

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

LUCAS MELO BOSQUETTI

Síntese e estudo antibacteriano de análogos da Temporina F

Santo André
JULHO - 2023

Lucas Melo Bosquetti

Síntese e estudo antibacteriano de análogos da Temporina F

Monografia de Trabalho de
Conclusão de Curso, apresentado ao
Bacharelado em Química da UFABC
para obtenção do título de Bacharel em
Química

Orientador: Dr. Vani Xavier de Oliveira
Júnior

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bosquetti, Lucas Melo
Síntese e estudo antibacteriano de análogos da Temporina F /
Lucas Melo Bosquetti. — 2023.

38 fls. : il.

Orientador: Vani Xavier de Oliveira Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,
Bacharelado em Química, Santo André, 2023.

1. Peptídeos. 2. Antibacteriano. 3. estrutura-atividade. I. Oliveira
Júnior, Vani Xavier de. II. Bacharelado em Química, 2023. III.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Monografia apresentada pelo aluno Lucas Melo Bosquetti, em 31 de julho de 2023.

Profa. Dra. Karina Passalacqua Morelli Frin

Examinador

Profa. Dra. Fernanda Dias da Silva

Examinador

Prof. Dr. Vani Xavier de Oliveira Júnior

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que capacita todas as pessoas. Ele me permitiu chegar até aqui.

Aos meus pais, pessoas maravilhosas que me deram a oportunidade de poder focar totalmente nos estudos, e sempre me incentivaram.

Ao professor Dr. Vani, meu orientador ao longo de toda a graduação. Sou muito grato por ele ter me recebido de braços abertos logo na minha primeira semana na universidade. Aprendi muito com ele e foi sob sua orientação que decidi seguir a carreira acadêmica.

A todos os amigos que fiz no Lacom. Em especial à Cyntia, Katielle, Gustavo, Alessandro e Renan. Grandes amigos com quem convivi anos na bancada, e que me ensinaram muito.

Aos amigos que fiz durante os quatro anos de graduação, bem como os colegas de outros grupos de pesquisa, como os companheiros do 407-3.

Ao professor Dr. João Lago, a Marina Monroe, a professora Dra. Fernanda Dias, a Caroline Dominguez, professor Dr. Pedro Ismael e Roberta Mendes, que cederam seus laboratórios e me acompanharam em testes essenciais para o avanço da pesquisa.

Aos excelentes professores que tive o prazer de conhecer na UFABC. Todos foram prestativos e me inspiraram nessa jornada.

A UFABC, onde vivi grandes momentos e conheci pessoas incríveis.

E agradeço a FAPESP, que tornou essa pesquisa possível através do financiamento.

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
1) Introdução.....	9
1.1) Resistência a antibióticos	9
1.2) Peptídeos Antimicrobianos	10
1.3) Temporinas.....	13
2) Justificativa	14
3) Objetivos	14
4) Métodos.....	16
4.1) Síntese dos peptídeos	16
4.2) Purificação dos peptídeos.....	17
4.3) Ensaios Biológicos	18
4.4) Ensaio de atividade Hemolítica.....	19
4.5) Índice terapêutico	20
5) Resultados e Discussão	21
6) Conclusões	27
7) Referências Bibliográficas	28
8) Anexos.....	33

Resumo

A resistência bacteriana vem se mostrando como um dos maiores desafios para a medicina nas últimas décadas, uma vez que as infecções por micro-organismos resistentes têm se tornado mais comuns, e a busca por antibióticos capazes de sobrepujar essa resistência se tornou o foco de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. O presente projeto buscou estudar a Temporina F - um peptídeo antimicrobiano identificado na pele de certas espécies de anfíbios - realizando um “*Lys scan*” deste peptídeo antimicrobiano, visando obter análogos com atividades antimicrobianas mais relevantes e menor atividade hemolítica, utilizando a técnica de mutação direcionada. As moléculas foram sintetizadas em Fase sólida, purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e caracterizadas através de Espectrometria de Massas (LC/ESI-MS). As atividades biológicas dos análogos e da molécula nativa foram analisadas nos ensaios hemolíticos e antimicrobianos, com bactérias gram-positivas e gram-negativas. Através desses ensaios biológicos, foi possível notar que o aumento na carga da molécula pode acarretar em um significativo aumento em sua capacidade de inibição antibacteriana, como observado nos análogos [K]⁶-Temp. F e [K]¹⁰-Temp. F, sem ocasionar um aumento significativo na hemólise. No entanto, aumentos maiores de carga, como no caso da [K]³[K]¹¹-Temp. F, acabaram por aumentar severamente o caráter hemolítico da molécula, sem apresentar melhoras nos ensaios antimicrobianos, em relação aos análogos de substituição única. Em suma, foi possível concluir que a modificação na cadeia de um peptídeo antimicrobiano natural pode produzir moléculas com grande potencial terapêutico, cabendo, portanto, posteriores ensaios de degradação e ensaios *in vivo* para avaliar a viabilidade dos compostos mais promissores.

Palavras-chave: peptídeos, conformações, estudo estrutura-atividade, antibacteriano.

Abstract

Bacterial resistance has been proving to be one of the greatest challenges for medicine in recent decades, since infections by resistant microorganisms have become more common, and the search for antibiotics capable of overcoming this resistance has become the focus of several research groups around the world. The present project seeks to study Temporin F - an antimicrobial peptide identified in the skin of certain species of amphibians - performing a "Lys scan" of this antimicrobial peptide, aiming to obtain analogues with more relevant antimicrobial activities and less hemolytic activity, using site-directed mutagenesis technique. The molecules were synthesized in solid phase, purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and characterized by Mass Spectrometry (LC/ESI-MS). The biological activities of the analogues and the native molecule were analyzed in hemolytic and antimicrobial assays, with gram-positive and gram-negative bacteria. Through these biological assays, it was possible to notice that the increase in the charge of the molecule can lead to a significant increase in its antibacterial inhibition capacity, as observed in the $[K]^6$ -Temp F and $[K]^{10}$ -Temp F analogues, without causing a significant increase in hemolysis. However, larger charge increases, as in the case of $[K]^3[K]^{11}$ -Temp F, ended up severely increasing the hemolytic character of the molecule, without showing improvements in antimicrobial assays, in relation to single replacement analogues. In short, it was possible to conclude that the modification of the chain of a natural antimicrobial peptide can produce molecules with great therapeutic potential, therefore requiring further degradation assays and *in vivo* assays to evaluate the viability of the most promising compounds.

Keywords: peptides, conformations, structure-activity study, antibacterial.

1) Introdução

1.1) Resistência a antibióticos

Antibióticos são compostos químicos de origem natural ou sintética, capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de agentes patogênicos que infectam os seres humanos, animais e plantas, agindo seletivamente na população de microrganismos (Nordqvist, 2017)

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto por Alexander Fleming, em 1929, em um hospital londrino. Enquanto observava o comportamento de uma cultura de bactérias *Staphylococcus aureus*, encontrada na pele dos seres humanos e responsável por inúmeros casos de infecções graves, percebeu que elas não conseguiam sobreviver na presença de um mofo chamado *Penicillium notatum* (Tan; Tatsumura, 2015)

Anos mais tarde, com o advento da Segunda Guerra Mundial, foi imperativo que se estudasse e que se pesquisasse novos tratamentos, pois com a guerra eram inevitáveis os ferimentos e, com eles, as infecções. A penicilina foi então extensamente utilizada contra estafilococos e estreptococos, grandes causadores de pneumonias, infecções aéreas superiores, septicemias etc. A nova droga tinha grande capacidade em dizimar essas infecções e, ainda, atuava de acordo com os princípios da terapia moderna, ou seja, com toxicidade seletiva (Russel; Chopra, 1990)

Atualmente, a classe dos antibióticos está no topo da lista das medicações mais prescritas no mundo, um fato que pode ser responsável pelo desenvolvimento da resistência bacteriana (Marquioti *et al*, 2015).

A resistência à antibióticos é um fenômeno que ocorre naturalmente de diversas formas, sendo principalmente devido a mutações que proporcionam a síntese de enzimas capazes de conferir a inativação de tais substâncias. Nas bactérias, os genes que conferem resistência aos antibióticos encontram-se geralmente em pequenos filamentos de DNA extracromossômico (os plasmídeos), os quais são transferidos de um organismo ao outro (mesmo de espécies diferentes), durante a conjugação. De geração em geração, essa característica é então repassada, aumentando proporcionalmente o número de bactérias que a possui, reduzindo assim a concentração dos organismos não portadores desse incremento adaptativo (Silveira, 2006).

Neste sentido, pode-se dizer que o ser humano e os microrganismos travam uma constante luta adaptativa, estes em busca de novos antibióticos, e aqueles se adaptando e criando resistência às novas substâncias. Porém, as perspectivas não são boas para a humanidade. A cada ano, morrem cerca de 700 mil pessoas em todo o mundo por infecções causadas por bactérias resistentes e segundo um estudo encomendado pelo governo britânico, a partir de

2050, esse número poderá chegar a dez milhões por ano (Review on Antimicrobial Resistance 2016).

Dessa forma, a disponibilidade de compostos naturais com atividade antimicrobiana é uma nova perspectiva para o desenvolvimento de antibióticos. Sendo os Peptídeos Antimicrobianos (AMP em inglês, ou PAM em português) alternativas promissoras para este fim (Libério, 2008).

1.2) Peptídeos Antimicrobianos

Antes mesmo de descobrir a penicilina, Fleming também foi o precursor do estudo dos PAMs. Em 1921, ele isolou compostos de secreções teciduais e observou que um desses apresentava atividade bactericida contra cepas de *Micrococcus lysodeikticus*; naquele momento, nascia o estudo dos PAMs com a descoberta da lisozima (Smoleli; Hartsell, 1949).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas frequentes em todos os grupos de seres vivos como constituintes da imunidade inata (Souza, 2012). São moléculas pequenas, que contém entre 10 e 50 aminoácidos, e variam quanto a sua estrutura e conformação (Auvynet; Rosenstein, 2009)

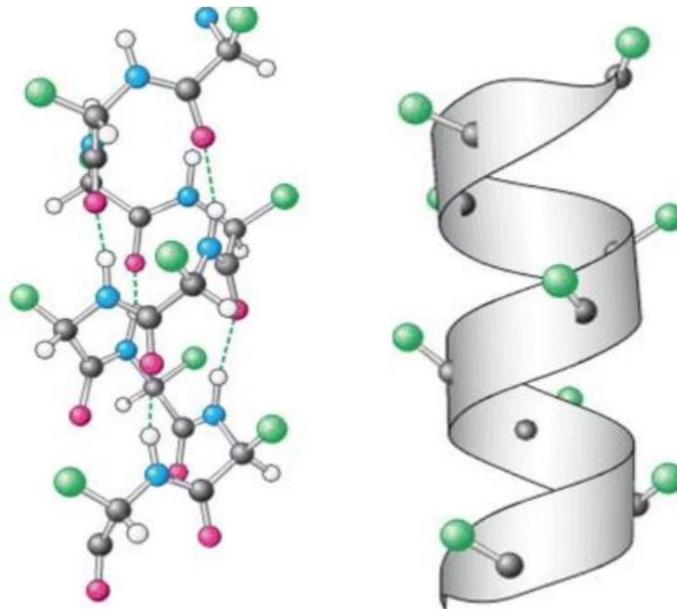


Figura 1 Estrutura secundária do tipo alfa-hélice, conformação presente em alguns peptídeos antimicrobianos que permitem as interações com a membrana celular dos microrganismos (Eisenberg, 2003).

Interações do tipo ligação de hidrogênio entre os aminoácidos que compõem o peptídeo, garantem a conformação de estrutura secundária do tipo alfa-hélice (Powell *et al*, 1993) (Figura 1). No sentido horário, o esqueleto polipeptídico se molda de maneira helicoidal, o hidrogênio do carbono alfa fica para dentro enquanto as cadeias laterais ficam para o lado de fora, de modo que em cada volta da hélice contam-se de três até seis resíduos de aminoácidos (Eisenberg, 2003).

A estrutura em alfa-hélice está presente em boa parte dos peptídeos com atividade antimicrobiana, ela garante uma conformação anfifílica, essencial para formar interações intramoleculares ao entrar em contato com a membrana plasmática.

O que torna os PAMs muito promissores para a criação de novos antibióticos, é sua variada forma de atuação, que dificulta o surgimento de resistência nos microrganismos. Os mecanismos de interação de PAMs com membranas biológicas podem ser diversos, sendo que os três principais modos de interação são: barril, tapete e poros (Papo; Shai, 2003).

No modelo de interação do tipo barril, cerca de três moléculas de peptídeos são necessárias para interagir com a membrana e formar um poro semelhante a um barril, que atravessa integralmente a membrana e atua no interior da célula.

Já o mecanismo de tapete é caracterizado por uma adesão de várias moléculas peptídicas sobre a superfície da membrana microbiana, até a concentração em que os peptídeos começam a interagir com a monocamada de fosfolípidios mais externa, produzindo um efeito semelhante ao observado por detergentes, destruindo a membrana celular.

Finalmente, no modelo poro toroidal, o peptídeo anfipático interage eletrostaticamente com a membrana plasmática fosfolipídica e une-se paralelamente à mesma. Dessa forma, o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolípidios e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro. Assim, neste modelo, o lúmen do poro é formado por moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolípidios intercaladas. Na Figura 2 estão apresentados os modelos de barril (A), tapete (B) e poros (C) (Toke, 2005).

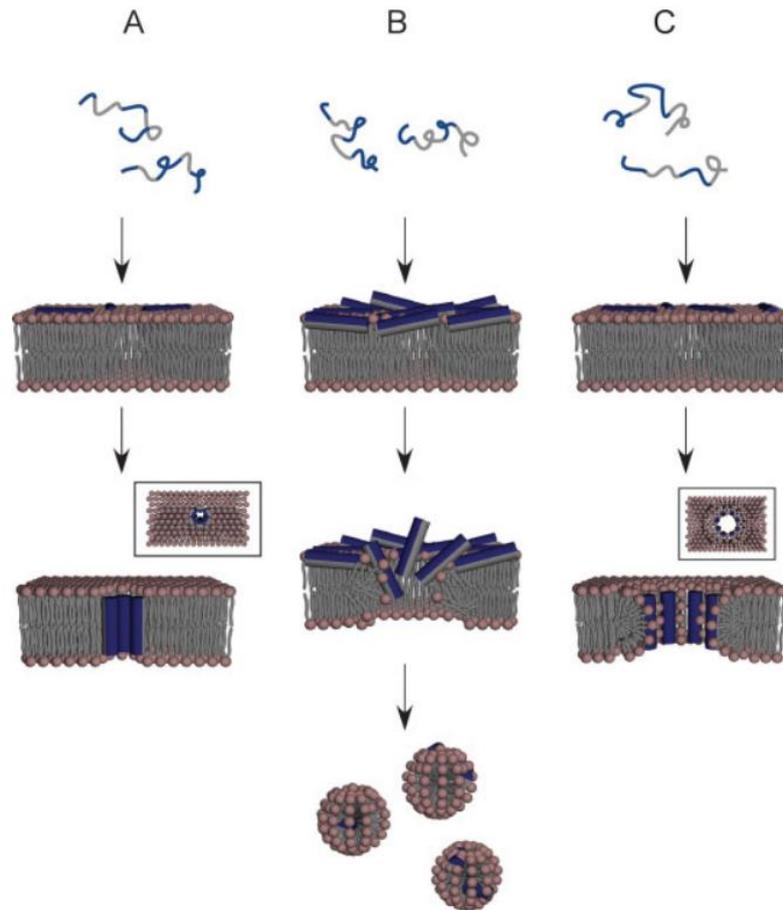


Figura 2 - Esquema dos mecanismos mais frequentes de interação de PAMs com a membrana plasmática (Toke, 2005).

Os PAMs também apresentam sinergismo com os antibióticos convencionais (Giuliani *et al*, 2007) e outros tratamentos terapêuticos, como a terapia fotodinâmica (Lopez-Garcia *et al*, 2000). Além disso, possui capacidade multifuncional, como antitumoral, antiparasitária e antiviral (Seo *et al*, 2012). Destaca-se inclusive, a recente descoberta de peptídeos que inibem o crescimento do vírus SARS-CoV-2, causador da pandemia do corona vírus (Freire *et al*, 2021).

A obtenção de peptídeos naturais provém de diversos seres vivos. Aqueles obtidos de invertebrados têm apresentado efetiva atividade antimicrobiana, como a Decoralina, proveniente da vespa *Oreumenes decoratus* (Torres *et al*, 2017), e também antitumoral, como o VmCT1, obtido do escorpião *Vaejovis mexicanus smithi* (Pedron *et al*, 2018) e o IsCT1 obtido do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis* (Li *et al*, 2001).

Os vertebrados também apresentam sistemas imunes promissores na fabricação de antibióticos, e dentre eles, os anfíbios representam um verdadeiro laboratório bioquímico, tendo em vista o arsenal de toxinas que fabricam. Nas células que revestem as paredes de glândulas

granulares presentes na pele desses animais é produzida uma variedade de princípios ativos, que compreendem moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de uma diversificada gama de esteroides, alcaloides, aminas biogênicas, derivados guanidínicos, proteínas e peptídeos (Prates; Bloch, 2000).

Dentre estes anfíbios, a *Rana temporária*, a rã vermelha europeia (Figura 3), natural da Europa e noroeste da Ásia, apresenta um potencial enorme para a indústria farmacêutica, pois a pele destes animais produz uma secreção rica em PAMs, batizados de Temporinas (Simmaco *et al*, 1996).



Figura 3 - Exemplar de *Rana temporária*. Retirado de nature-guide.info

1.3) Temporinas

A família das Temporinas é composta por mais de 40 peptídeos com propriedades que as tornam moléculas interessantes para a investigação de seus mecanismos de ação. Dentre essas propriedades, estão: as Temporinas são os menores peptídeos antimicrobianos, em α -hélice, encontrados na natureza (10-14 aminoácidos); sua carga positiva líquida em um pH neutro é baixa, variando de 0 a +3; alguns deles agem eficientemente e rapidamente contra um grande número de micro-organismos patogênicos (bactérias, vírus, fungos filamentosos e leveduras) e possuem baixo nível de toxicidade para as células de mamíferos (Chen Q *et al*, 2005). Seu modo de ação inclui a perturbação da membrana plasmática, preferindo a interface água-micela, podendo causar a deformação desta (Saviello *et al*, 2010); algumas temporinas possuem efeitos imunomodulatórios (Chen Y *et al*, 2005); preservam a sua função biológica no

plasma (Magnoni, 2006); e eficácia comprovada “*in vivo*” contra infecções localizadas e septicemias (Ghiselli *et al*, 2002).

Dentre as inúmeras temporinas, a Temporina F, foco do projeto, é um peptídeo composto de 13 resíduos, de carga residual +2, e que apresenta estrutura em α -hélice, em condições específicas. Em sua forma nativa, apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2) Justificativa

Os PAMs são uma alternativa promissora em relação aos antibióticos convencionais por diversos fatores, dentre os quais destaca-se o seu amplo espectro de ação, seus mecanismos de ação diferentes dos antibióticos convencionais, que dificultam o surgimento de resistências, e seu tempo de meia-vida no organismo relativamente curto, já que são facilmente degradados por proteases (Marr *et al*, 2006). Existem, contudo, algumas desvantagens. A principal delas é o alto custo para a produção dessas substâncias, variando de U\$ 100 – 600/g (Kang *et al*, 2014), porém muitas empresas farmacêuticas vêm buscando alternativas para sintetizar os peptídeos de forma mais barata (Mygind *et al*, 2005). A outra desvantagem refere-se à citotoxicidade. Apesar de a Temporina F não ser muito tóxica, suas concentrações hemolíticas são bem próximas dos valores onde a mesma é capaz de inibir o crescimento bacteriano, dificultando o uso da molécula nativa em tratamentos.

Estudos anteriores mostram que é possível melhorar a atividade antimicrobiana e diminuir a toxicidade dos peptídeos naturais, criando análogos sintéticos com alterações estruturais (Wade *et al*, 1992). Aumentar a carga líquida positiva de peptídeos tem sido relatado como uma forma de fomentar com sucesso sua interação com membranas bacterianas, aumentando assim a sua atividade antibacteriana para concentrações mais baixas do que aquelas necessárias para exercer toxicidade contra células de mamíferos (Almaaytah *et al*, 2012). Essa estratégia foi usada com sucesso, por exemplo, para gerar análogos antimicrobianos de VmCT1 (Pedron *et al*, 2017), Stigmurin (Parente *et al*, 2018), TsAP-1 e TsAP-2 Guo *et al*, 2013), e Polybia-CP (Torres *et al*, 2018).

Este fato motiva a síntese de análogos da Temporina F, de forma a obter um desenho racional de um peptídeo antimicrobiano com considerável ação antimicrobiana e baixa toxicidade, passível de aplicações na indústria farmacêutica.

3) Objetivos

Neste projeto buscou-se modificar a Temporina F, um PAM α -helicoidal derivado da secreção da pele da *Rana temporaria*. A Temp. F é um PAM pouco estudado, no entanto seus primeiros testes mostraram que se trata de uma molécula pouco tóxica e que possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Simmaco *et al*, 1996), fazendo dela uma ótima candidata para o desenvolvimento de novas drogas comerciais.

Dessa forma, alguns análogos da Temp-F foram desenhados e sintetizados, através da substituição pontual de aminoácidos por Lisina, buscando produzir um derivado sintético com menor toxicidade e maiores atividades antimicrobianas. A projeção do peptídeo nativo e dos análogos em Helical Wheel está apresentada abaixo na figura 4. As substituições realizadas buscam aumentar capacidade de permeabilizar a membrana externa e despolarizar a membrana citoplasmática.

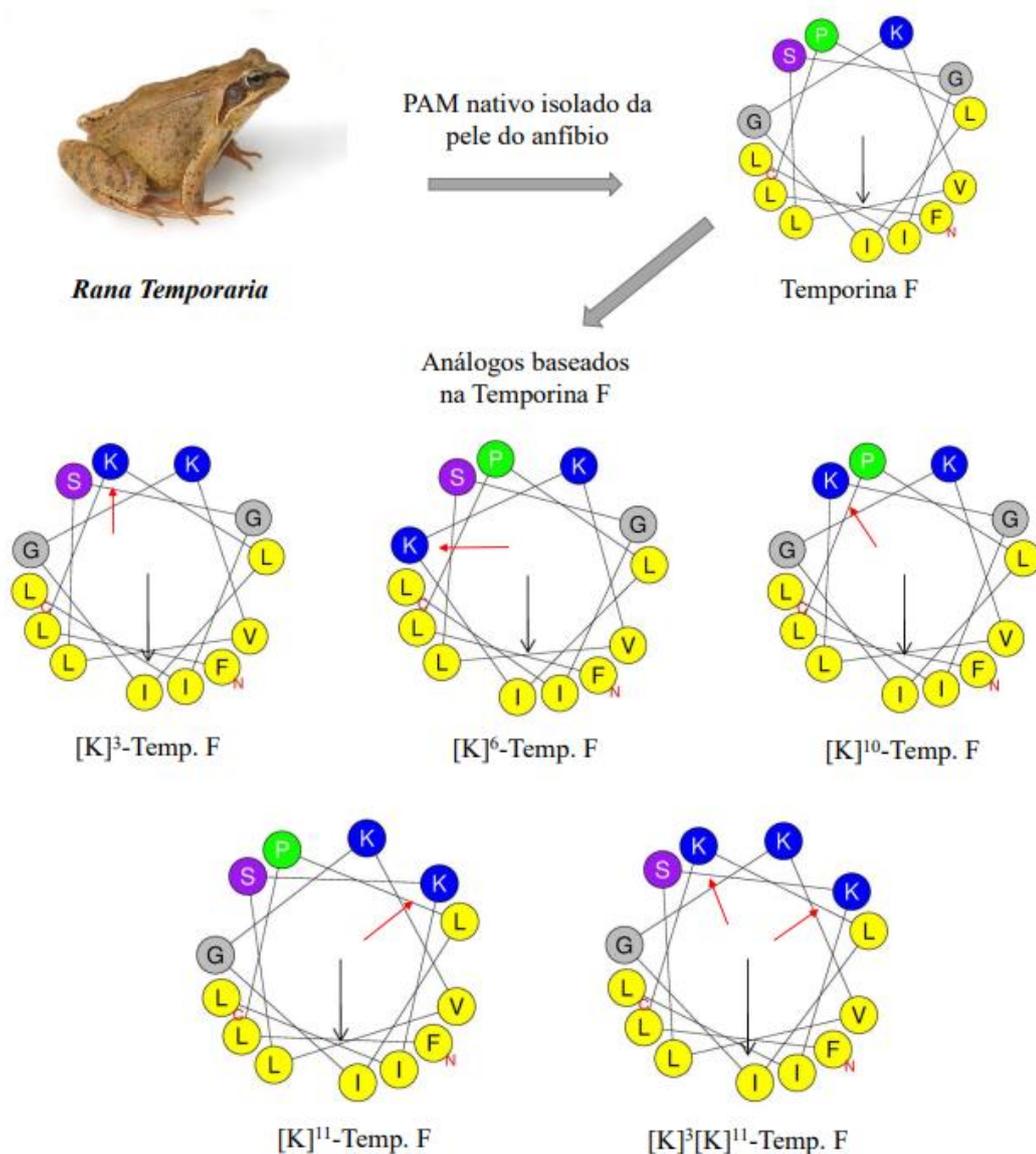


Figura 4 - Projeções em Helical Wheel dos derivados sintéticos da Temporina F. A estrutura helicoidal da Temp. F, cuja fonte natural é a secreção da pele da *Rana temporaria*, e seus análogos projetados são mostrados. A cor de cada círculo indica o grupo do aminoácido: amarelo para resíduos hidrofóbicos aromáticos e alifáticos; cinza para resíduos com hidrofobicidade próxima a zero; azul para resíduos básicos carregados positivamente; roxo para resíduos polares não carregados; verde para o aminoácido prolina. As setas pretas indicam a direção e intensidade do momento hidrofóbico, calculados usando o servidor online Heliquest. Setas em vermelho indicam as posições onde as substituições foram feitas.

4) Métodos

4.1) Síntese dos peptídeos

A síntese dos peptídeos foi realizada de forma manual, seguindo a estratégia Fmoc (Fields, 1990); para tanto, foram utilizados a resina Rink Amide MBHA, como suporte sólido, a solução de 20% de 4-metilpiperidina em DMF (dimetilformamida) (figura 5), como solução de desproteção e os agentes acopladores DIC (Diisopropilcarbodiimida) (Korr *et al*, 1989) e HOBt (N,N'-diisopropilcarbodiimida/ N-hidroxibenzotriazol em diclorometano/dimetilformamida (DCM/DMF) (1:1, v/v), sendo essas etapas monitoradas pelo teste de Kaiser (Kaiser *et al*, 1970) que consiste na utilização do reagente ninidrina, que na presença de aminoácidos desprotegidos, apresenta uma coloração violeta, mediante aquecimento. (figura 6).

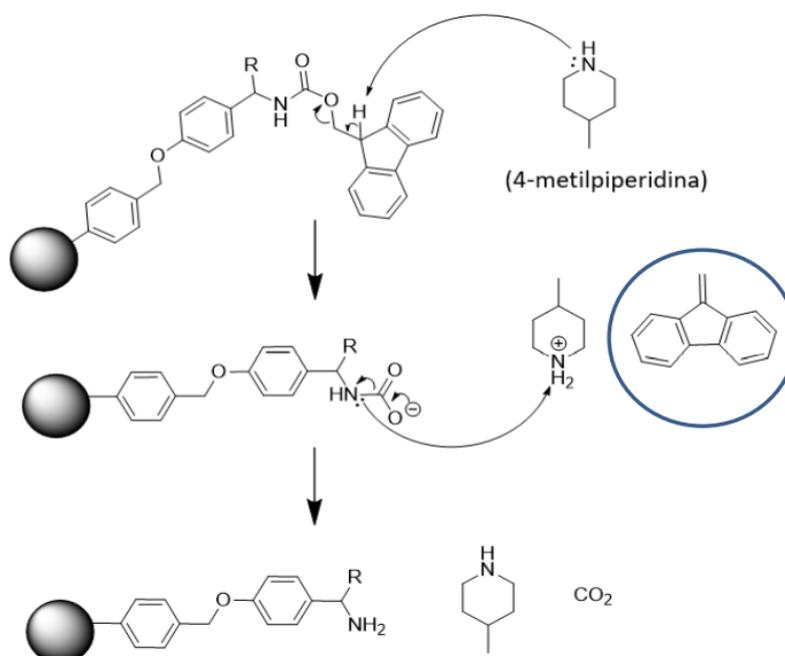


Figura 5 Desproteção do grupo fluorenilmetiloxicarbonila da resina, utilizando uma base fraca a 4-metilpiperidina, em solução de dimetilformamida (Fields, 1990). No círculo azul está representado o subproduto do Fmoc, formado após a desproteção.

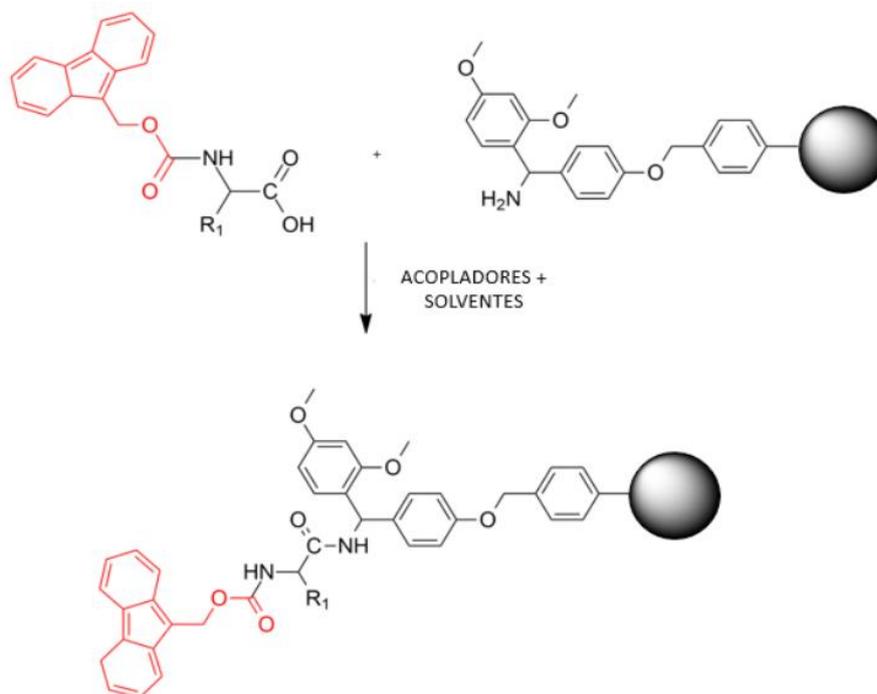


Figura 6. Acoplamento do resíduo de aminoácido na resina na presença de agentes acopladores que facilitam a formação de uma amida. As etapas de desproteção e acoplamento são feitas sucessivamente até a obtenção da sequência peptídica desejada (Fields, 1990).

Os peptídeos foram clivados da resina numa reação de 2 horas com 90% de TFA (Ácido trifluoroacético) / 5% Água e 5% de anisol, perfazendo uma concentração de (10 mL g⁻¹ de peptidil-resina). Ao término da reação, os peptídeos e as resinas foram tratados com éter dietílico, sendo então os peptídeos extraídos da resina com uma solução 0,1% TFA em 60% de ACN (Acetonitrila) / H₂O e liofilizados.

4.2) Purificação dos peptídeos

Os peptídeos brutos foram liofilizados e purificados em cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa de fase reversa, utilizando um HPLC SemiPrep LC 4000 (detetor UV-VIS Waters 2489) da Central Multiusuário da UFABC, utilizando gradientes variados – com variação de 0,33% de B/min; solventes A: 0,1% TFA/H₂O e B: 0,1% TFA - 60% ACN/H₂O, coluna Phenomenex C₁₈ (21,2 x 250 mm), 300 Å, 15 µm; fluxo: 10 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 220 nm.

Após essa etapa, as frações obtidas foram analisadas em um HPLC analítico Thermo Scientific UltiMate 3000, utilizando uma coluna Supelcosil C₁₈ (4,6 x 150 mm), 60 Å, 5 µm; solventes: A: 0,1% TFA/H₂O e B: 0,1% TFA - 60% ACN/H₂O; gradiente: 5% - 95% de B em 30 minutos; fluxo: 1,0 mL min⁻¹; comprimento de onda: 220 nm e volume de injeção: 50 µL, sendo unidas e liofilizadas as frações com maiores graus de pureza.

As frações foram então analisadas novamente em um HPLC analítico Thermo Scientific UltiMate 3000, obtendo-se os graus de pureza das frações. Os peptídeos purificados foram caracterizados por espectrometria de massas (LC/ESI-MS) e o conteúdo peptídico de cada composto foi determinado utilizando um NanoDrop 2000 da Thermo Scientific, em 205 e 280 nm.

4.3) Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) como descrito abaixo:

Etapa 1: Preparo dos Meios de Cultura Meio Ágar-LB (Luria Bertani) e Meio Basal 2 (BM2) glicosado

Em 1 L de água ultrapura foi dissolvido o meio LB. Em seguida, adicionou-se o ágar e a mistura foi autoclavada imediatamente. Ainda quente, foram adicionados cerca de 10 mL de meio nas placas de Petri, em fluxo laminar, e foram deixadas no fluxo, secando por 24 horas.

Para o preparo do meio BM2 utilizou-se a solução concentrada base fosfato-amônia BM2 10X, solução de glicose 40%, solução de MgSO₄ 50mM e solução de FeSO₄ 10mM.

Etapa 2: Preparo dos Micro-organismos

Em um fluxo laminar, transferiu-se uma pequena porção da cultura estoque congelada (-80°C) para uma placa de Petri - contendo meio ágar-LB - usando uma ponteira. A transferência (semeadura) foi feita usando técnica de esgotamento por estrias, de modo a se obter colônias isoladas. Após a semeadura as placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24h.

Etapa 3: Pré-inóculo e inóculo

Foram retiradas 4 a 5 colônia uniformes (CFU) da cultura em ágar, com uma ponteira e, transferidas para um volume de 5 mL de meio BM2 em um tubo tipo falcon de 15 mL. Então, os tubos foram deixados para crescimento das bactérias a 37 °C sob agitação, com a tampa levemente frouxa. No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para o inóculo também em BM2 – diluição de 1:100 – 50 µL para cada 5 mL – em tubo falcon de 15 mL estéril.

Os tubos foram colocados sob agitação no shaker (37 °C), com a tampa levemente frouxa. A cada 1h, foi realizada a medição em um BioDrop OD600. Quando o valor lido no OD600 estava em torno de 0,5, o inóculo foi retirado do shaker e foi realizada a diluição para o plaqueamento.

Usando uma concentração de 10^4 CFU por poço, as soluções com microrganismos foram adicionadas as placas de 96 poços, previamente preparadas com as soluções peptídicas nas concentrações desejadas, sendo o volume final de 100µL. As placas foram então incubadas por 24 horas, em estufa a 37 °C, sem agitação. Após o período de 24 h, elas foram lidas em leitor de microplacas, em 595 nm.

As bactérias testadas, em um primeiro momento, foram: *Escherichia coli* BL21, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas. aeruginosa* PA01, *Pseudomonas. aeruginosa* PA14 e *Staphylococcus epidermidis*. Nos testes posteriores, devido a um problema de crescimento das cepas de PA01, esta foi substituída pela *Serratia marscencens*. Os testes foram realizados em triplicada, totalizando 15 placas, testando as concentrações entre 0,125 e 128 µM dos peptídeos.

Utilizando o software GraphPad Prism, os mapas de calor foram construídos a partir dos dados obtidos no leitor de microplacas.

4.4) Ensaio de atividade Hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica dos peptídeos foi realizado com eritrócitos humanos recém coletados de tipo sanguíneo A+, (seguindo as Diretrizes Éticas do Instituto Butantan - protocolo CEUA/IB #I-1345/15) lavados e centrifugados três vezes com solução de PBS (tampão fosfato-salino, composta de NaCl 8,2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,05 g.L⁻¹ e NaH₂PO₄ 0,35 g.L⁻¹) a 300XG.

As placas de 96 poços foram preparadas com os peptídeos em soluções PBS, em concentrações que variaram de 0 a 100 µM, e então foram adicionados a suspensão de eritrócitos em PBS, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Triton X-100 foi usado como controle de lise (100% de hemólise) e PBS como controle não hemolítico para os experimentos.

O sobrenadante (hemácias intactas) foi retirado para a leitura de absorbância utilizando uma micropipeta. A absorbância do sobrenadante foi medido a 405 nm em um leitor de microplacas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração que causou 5% de hemólise celular, os dados foram calculados usando a curva dose-resposta. Duas réplicas independentes foram realizadas por peptídeo (figura 7).

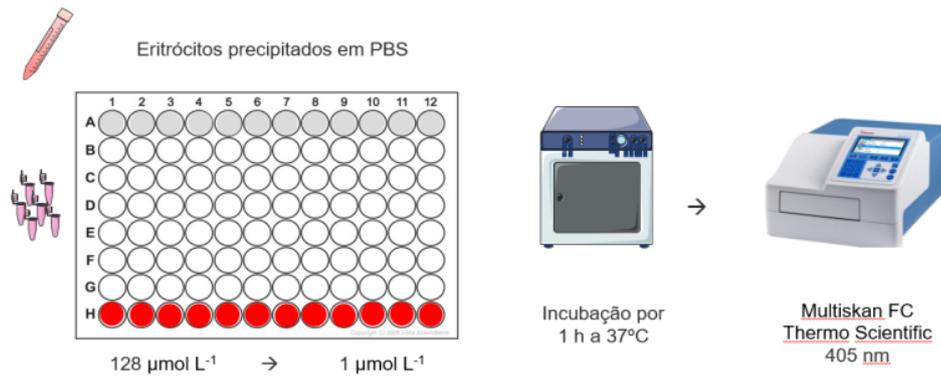


Figura 7. Disposição do ensaio de atividade hemolítica dos peptídeos distribuídos nas colunas nas concentrações seriadas de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A fila cinza da placa de 96 poços está o PBS, usado como controle positivo, e em vermelho o Triton X como controle de hemólise. O experimento foi realizado em duplicata.

4.5) Índice terapêutico

O Índice terapêutico (IT) de cada um dos peptídeos foi calculado como a razão entre a CIM dos peptídeos em relação às cepas de bactérias pela CIM dos mesmos nos testes com eritrócitos humanos. Este valor é utilizado para determinar a faixa de valores que otimizam o equilíbrio entre a eficácia e a toxicidade do medicamento.

5) Resultados e Discussão

Os peptídeos sintetizados e estudados estão apresentados na tabela 1, abaixo:

Tabela 1 - Sequência, Massa Molecular e Propriedades Físico-Químicas dos Peptídeos Estudados^a

Peptídeo	Sequência	Peso molecular (Da)		H	μH	P/N	z
		Calculado	Observado				
Temp. F	FLPLIGKVLSGIL-NH ₂	1367.9	1368.8	1.008	0.609	0.444	+2
[K] ³ -Temp. F	FLK L IGKVLSGIL-NH ₂	1399.9	1400.8	0.876	0.732	0.624	+3
[K] ⁶ -Temp. F	FLPLIK KK VLSGIL-NH ₂	1439.9	1441.4	0.932	0.624	0.444	+3
[K] ¹⁰ -Temp. F	FLPLIGKVL K GIL-NH ₂	1409.9	1410.9	0.935	0.665	0.444	+3
[K] ¹¹ -Temp. F	FLPLIGKVL SK IL-NH ₂	1439.9	1440.9	0.932	0.653	0.444	+3
[K] ³ [K] ¹¹ -Temp. F	FL KL IGKVL SK IL-NH ₂	1470.9	1471.9	0.800	0.771	0.624	+4

a: H: hidrofobicidade. μH: momento hidrofóbico. P/N: proporção de resíduos polar-não-polar. z: carga líquida. As substituições estão destacadas em vermelho.

Os mapas de calor de atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados estão ilustrados nas Figuras 8 a 13 e o Gráfico de atividade hemolítica está representado na Figura 14.

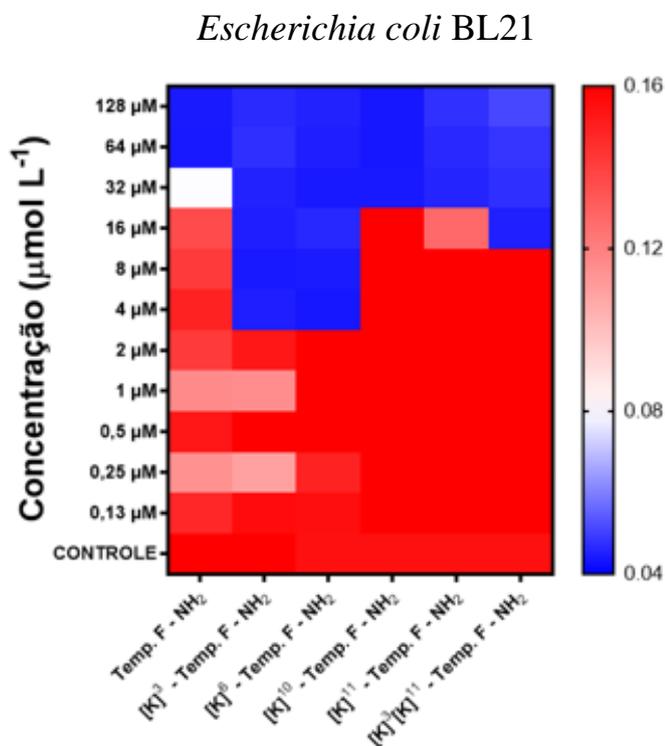


Figura 8 - Atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM (concentração inibitória mínima) em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

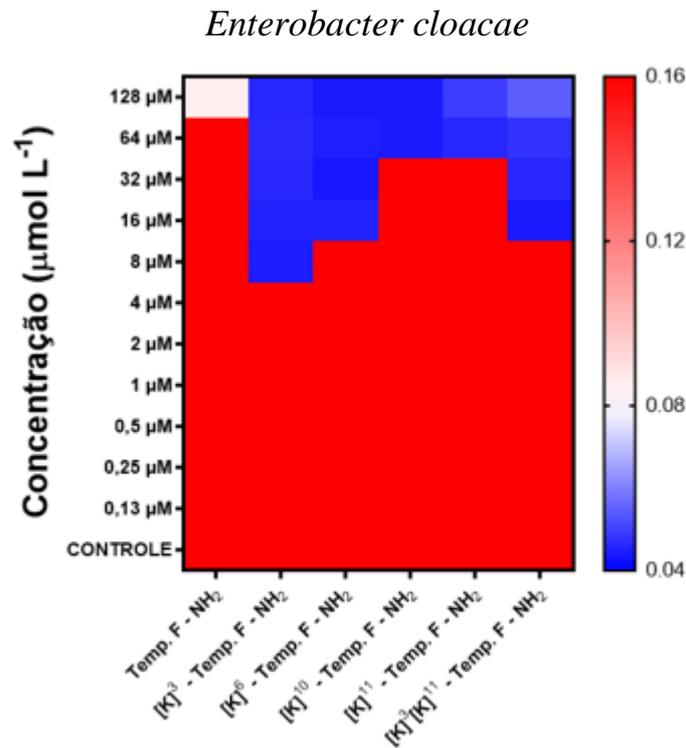


Figura 9 - Atividade antimicrobiana para *Enterobacter cloacae* dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

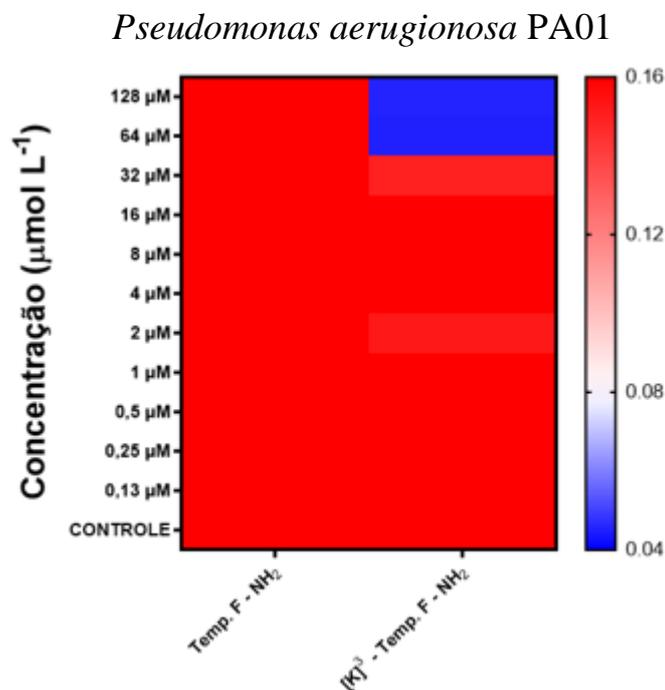


Figura 10 - Atividade antimicrobiana para *Pseudomonas Aeruginosa* PA01 dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

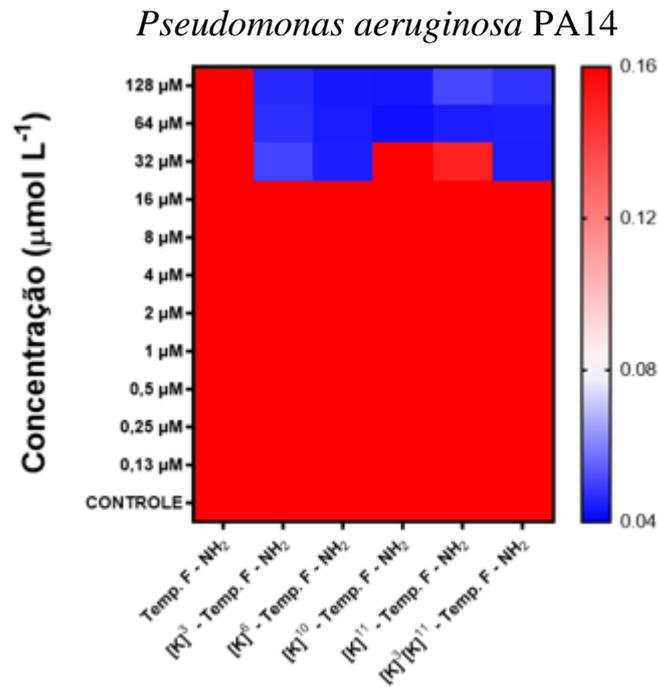


Figura 11 - Atividade antimicrobiana para *Pseudomonas Aeruginosa* PA14 dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

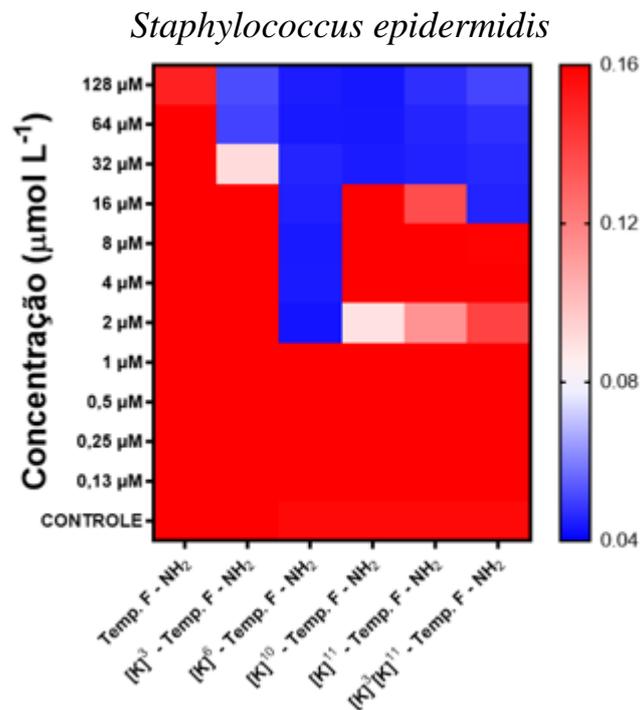


Figura 12 - Atividade antimicrobiana para *Staphylococcus epidermidis* dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

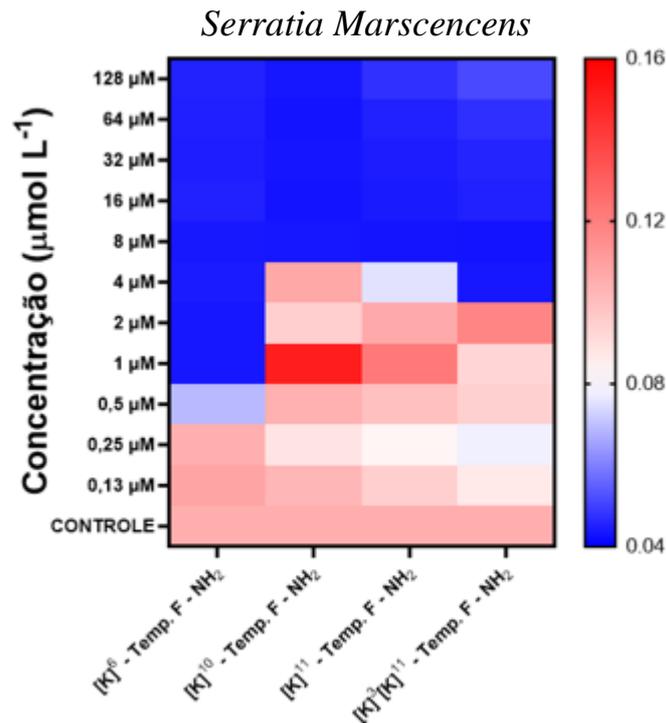


Figura 13 - Atividade antimicrobiana para *Serratia marscencens* dos peptídeos sintetizados, expressa em valores de CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração azul (0.04 A.U OD₅₉₅) indica a inibição do crescimento bacteriano.

Ensaio hemolítico

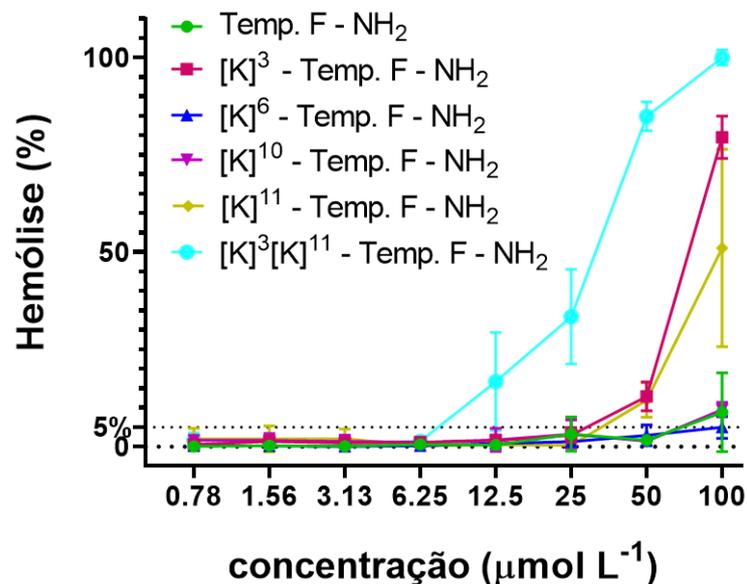


Figura 14 - Atividade hemolítica dos peptídeos quando testados em eritrócitos humanos. Foram testadas diferentes concentrações seriadas dos peptídeos (0,78 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS a 37 °C por 1 h. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Nos ensaios biológicos é possível notar que o aumento da carga líquida do peptídeo acarreta uma melhora na interação dos compostos com a membrana protetora das bactérias - assim como previsto - uma vez que todos os análogos apresentaram MIC em concentrações menores quando comparados ao peptídeo antimicrobiano nativo, que muitas vezes não foi ativo nem mesmo nas concentrações mais altas utilizadas ($128 \mu\text{mol L}^{-1}$). No entanto, substituição por lisina de certos resíduos, como da prolina - na posição 3 e da glicina - na posição 11, propiciaram um aumento da atividade hemolítica, como pode ser observado nos análogos $[\text{K}]^3$ -Temp. F e $[\text{K}]^{11}$ -Temp. F. Esse efeito fica ainda mais evidente no análogo com substituição nas duas posições, $[\text{K}]^3[\text{K}]^{11}$ -Temp. F, que apresentou os maiores valores de hemólise dentre todos os compostos estudados, sendo hemolítico já em $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Por outro lado, as substituições da glicina - na posição 6 e da serina - na posição 10 demonstraram um considerável aumento na atividade antimicrobiana, sem aumentar a atividade hemolítica da molécula. No caso da $[\text{K}]^6$ -Temp. F, o que se observou foi o oposto, uma diminuição na atividade hemolítica, ao passo que esta molécula demonstrou os melhores desempenhos de inibição microbiana.

Outros dois valores que parecem estar intimamente ligados ao caráter hemolítico dos peptídeos são a sua hidrofobicidade e o momento hidrofóbico, sendo que os dois peptídeos que tiveram um aumento na carga sem acarretar em um grande aumento do momento hidrofóbico $[\text{K}]^6$ -Temp. F e $[\text{K}]^{10}$ -Temp. F, foram dois que apresentaram melhora na atividade antimicrobiana, sem um aumento efetivo da toxicidade.

A Tabela 2 apresenta os valores de MIC e concentração hemolítica dos peptídeos, enquanto que a Tabela 3 apresenta o coeficiente de afinidade, a razão entre concentração de hemólise e a concentração inibitória para cada um dos peptídeos:

Tabela 2 – Valores de hemólise e MIC da Temp. F e seus análogos.

Conc. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Temp. F	$[\text{K}]^3$ -Temp. F	$[\text{K}]^6$ -Temp. F	$[\text{K}]^{10}$ -Temp. F	$[\text{K}]^{11}$ -Temp. F	$[\text{K}]^3[\text{K}]^{11}$ -Temp. F
Hemolítico	100	50	100	100	50	12.5
<i>E. coli</i>	64	4	4	32	32	16
<i>E. cloacae</i>	>128	8	16	64	64	16
PA 01	>128	64	-	-	-	-
PA 14	>128	32	32	64	64	32
<i>S. epidermidis</i>	>128	64	2	32	32	16
<i>S. marcescens</i>	-	-	1	8	8	4

Os valores não apresentados devem-se aos casos em que o peptídeo não foi testado com a bactéria, ou os valores de MIC foram superiores ao máximo utilizado ($128 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 3 – Índice terapêutico dos peptídeos em relação a cada bactéria.

IT	Temp.	[K] ³ -Temp.	[K] ⁶ -Temp.	[K] ¹⁰ -Temp.	[K] ¹¹ -Temp.	[K] ³ [K] ¹¹ -Temp.
	F	F	F	F	F	F
<i>E. coli</i>	1.56	12.5	25	3.13	1.56	0.78
<i>E. cloacae</i>	NA	6.25	6.25	1.56	0.78	0.78
<i>PA 01</i>	NA	0.78	-	-	-	-
<i>PA 14</i>	NA	1.56	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>S. epidermidis</i>	NA	0.78	50	3.13	1.56	0.78
<i>S. marcescens</i>	-	-	100	12.5	6.25	3.13

Os valores não apresentados devem-se aos casos em que o peptídeo não foi testado com a bactéria, ou os valores de MIC foram superiores ao máximo utilizado ($128 \mu\text{mol L}^{-1}$).

O análogo [K]⁶-Temp. F foi o que demonstrou melhores coeficientes de afinidade para todos os micro-organismos analisados, se mostrando um potencial fármaco, restando ainda realizar estudos a respeito de sua degradação e de seu comportamento *in vivo*. O análogo [K]¹⁰-Temp. F também apresentou valores baixos para a inibição do crescimento bacteriano, e um bom índice terapêutico.

Quando comparados a análogos de peptídeos publicados na literatura, como o [A]¹ [K]³ [F]⁵ [K]⁸ -IsCT1 (Oliveira *et al*, 2021) que também é derivado de um peptídeo natural, ou então o PaDBS1R6 (Fensterseifer *et al*, 2019) que é um peptídeo modelado por computação, nota-se que os dois peptídeos são biologicamente ativos em concentrações semelhantes, ou até mesmo menores para algumas espécies de microrganismos, visto que ambos apresentam CIM que variam em torno de 8 a $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as mesmas cepas de bactérias testadas, mostrando que os dois análogos se mostram promissores, seja comparando-os com outros análogos de naturais, ou com peptídeos cujo design foi pensado totalmente do zero. Restando então, estudar a farmacocinética de cada um dos compostos posteriormente.

6) Conclusões

A resistência antimicrobiana vem aumentando e a busca por novos antibióticos pela indústria farmacêutica parece uma corrida fadada ao fracasso, visto que a adaptação das bactérias vem se mostrando muito mais veloz do que nossa capacidade de desenvolver novos compostos. Novas abordagens, que consigam de certa forma burlar os mecanismos adaptativos dos microrganismos são extremamente necessárias. Os PAMs representam uma fonte potencial pouco explorada de antibióticos, uma vez que são compostos bioativos versáteis e com mecanismos de ação de difícil resistência. Neste projeto, foi explorado um peptídeo derivado de um anfíbio, com potencial para agente antimicrobiano. Através do estudo de seus análogos, foi possível constatar que aumentar a carga líquida desse peptídeo, por substituições sítio-dirigidas de aminoácidos leva a um aumento considerável de sua atividade antimicrobiana; no entanto, há certas alterações que acarretam conjuntamente com um aumento de seu potencial hemolítico, sendo necessário observar o balanço entre sua carga líquida e sua hidrofobicidade. Com os resultados foram obtidos dois novos análogos – inéditos na literatura - que apresentaram um elevado grau de atividade antimicrobiana, sem demonstrar caráter hemolítico considerável, são eles [K]⁶-Temp. F e [K]¹⁰-Temp. F. Ainda que seja prematuro afirmar que as moléculas são potenciais fármacos, pois seu estudo necessita de diversos ensaios, ambos os compostos se mostram promissores, justificando o emprego de seu estudo em projetos futuros.

7) Referências Bibliográficas

ALMAAYTAH, A.; Zhou, M.; Wang, L.; Chen, T.; Walker, B.; Shaw, C. **Antimicrobial/Cytolytic Peptides from the Venom of the North African Scorpion, *Androctonus Amoreuxi*: Biochemical and Functional Characterization of Natural Peptides and a Single Site-Substituted Analog.** *Peptides*. 2012, 35, 291–299.

AUVYNET C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: **Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity.** *FEBS Journal*. 2009; 276, 6497–6508.

CHEN Q, Wade D, Kurosaka K, Wang ZY, Oppenheim JJ, Yang D. **Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes.** *J. Immunol.*; 2004; 173, 2652–2659.

CHEN Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. **Rational design of helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index.** *J. Biol. Chem.*; 2005; 280(13), 12316-12329.

EISENBERG D. **The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principal structural features of proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11207- 11210.

FENSTERSEIFER, Isabel C.M. et al. **Selective antibacterial activity of the cationic peptide PaDBS1R6 against Gram-negative bacteria.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1861, n. 7, p. 1375-1387, 2019.

FIELDS GB, Noble RL. **Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids.** *Journal of Peptide and Protein* 1990; 35 (3), 161-214. 15.

FREIRE, M.C.L.C.; Noske, G.D.; Bitencourt, N.V.; Sanches, P.R.S.; Santos-Filho, N.A.; Gawriljuk, V.O.; de Souza, E.P.; Nogueira, V.H.R.; de Godoy, M.O.; Nakamura, A.M.; Fernandes, R.S.; Godoy, A.S.; Juliano, M.A.; Peres, B.M.; Barbosa, C.G.; Moraes, C.B.; Freitas-Junior, L.H.G.; Cilli, E.M.; Guido, R.V.C.; Oliva, G. **Non-Toxic Dimeric Peptides**

Derived from the Bothropstoxin-I Are Potent SARS-CoV-2 and Papain-like Protease Inhibitors. *Molecules* 2021, 26.

GAUTIER, R.; Douguet, D.; Antony, B.; Drin, G. **HELIQUEST: A Web Server to Screen Sequences with Specific α -Helical Properties.** *Bioinformatics* 2008, 24, 2101–2102.

GHISELLI R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Kamysz W. **Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium susceptible and methicillin sodium resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection.** *J Vasc Surg.* 2002; 36, 1027–1030.

GIULIANI A, Pirri G, Nicoletto SF. **Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics.** *Central European Journal of Biology.* 2007; 1, 1-33.

GUO, X.; Ma, C.; Du, Q.; Wei, R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C. **Two Peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the Venom of the Brazilian Yellow Scorpion, *Tityus Serrulatus*: Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Activities.** *Biochimie.* 2013; 95, 1784–1794.

KAISER E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. **Ninhydrin test.** *Anal.Biochem.* 1970; 34, 595-598.

KANG, S.-J., Park, S. J., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. **Antimicrobial peptides: therapeutic potentials.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2014, 1477–1486.

KNORR R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillessen D. **New coupling reagents in peptide chemistry.** *Tetrahedron Letters.* 1989; 30, 1927-1930. 16.

LI D, Akikazu Y, Hideo N, Gerardo C, Andriantsiferana M, Nakajima T. **IsCT, a Novel Cytotoxic Linear Peptide from Scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 286, Issue 4, 2001, Pages 820- 825.

LIBÉRIO, MS. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases.** Dissertação de doutorado, Universidade de Brasília. 2008.

LOPEZ-GARCIA B, González-Candelas L, Pérez-Payá E, Marcos JF. **Identification and Characterization of a Hexapeptide with Activity Against Phytopathogenic Fungi That Cause Postharvest Decay in Fruits.** *Molecular plant-microbe interactions*. 2000; 13(08) 837-839.

MANGONI ML. **Temporins, anti-infective peptides with expanding properties.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006; 63(9), 1060–1069.

MARQUIOTI CMJ, Lanes LC, Castro GFP. **Uso irracional de antibióticos na infância: contribuição do profissional farmacêutico para a promoção da saúde.** *Rev Transformar*. 2015.

MARR A, Gooderham W, Hancock R. **Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook.** *Curr Opin Pharmacol*. 2006, 6(5):468-472

MYGIND PH, Fischer RL, Schnorr KM. **Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus.** *Nature* 2005;437(7061):975-80

NORDQVIST, Christian. **What to know about antibiotics.** *Medical News Today*, 2017.

OLIVEIRA, Cyntia Silva et al. **Synthetic Peptide Derived from Scorpion Venom Displays Minimal Toxicity and Anti-infective Activity in an Animal Model.** *ACS Infectious Diseases*, 7, 9, p. 2736-2745, 2021.

PAPO N, Shai Y. **Exploring peptide membrane interaction using surface Plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides.** *Biochemistry*. 2003; 42, 458-466.

PARENTE, A. M. S.; Daniele-Silva, A.; Furtado, A. A.; Melo, M. A.; Lacerda, A. F.; Queiroz, M.; Moreno, C.; Santos, E.; Rocha, H. A. O.; Barbosa, E. G.; Carvalho, E.; Silva-Junior, A. A.; Silva, M. S.; Fernandes-[´] Pedrosa, M. D. F. **Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity.** *Toxins*. 2018(4); 10, 161.

PEDRON CN, Andrade GP, Sato RH. **Anticancer activity of VmCT1 analogs against MCF-7 cells.** *Chem Biol Drug Des*. 2018; 91, 588– 596.

PEDRON, C. N.; Torres, M. D. T.; Lima, J. A.; da, S.; Silva, P. I.; Silva, F. D.; Oliveira, V. X. **Novel Designed VmCT1 Analogs with Increased Antimicrobial Activity.** *Eur. J. Med. Chem*. 2017; 126, 456– 463.

POWELL, M.F., Stewart, T., Jr Otvos, L. **Peptide Stability in Drug Development. II. Effect of Single Amino Acid Substitution and Glycosylation on Peptide Reactivity in Human Serum.** *Pharm Res*. 1993, 10, 1268–1273.

PRATES MV, Bloch JR, C. **Peptídeos Antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasil*, 2000;17, 30-36.

REVIEW on Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally. Disponível em: <https://amr-review.org/> Acesso em 06 de julho de 2023.

RUSSELL, A.D, Chopra, I. **In Understanding antibacterial action and resistance.** 1st ed. Ellis Horwood, London, 1990.

SAVIELLO, M.R *et al.* **New Insight into the Mechanism of Action of the Temporin Antimicrobial Peptides.** *Biochemistry*, 49 (7), 1477-1485. 2010

SEO MD, Won HS, Kim JH, Ochir TM, Lee BJ. **Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review.** *Molecules*. 2012; 17, 12276- 12286.

SILVEIRA, G.P. **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana.** *Química Nova*. 2006, v. 29, 844-855.

SIMMACO M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D. **Temporins, Antimicrobial Peptides from the European Red Frog *Rana temporaria***. European Journal of Biochemistry, 1996; 242, 788-792.

SMOLELIS AN, Hartsell SE. **The determination of lysozyme**. J Bacteriol. 1949, 58(6):731–736

SOUZA, A.L.A. **Estudo estrutural e da atividade biocida da Temporizina: um peptídeo híbrido com atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi***. Instituto Oswaldo Cruz, 2012; 76-89.

TAN SY, Tatsumura Y. **Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin**. Singapore Med J. 2015 Jul;56(7):366-367

TOKE, O. **Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections**. Biopolymers. 2005, vol. 80, 717-735.

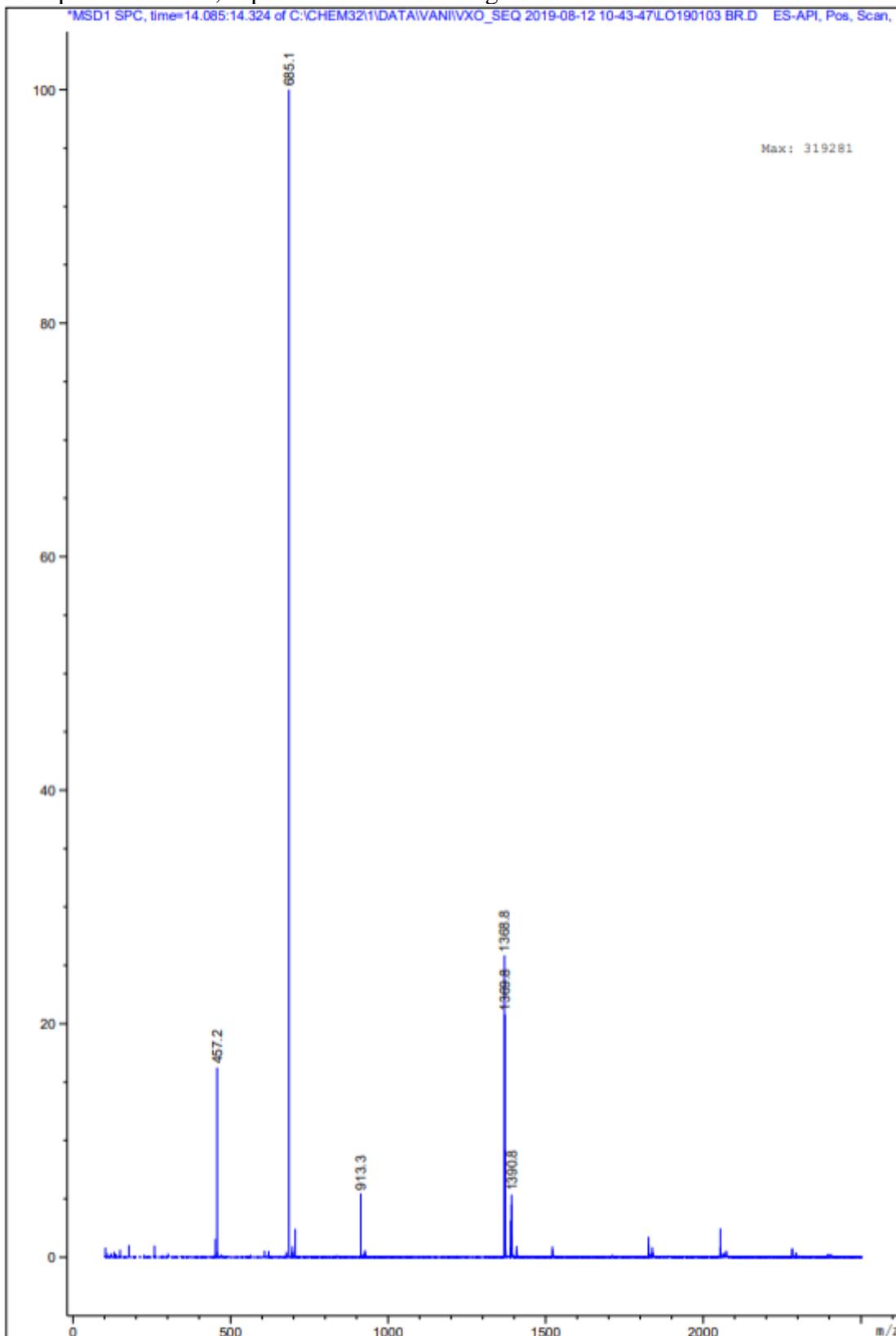
TORRES MDT, Pedron CN, da Silva Lima JA, da Silva PI, da Silva FD, Oliveira, V X. **Antimicrobial activity of leucine-substituted decoralin analogs with lower hemolytic activity**. *J. Pept. Sci.*, 2017; 23, 818– 823.

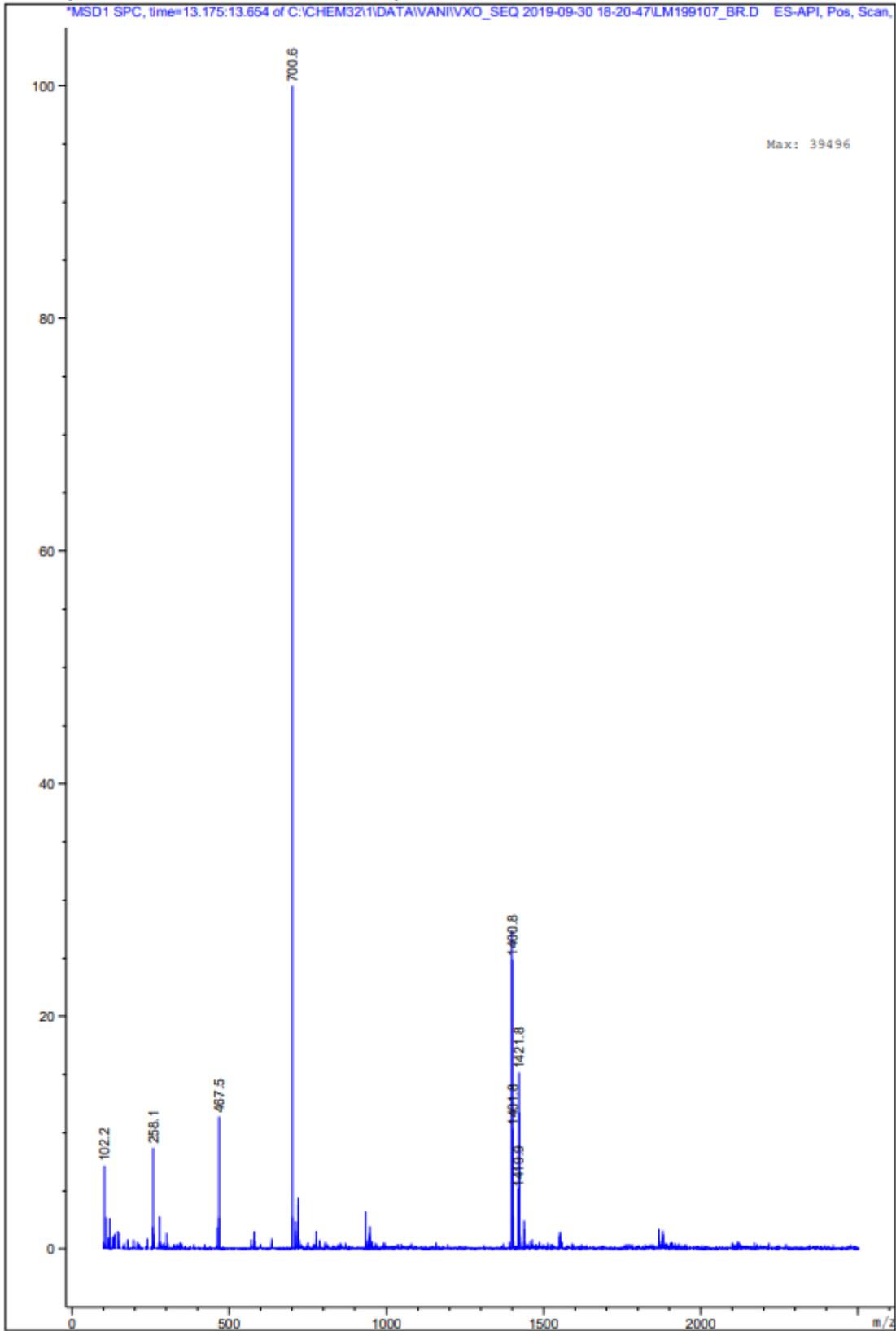
TORRES, M. D. T.; Pedron, C. N.; Higashikuni, Y.; Kramer, R. M.; Cardoso, M. H.; Oshiro, K. G. N.; Franco, O. L.; Silva Junior, P. I.; Silva, F. D.; Oliveira Junior, V. X.; Lu, T. K.; de la Fuente-Nunez, C. **Structure-Function-Guided Exploration of the Antimicrobial Peptide Polybia-CP Identifies Activity Determinants and Generates Synthetic Therapeutic Candidates**. *Communications Biology* 2018, 1, 1–16.

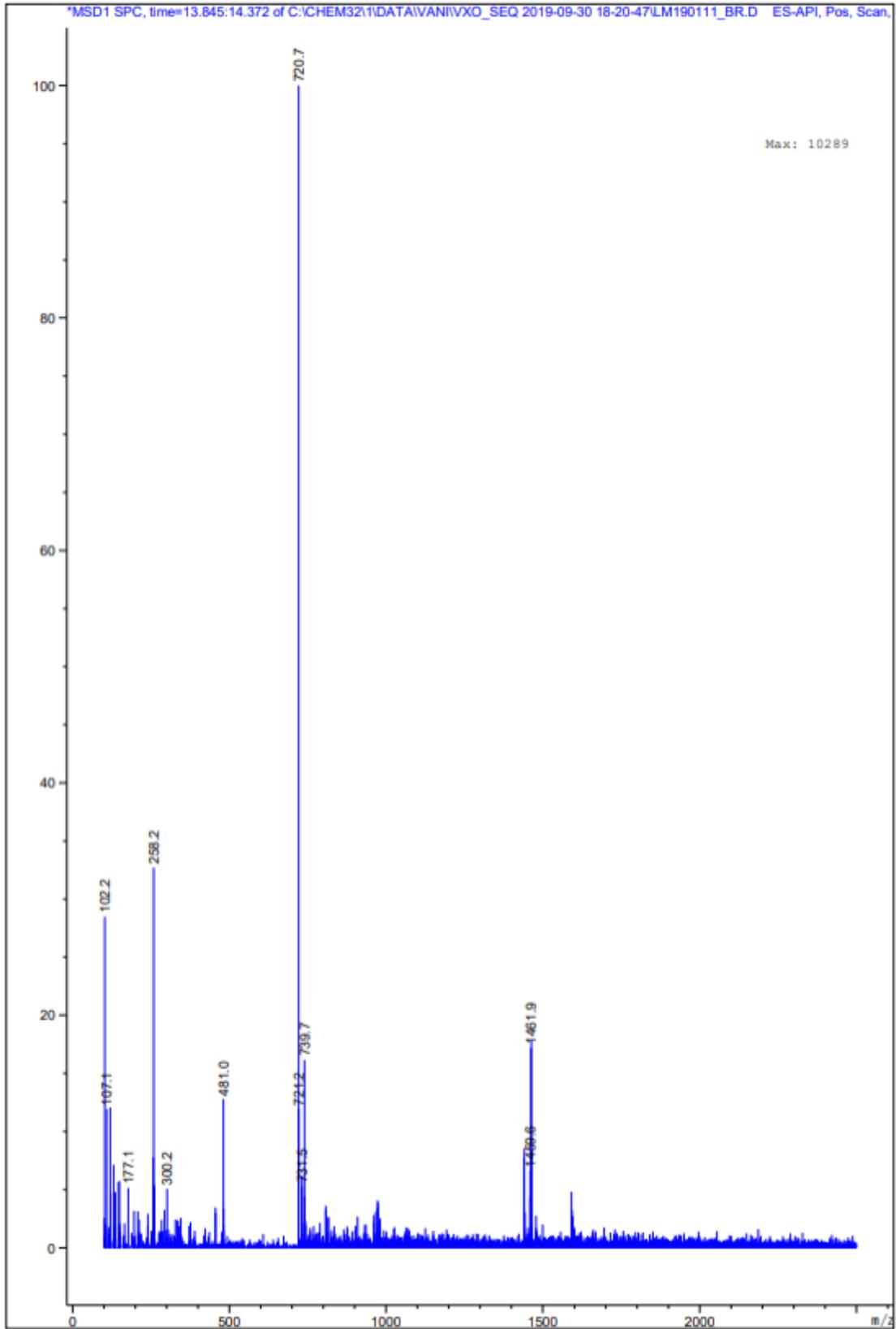
Wade D, Andreu D, Mitchell SA, Silveira AMV, Boman A, Boman HG, Merrifield RB. **Antibacterial activities of temporin A analogs**. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 40, 1992, 429– 436.

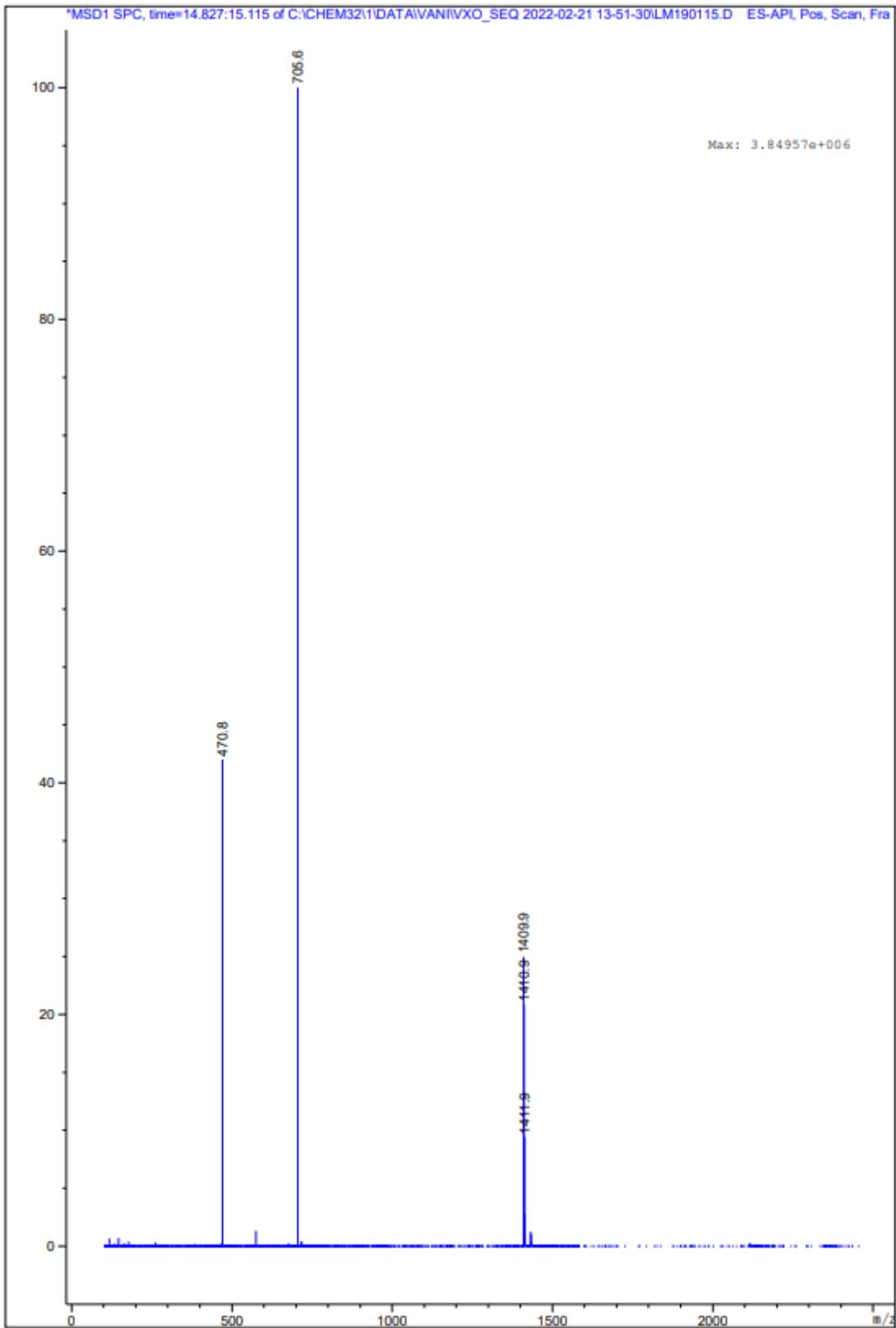
8) Anexos

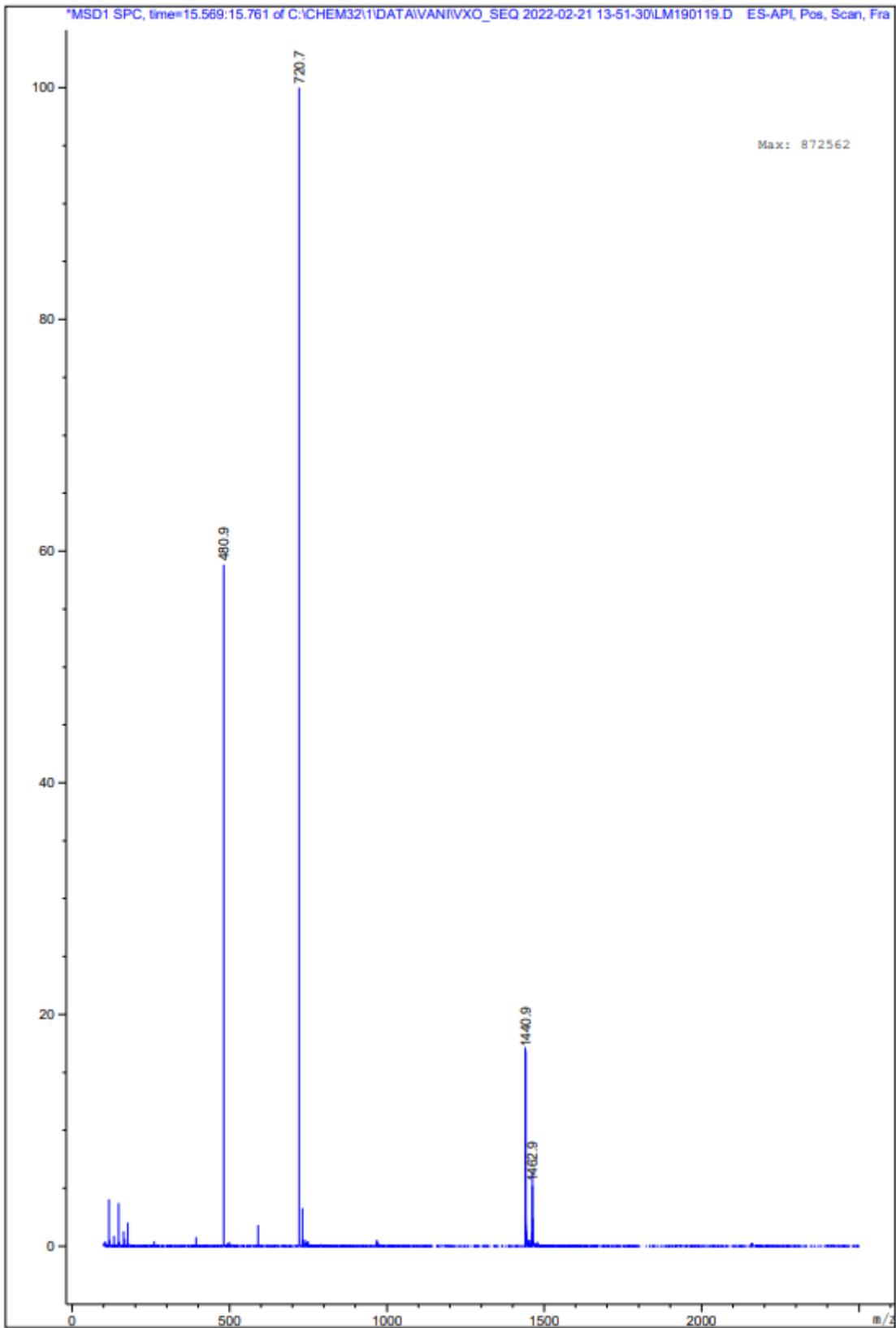
1 – Espectro de Massas da Temp. F nativa. Este e os demais espectros foram obtidos em modo positivo com as seguintes condições: intervalo de massas entre 100 a 2000 m/z, energia iônica de 5.0 V, fluxo de gás nitrogênio de 12,0 L.min⁻¹, aquecimento do solvente de 250 °C, multiplicador de 1.0, capilar de 3.0 kV e voltagem do cone de 35 V.



2 – Espectro de Massas da [K]³ -Temp. F

3- Espectro de massas da [K]⁶ -Temp. F

4- Espectro de Massas da [K]¹⁰ -Temp. F

5 - Espectro de Massas da [K]¹¹ -Temp. F

6- Espectro de Massas da $[K]^3 [K]^{11}$ -Temp. F