítios de reação. A quimiosseletividade descreve a preferência pela reação a um único grupo protetor, quando uma espécie apresenta mais do que um sítio ativo para ligar-se a outra espécie, que é o caso dos aminoácidos, com seus grupos amino e carboxila, Figura 3. Quando embora, há em uma única estrutura mais do que um grupo funcional, e ainda assim espera-se que a reação siga por um único grupo, faz-se comumente o uso de grupos protetores [15]. Neste caso, o grupo Fmoc (fluorometiloxicarbonila) será utilizado com essa função, Figura 4.

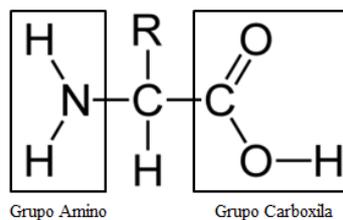


Figura 3. Estrutura básica dos aminoácidos.

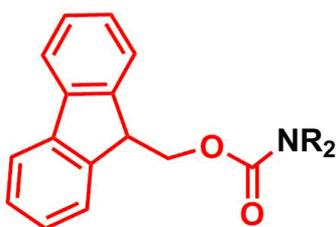


Figura 4. Estrutura química do grupo protetor fluorometiloxicarbonila (Fmoc).

A partir do uso da estratégia Fmoc, a síntese se deu através da ligação do último aminoácido Fmoc - da esquerda para a direita na sequência – à resina utilizada como suporte, Figura 5a, por meio do grupo funcional carboxila desprotegido. Uma vez acoplado à resina, o aminoácido Fmoc sofre desproteção, ou seja, através da reação com a solução de 20% de 4-metilpiperidina em DMF o grupo Fmoc é retirado da estrutura (Figura 5b), para que se desse prosseguimento na entrada do próximo aminoácido protegido em sequência. Em seguida, ocorre o acoplamento via DIC (diisopropilcarbodiimida) e HOBt (N-hidroxibenzotriazol), que atuam conjuntamente de maneira a aumentar o rendimento reacional, Figura 5c.

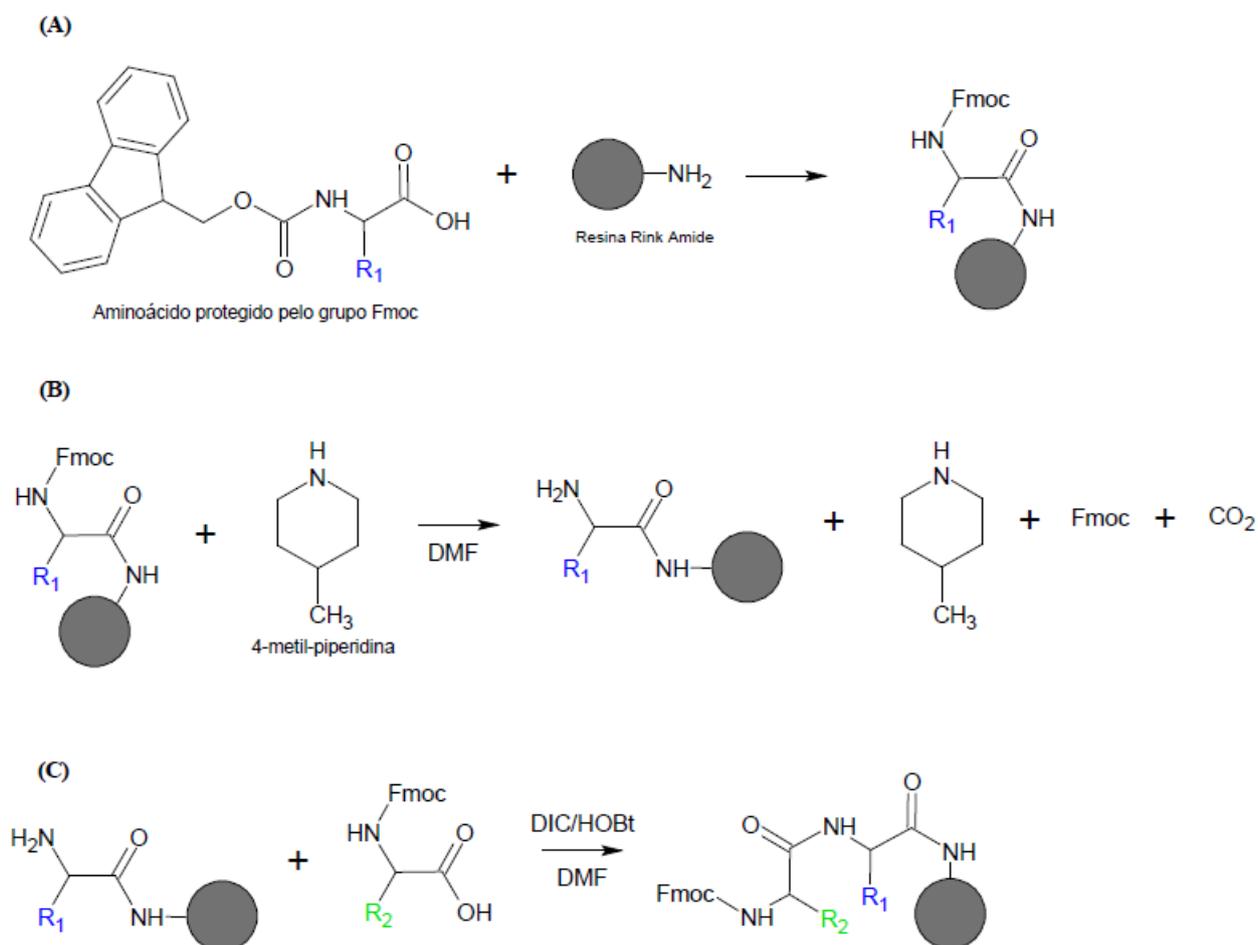


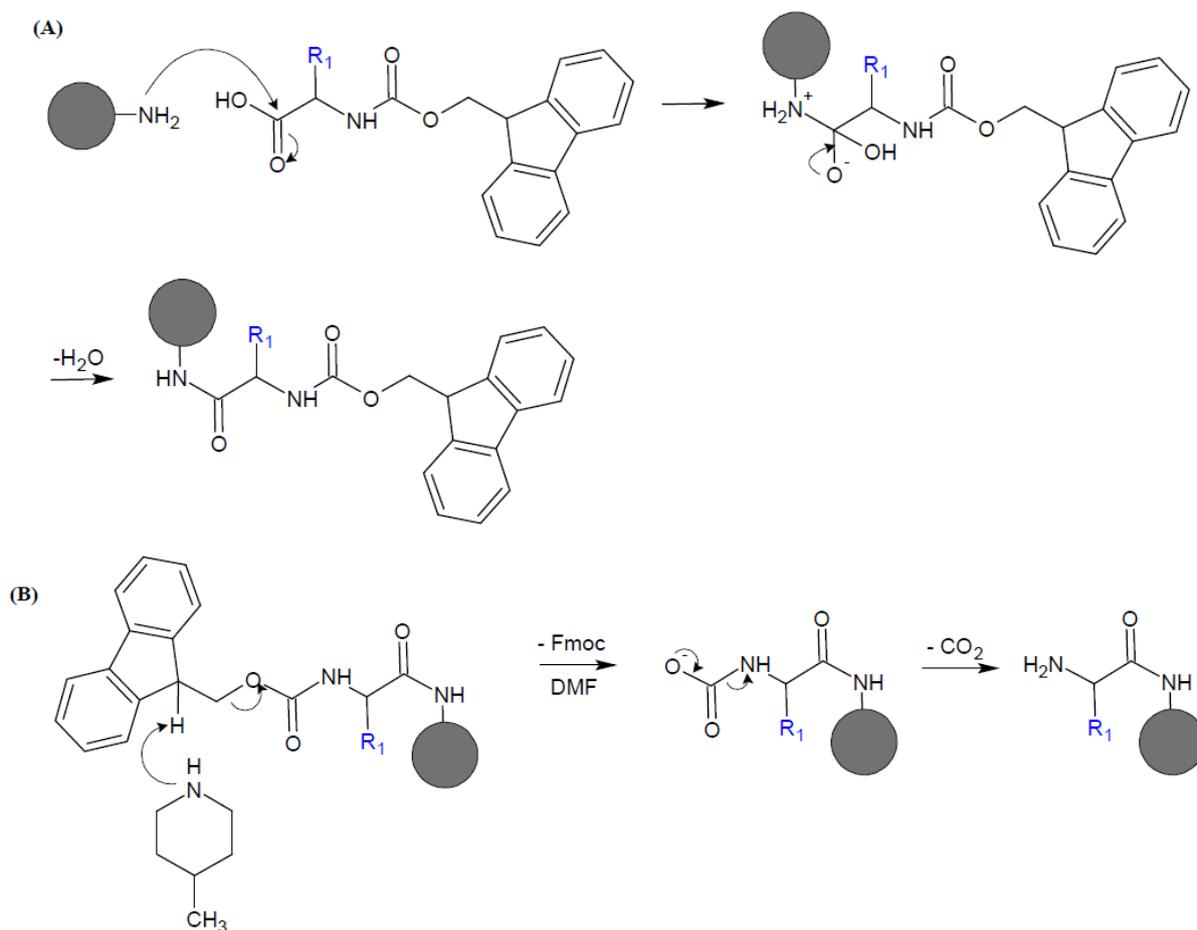
Figura 5. Reações relacionadas à etapa sintética do peptídeo. (a) Ancoramento do primeiro aminoácido protegido pelo grupo Fmoc à resina Rink Amide; (b) Desproteção do grupo Fmoc e (c) Reação de acoplamento na presença de DIC e HOBt.

Durante a primeira etapa de síntese em fase sólida, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons presente na molécula (ligada à resina) ao grupo carbonila da molécula do primeiro aminoácido a ser ancorado. Dessa maneira, ocorre a quebra da ligação dupla antes estabelecida entre carbono e oxigênio da carbonila, que se torna carregado negativamente, enquanto a amida formada, apresenta carga parcial positiva no nitrogênio. Uma vez reestabelecida a dupla ligação do oxigênio da carbonila, forma-se o primeiro resíduo do peptídeo, com a liberação de uma molécula de água - vide Figura 6a.

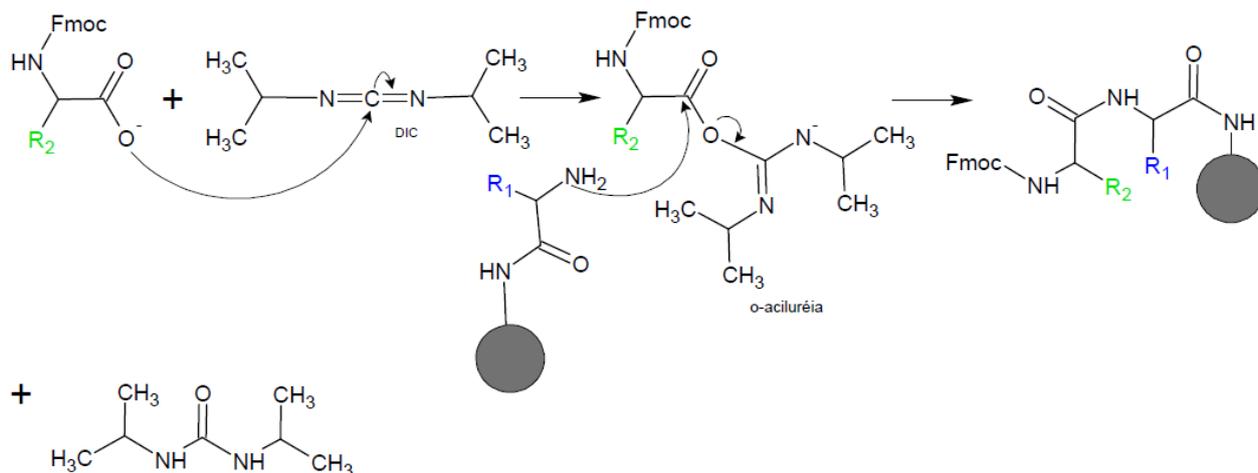
Em seguida, ocorre a desproteção do grupo Fmoc, utilizando 4-metil-piperidina em DMF, devido à labilidade por bases do grupo Fmoc, agindo de forma a abstrair o hidrogênio ácido presente no grupo, Figura 6b.

Na Figura 6c, estão representados os mecanismos de reação de acoplamento com DIC e HOBt, sendo o DIC atacado nucleofiticamente pelo par de elétrons do oxigênio da carbonila ao carbono carbodiimida do DIC, gerando o intermediário o-aciluréia, que tem o seu carbono da carbonila atacado pelo par de elétrons do nitrogênio do aminoácido já ancorado na resina, rompendo a ligação com o oxigênio e por fim, formando a ligação peptídica.

Para fins de rendimento de reação, o HOBt tem a função de reagir com o intermediário o-aciluréia, de modo a formar um novo acoplamento e a regeneração do HOBt.



(C) DIC



(C) HOBT

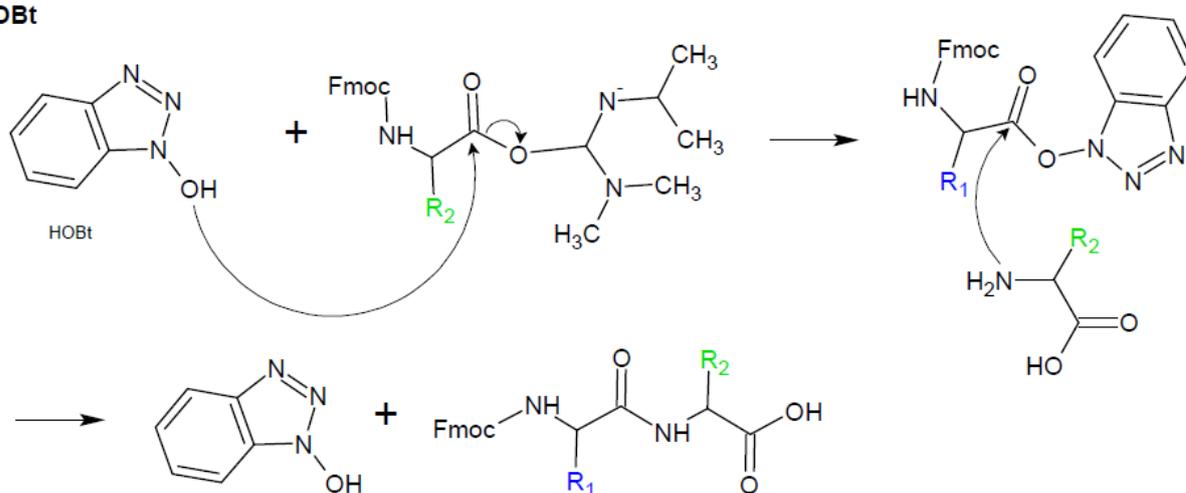


Figura 6. Mecanismos de reação relacionados à etapa sintética do peptídeo. (a) Ancoramento do primeiro aminoácido protegido pelo grupo Fmoc à resina Rink Amide; (b) Desproteção do grupo Fmoc e (c) Reação de acoplamento na presença de DIC e HOBT.

Após o acoplamento de todos os resíduos da sequência desejada, a etapa seguinte tratou de clivar o peptídeo sintetizado da resina, que em seguida foi precipitado utilizando éter etílico gelado e por fim foi extraído com TFA/ACN em água, para serem posteriormente congelados e enfim transformados em pó após liofilização.

4.2 Purificação de peptídeos

Na etapa de purificação utilizou-se de um gradiente de purificação de 5-95% de solução B (90% acetonitrila em água) no sistema de cromatografia preparativo da Waters – Mod. Delta Prep 600, acoplado a um detector UV-Vis, com descrição na Tabela 2.

Tabela 2. Condições e rendimentos dos peptídeos sintetizados.

Análogo	HPLC analítico			HPLC semi-preparativo	
	Massa do Peptídeo análogo Bruto (g)	Gradiente da Caracterização	Tempo de Retenção (min)	Gradiente da Purificação	Massa de peptídeo purificado (mg)
[K] ¹⁴ -AD1-NH ₂	NA	5-95% B em 20 min	11,6	20-50% em 90 min	205,2
[K] ³ -AD1-NH ₂	0,56	5-95% B em 20 min	10,3	20-50% em 90 min	95,5
[K] ¹⁰ -AD1-NH ₂	NA	5-95% B em 20 min	11,9	20-50% em 90 min	122,2
[K] ¹ -AD1-NH ₂	0,3	5-95% B em 20 min	11,2	20-50% em 90 min	149,7

NA (não aplicável): não foi possível obter as massas dos peptídeos [K]¹⁴-AD1-NH₂ e [K]¹⁰-AD1-NH₂ quando brutos, pois o liofilizador apresentou falhas de funcionamento transformando o material com aspecto pouco sólido.

Os próximos testes exigem que os materiais testados estejam em alto grau de pureza, uma vez que a bioatividade dos peptídeos será testada e a existência de qualquer interferente poderia causar interpretações errôneas com relação ao peptídeo estudado.

Anteriormente à realização da purificação, obtém-se o cromatograma do peptídeo bruto, que indica a quantidade de contaminantes presentes na amostra, além do tempo de retenção do material e contaminantes na coluna. Na Figura 5 é possível observar o cromatograma correspondente ao peptídeo [K]¹-AD1-NH₂ bruto, tendo como pico principal o material desejado com 81,8% de área, os iniciais da esquerda para direita como pico de injeção e cerca de cinco contaminantes nos tempos 9,4 min, 10,0 min, 10,6 min, 11,0 min e em 11,5 min.

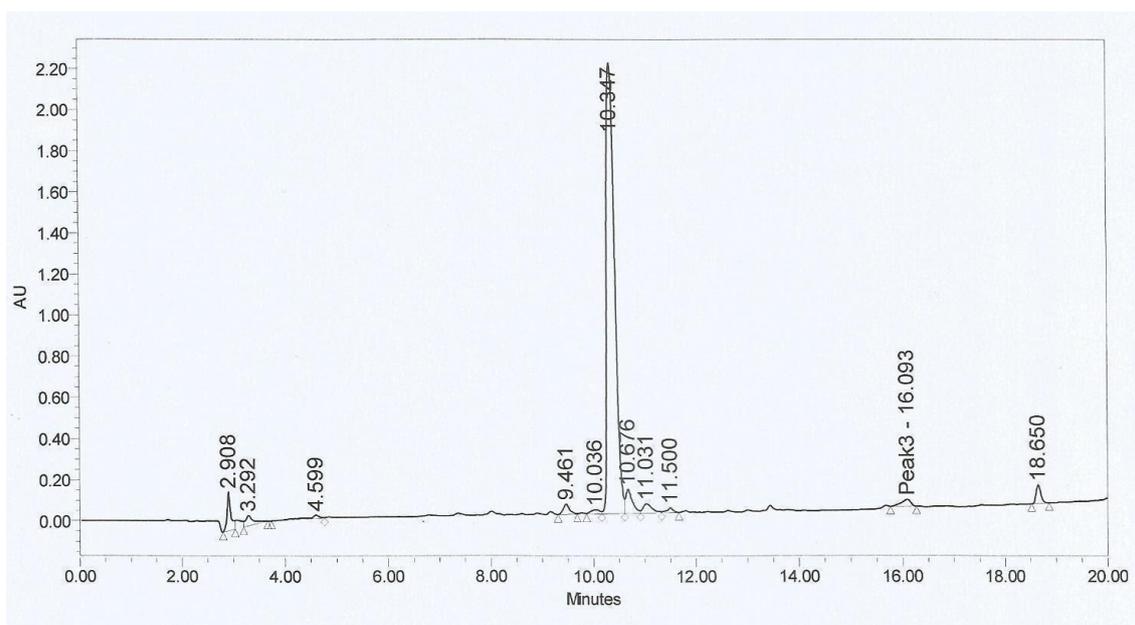


Figura 7. Cromatograma do peptídeo bruto [K]¹-AD1-NH₂. Os perfis em LC/ESI-MS foram obtidos nas seguintes condições: Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3,5 µm; Sistema de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O, B: 0,1% TFA em 60% ACN/H₂O; Gradiente: 5-95% de B em 20 minutos; Fluxo: 0,4 mL min⁻¹; λ = 190-300 nm; Volume de injeção: 30 µL; Concentração da amostra: 1,0 mg mL⁻¹.

A seguir os resultados do ESI/MS (DAD e Scan de massas) e ESI/MS (espectro) correspondente ao peptídeo $[K]^1$ -AD1-NH₂ bruto são apresentados na Figura 6 e Figura 7 consecutivamente.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)

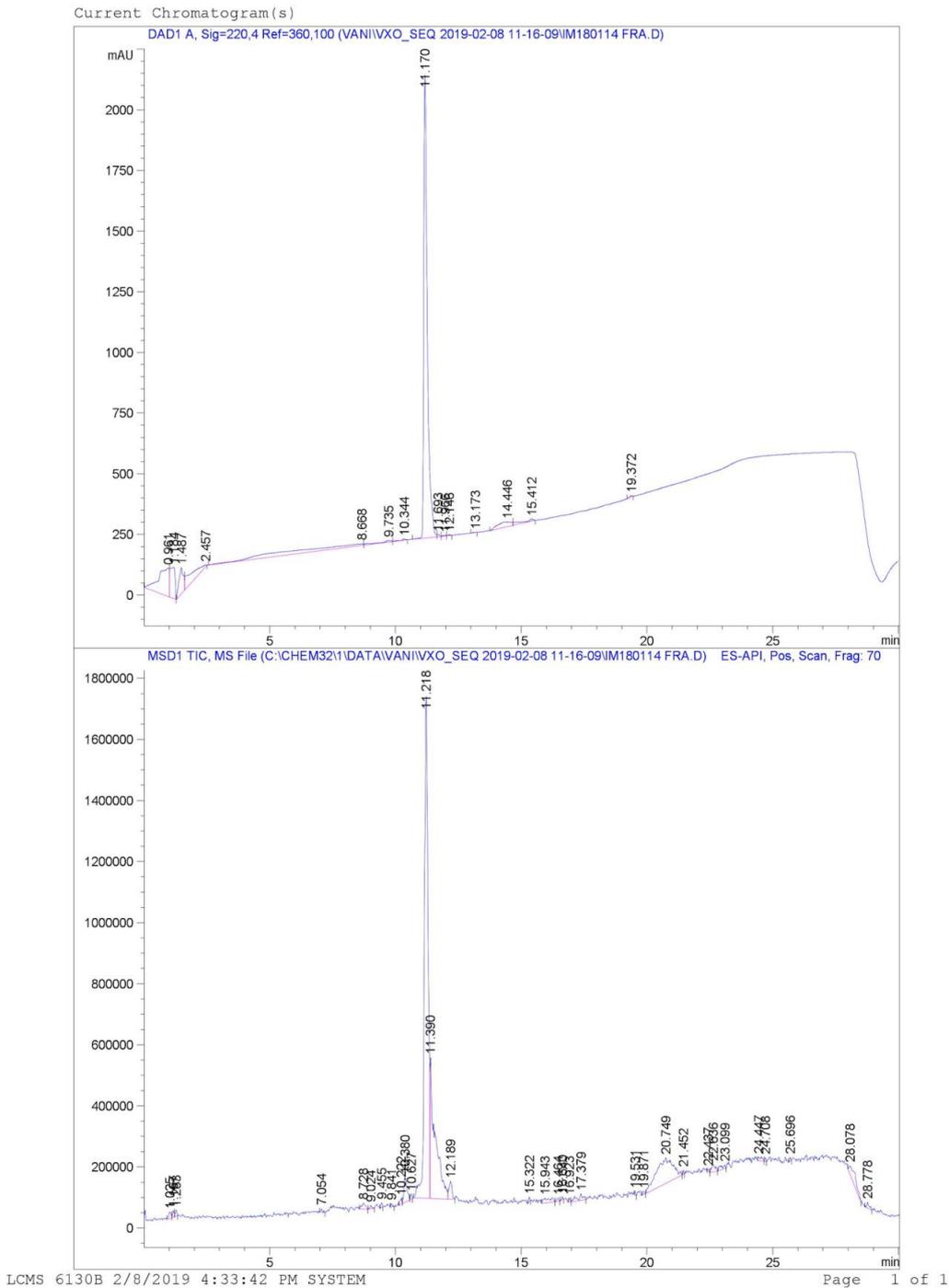


Figura 8. (1) Cromatograma do análogo $[K]^1$ -AD1-NH₂ purificado e (2) Scan de massas. Os perfis em LC/ESI-MS foram obtidos nas seguintes condições: Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3,5 µm; Sistema de solventes: A: 0,1% TFA/H₂O, B: 0,1% TFA em 60% ACN/H₂O; Gradiente: 5-95% de B em 30 minutos; Fluxo: 0,4 mL/min; λ = 190-300 nm; Volume de injeção: 30 µL; Concentração da amostra: 1,0 mg/mL e Intervalo de massas: 200 – 2000 Daltons.

Print of window 80: MS Spectrum

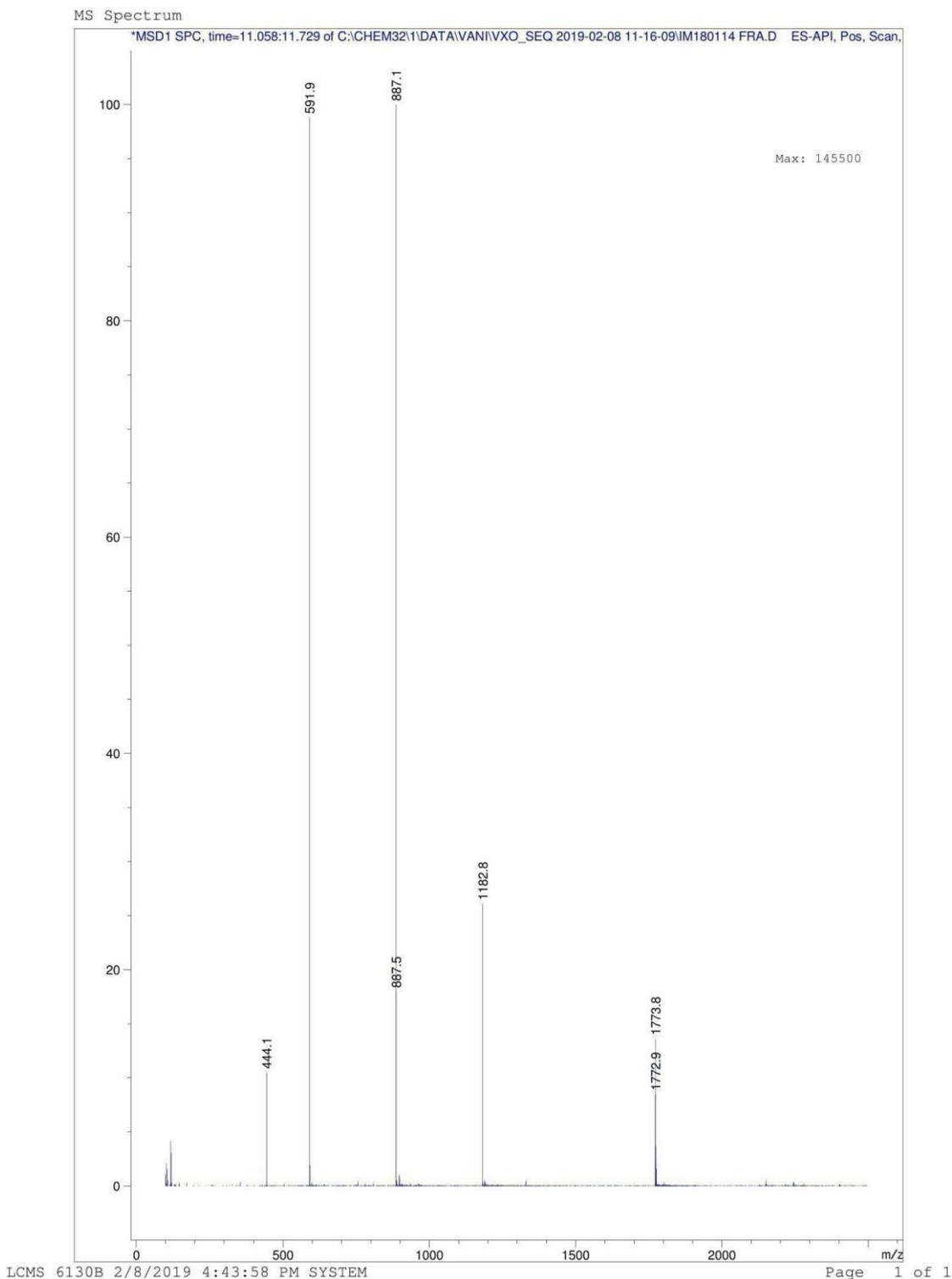


Figura 9. Espectro de massas do análogo [K]¹-AD1-NH₂ purificado, obtido no tempo de 11,2 minutos.

4.3 Caracterização dos peptídeos

A caracterização dos peptídeos foi realizada por HPLC analítico e por Espectrometria de Massas (LC/ESI-MS). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na caracterização de todos os

análogos sintetizados de fração A - porção do material considerado em seu maior grau de pureza. Para todos os ensaios realizados posteriormente foram utilizados os peptídeos nessa fração.

Tabela 3. Dados de caracterização dos análogos.

Análogo	Pureza HPLC (%)	Massa molecular (Da)	(M+H⁺)
[K] ¹⁴ -AD1-NH ₂	99,47	1863,12	1864,2
[K] ³ -AD1-NH ₂	95,44	1773,08	1774,1
[K] ¹⁰ -AD1-NH ₂	99,74	1806,1	1806,8
[K] ¹ -AD1-NH ₂	99,29	1773,08	1773,8

4.4 Conteúdo peptídico

A partir das medidas de absorvância nos comprimentos de onda de 205 e 260 nm utilizando a Lei de Lambert-Beer (descrito com mais detalhes na metodologia) foi possível determinar a concentração real de peptídeo em 1 mg mL⁻¹. Os valores do Conteúdo Peptídico (CP) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações peptídicas em mg mL⁻¹ e o respectivo Conteúdo Peptídico

Análogo	Concentração (mg mL⁻¹)	Conteúdo Peptídico
[K] ¹⁴ -AD1-NH ₂	0,6186	62%
[K] ³ -AD1-NH ₂	0,5221	52%
[K] ¹⁰ -AD1-NH ₂	0,6879	69%
[K] ¹ -AD1-NH ₂	0,6714	67%

4.5 Dicroísmo Circular

A tendência conformacional dos análogos foi estudada através do dicroísmo circular em quatro distintos meios, como descrito na metodologia. Seus comportamentos obtidos graficamente puderam ser comparados com o estudo realizado por (Berndt, 1996) [16] que descreve o comportamento estrutural de substâncias puras de conformação secundária. Os espectros obtidos estão apresentados a seguir na Figura 10.

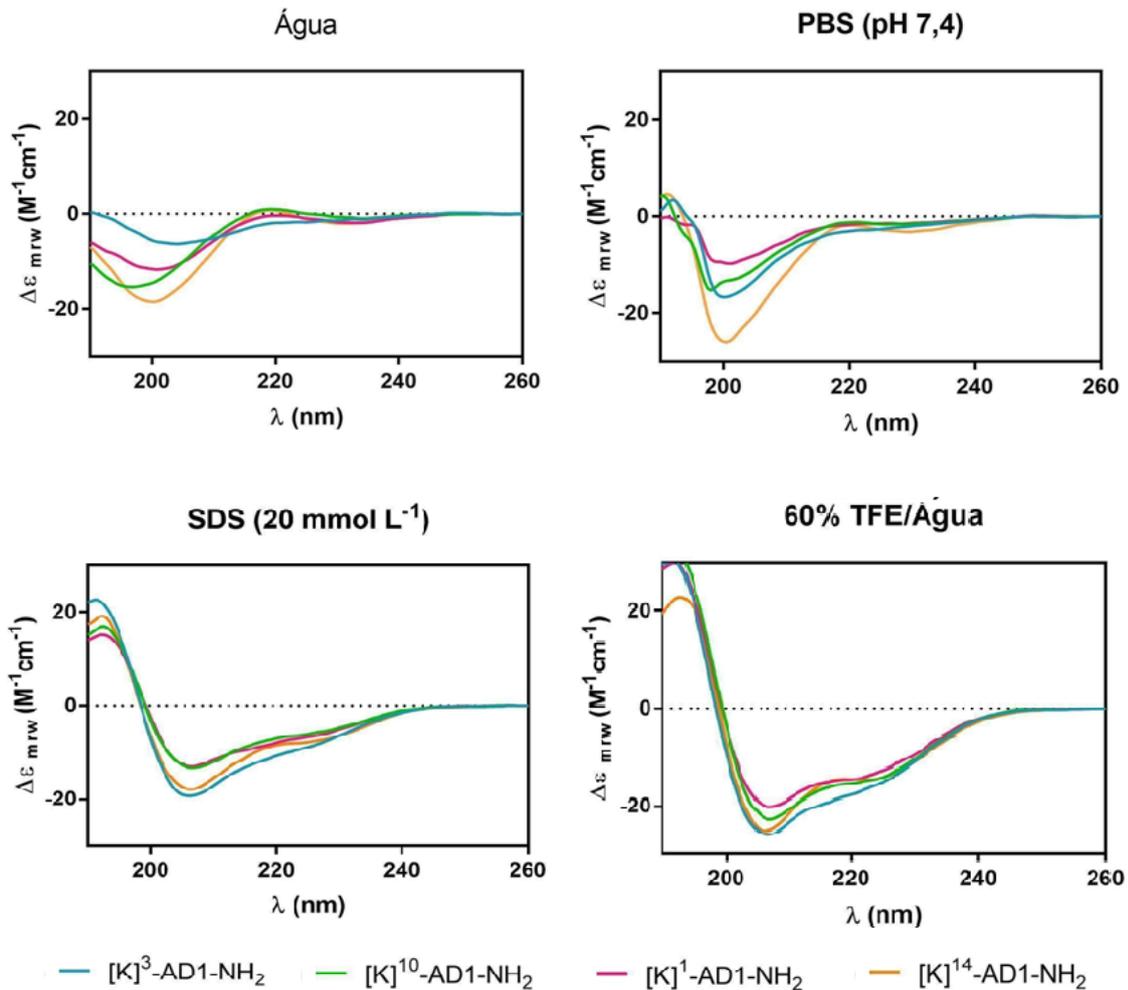


Figura 10. Espectroscopia de dicroísmo circular dos análogos em água, em tampão fosfato salino - PBS (pH 7,4), em dodecil sulfato de sódio (SDS) e em 60% 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)/Água.

Com relação aos comportamentos dos peptídeos na presença de água, foi evidenciada a tendência de não formação de estruturas secundárias conhecidas, Figura 10, assemelhando-se às estruturas denominadas “outras” no trabalho de Berndt [16]. Os análogos na presença de tampão fosfato salino também apresentaram aspectos mais randômicos, contudo ligeiramente mais estruturados que em água, destacando os análogos $[K]^1$ -AD1-NH₂. No meio contendo dodecil sulfato de sódio houve uma tendência à estruturação em alfa-hélice, em especial com o análogo $[K]^3$ -AD1-NH₂. Os análogos também mostraram um comportamento de alfa-hélice em 60% 2,2,2-trifluoroetanol/Água, no qual todos os análogos apresentaram resultado similar.

A seguir, na Tabela 5, serão apresentados os valores calculados de frações helicoidais, pelo método de Lifson-Roig [17] para todos os análogos em todos os meios aos quais foram submetidos.

Tabela 5. Frações helicoidais (f_H) em água, PBS, SDS e 60% TFE.

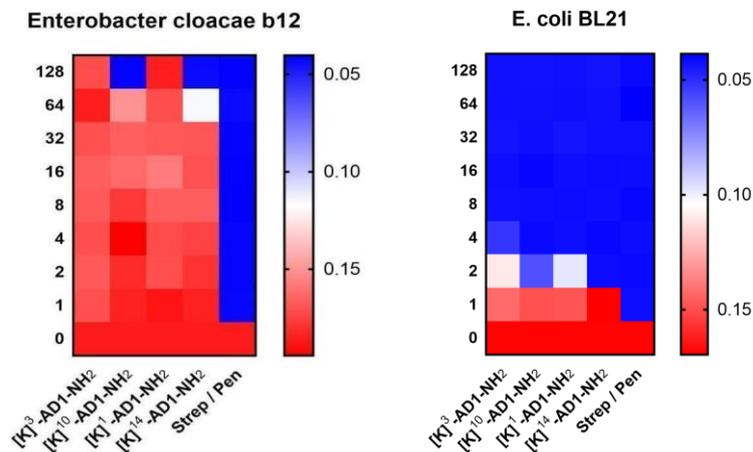
Análogo	f_H em água	f_H em PBS	f_H em SDS	f_H em 60% TFE/Água
[K] ¹⁴ -AD1-NH ₂	0,01	0,12	0,39	0,70
[K] ³ -AD1-NH ₂	0,11	0,14	0,47	0,79
[K] ¹⁰ -AD1-NH ₂	0	0,07	0,31	0,71
[K] ¹ -AD1-NH ₂	0,04	0,09	0,35	0,67

Os valores encontrados de fração helicoidal (f_H) sustentaram os resultados obtidos comparados com o resultado literário, reforçando a conformação alfa-hélice mais acentuada nos meios SDS e 60% TFE para todos os peptídeos, sendo que o que mais apresentou esta conformação foi o [K]³-AD1-NH₂, em todos os quatro meios, sendo 79% em 60% TFE.

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Antimicrobianos

Nesta etapa, foram utilizadas quatro cepas de bactérias gram-negativas: *Enterobacter cloacae* β 12, *Escherichia coli* BL21, *Pseudomonas aeruginosa* HER-1018 (PA01) e *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. A Figura 11 mostra os resultados obtidos de todos os análogos na presença das quatro bactérias.



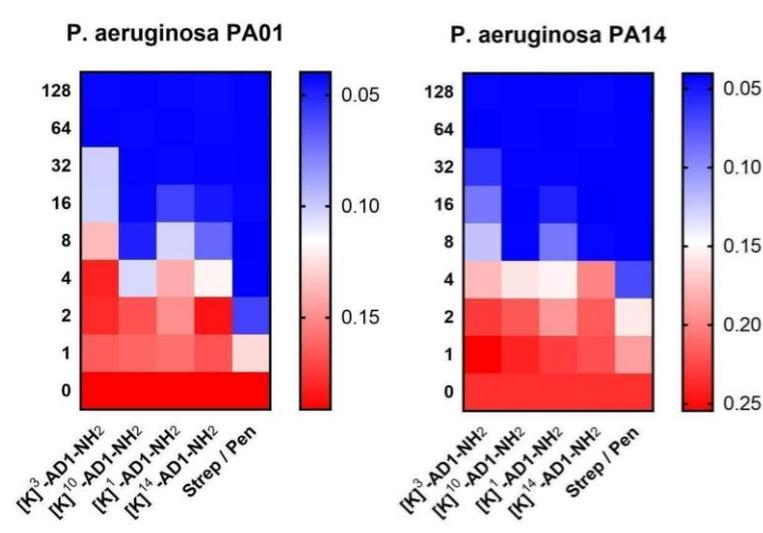


Figura 11. Atividade biológica *in vitro* do AD1-NH₂ e análogos, medida em leitor de microplacas (595 nm) para verificar a inibição de bactérias em comparação ao controle e apresentados como mapas de calor de atividades antimicrobianas ($\mu\text{mol L}^{-1}$) contra as cepas de *E. cloacae*, *Escherichia coli* BL21, *Pseudomonas aeruginosa* HER-1018 e *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14.

A utilização dos peptídeos com o objetivo de inibir o crescimento da bactéria *Enterobacter cloacae* β 12 não obteve sucesso para os análogos [K]³-AD1-NH₂ e [K]¹-AD1-NH₂, uma vez que em todas as concentrações de peptídeos utilizadas não houve inibição do crescimento da mesma. Já para os análogos [K]¹⁰-AD1-NH₂ e [K]¹⁴-AD1-NH₂ houve inibição, apenas na concentração de 128 μM , vide Figura 11.

Para a *Escherichia coli* BL21, na presença dos peptídeos, os resultados foram bastante positivos. O análogo [K]¹⁴-AD1-NH₂ inibiu o crescimento com concentração peptídica de 2 a 4 μM . O [K]¹-AD1-NH₂ foi ativo contra a bactéria a partir de 4 μM , assim como o [K]¹⁰-AD1-NH₂ e [K]³-AD1-NH₂ que apresentaram atividade moderada com 2 μM de peptídeo. Foram todos inativos a 1 μM de concentração.

Nos resultados obtidos da *Pseudomonas aeruginosa* HER-1018, na presença dos análogos, todos os peptídeos foram ativos nas concentrações de 64 e 128 μM . O melhor análogo nesta análise foi o [K]¹⁰-AD1-NH₂ nas concentrações de 8 a 128 μM de peptídeo. E o menos ativo, mas ainda com atividade nas maiores concentrações foi o análogo [K]³-AD1-NH₂.

Para a *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 nenhum peptídeo foi ativo de 1 a 4 μM de concentração. O análogo [K]³-AD1-NH₂ foi o que apresentou menor atividade, com inibição de 16 a 64 μM . De 8 a 128 μM todos os análogos foram ativos, inibindo o crescimento dessa bactéria.

4.6.2 Degradação enzimática

Este ensaio foi realizado no intuito de verificar a viabilidade da utilização das características biológicas estudadas nos peptídeos do presente trabalho, sendo os resultados apresentados na Figura 12.

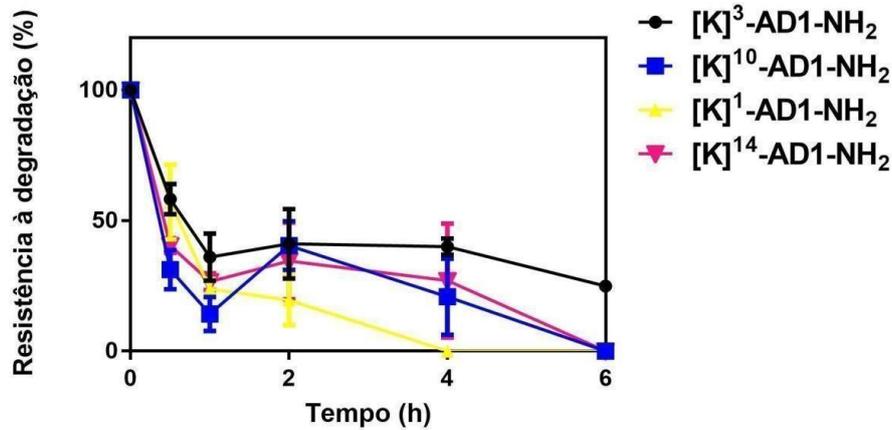


Figura 12. Resistência à degradação enzimática dos análogos do AD1-NH₂.

O análogo [K]³-AD1-NH₂ foi o peptídeo que mais resistiu à degradação com 40% de integridade em 4h e 25% de integridade em 6h, seguido do [K]¹⁴-AD1-NH₂ e do [K]¹⁰-AD1-NH₂. O peptídeo [K]¹-AD1-NH₂ apresentou a menor resistência à degradação, com a menor integridade em entre os demais análogos em 2h, correspondente a 20%.

4.6.3 Teste hemolítico

Esta etapa buscou entender o comportamento dos análogos sintetizados na presença de células sanguíneas, tendo seus resultados discutidos em mais detalhes a seguir. A Figura 13 apresentada - em mapa de calor - evidencia que não houve a quebra dos eritrócitos na presença de nenhum dos peptídeos análogos presentes no atual projeto, portanto nenhum dos peptídeos análogos são hemolíticos.

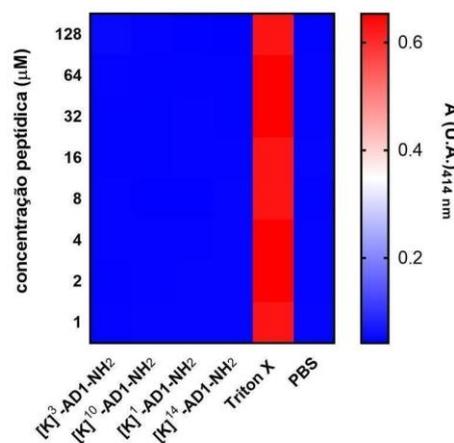


Figura 13. Ensaio da atividade hemolítica in vitro dos análogos do AD1-NH₂ apresentados como mapas de calor (µmol L⁻¹).

A placa de poços com fundo em forma de “U” contendo os peptídeos análogos em eritrócito humano e os controles positivos e negativos utilizados para análise, sendo o positivo o Triton X e o negativo o tampão fosfato salino (PBS). Foi possível observar que para todos os análogos, a aparência da amostra permaneceu a mesma do controle negativo; ou seja, não houve degradação das células sanguíneas. Em seguida, os sobrenadantes presentes nos poços foram pipetados e transferidos para outra placa, dessa vez de fundo chato, para a medida da absorbância para posterior tratamento de dados.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou diversos resultados positivos e promissores a serem mais profundamente estudados. Não foi possível realizar a comparação dos análogos propostos com o peptídeo original - encontrado na natureza, sendo possível apenas a comparação do desempenho dos análogos entre si. Contudo, estudos estão sendo realizados para possibilitar tal comparação.

A etapa sintética, em especial a síntese manual desempenhou um papel de extrema importância neste estudo, pois possibilitou maior conhecimento do comportamento da molécula através dos acoplamentos e impedimentos encontrados na estrutura, de modo que as regiões críticas do peptídeo se tornaram conhecidas e assim auxiliando em futuras sínteses.

As etapas de caracterização e purificação foram imprescindíveis para que os testes biológicos e estruturais pudessem ser realizados, pois exigem elevada pureza dos compostos. O ensaio de dicroísmo circular mostrou que os análogos apresentam conformação secundária de alfa-hélice nos meios testados em SDS e TFE, sendo que em água e PBS apresentaram conformações aleatórias. O análogo que mais destacou-se nesse ensaio foi o [K]³-AD1-NH₂ que apresentou 79% de fração helicoidal em solução contendo 60% de TFE, apesar de desempenho semelhante entre os meios testados.

Com relação à atividade biológica testada, os peptídeos mostraram-se bastante promissores, ao passo que alguns apresentaram resposta semelhante aos controles utilizados (antibióticos comerciais), ou foram ativos na maioria das concentrações peptídicas testadas; apresentando baixa atividade apenas contra a *Enterobacter cloacae*. Todos os análogos mostraram atividade contra a *Escherichia coli* entre 2 e 4 µM, ou seja, na concentração mínima inibitória. Na presença das duas cepas da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, o análogo menos ativo foi o [K]³-AD1-NH₂, com inibições apenas entre 16 e 64 µM. Já os demais análogos apresentaram desempenho semelhante ao controle positivo, para as mesmas cepas, com atividade entre 8 e 16 µM. O análogo [K]³-AD1-NH₂ apresentou também maior fração helicoidal em 60% de TFE, sendo o meio que mais induz tal conformação.

No teste de degradação enzimática, quem mostrou-se mais resistente foi o [K]³-AD1-NH₂, o que deve ser estudado com mais profundidade, pois almeja-se que tais materiais não degradem muito rapidamente, e nem que permaneçam resistentes em um tempo muito elevado, o tempo máximo estudado neste projeto foi de 6 h e o material não havia sido degradado por completo ainda. Esse dado pode ser correlacionado com os resultados vistos para sua estruturação, uma vez que sua fração helicoidal poderia inferir numa menor degradação, e que juntamente aos resultados do teste de hemólise mostrou uma importante característica dessa família de PAMs, pois nenhum dos análogos rompeu os eritrócitos humanos testados, até a concentração de 128 µM. Contudo, são necessários mais testes relacionados à toxicidade para confirmação de análises e maior compreensão dos materiais obtidos.

Em suma, os resultados obtidos nesse projeto sugerem que essas moléculas podem propiciar interessantes e profícuos compostos antimicrobianos, os quais devem ser explorados em novos estudos, de modo a contribuir com o estudo de alternativas à atual situação da resistência antibiótica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TIMENETSKY, J. Antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) - Departamento de Microbiologia. Disponível em: <<http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-medica/antimicrobianos-antibioticos-e-quimioterapicos>>. Acesso em: 23 jul. 2021.
- [2] Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- [3] BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.
- [4] WANG, G. et al. Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals*, v. 8, n. 1, p. 123-150, 2015.
- [5] SOUSA, L. et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. *Toxicon*, v. 127, p. 63-76, 2017.
- [6] YANG, X.; LEE, W.; ZHANG, Y. Extremely Abundant Antimicrobial Peptides Existed in the Skins of Nine Kinds of Chinese Odorous Frogs. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 1, p. 306-319, 2011.
- [7] SALDITT, T.; LI, C.; SPAAR, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1758, n. 9, p. 1483-1498, 2006.
- [8] IZADPANA, A.; GALLO, R. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005.

- [9] FIELDS, G.; NOBLE, R. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v. 35, n. 3, p. 161-214, 2009.
- [10] KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- [11] BULET, P. et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 20, p. 14893-14897, 1993. [12] POWELL, M. et al. Journal search results - Cite This For Me. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 9, p. 1268-1273, 1993.
- [13] HAO, G. et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides*, v. 30, n. 8, p. 1421-1427, 2009.
- [14] LEHNINGER, A. *Princípios de bioquímica*. Tradução . São Paulo: Sarvier, 2006.
- [15] CLAYDEN, Jonathan et al. *Organic Chemistry*. IE - Oxford, 2000.
- [16] BERNDT, Kurt. D; *Circular Dichroism Spectroscopy*, 1996.
- [17] LIFSON, S.; ROIG, A. On the Theory of Helix—Coil Transition in Polypeptides. *The Journal of Chemical Physics*, v. 34, n. 6, p. 1963-1974, 1961.