



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Tiago Junot Fontes Graça

**AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO Hs17 COMO AGENTE
ANTIMICROBIANO SELETIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso

Brasília - DF

1º/2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Tiago Junot Fontes Graça

**AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO Hs17 COMO AGENTE
ANTIMICROBIANO SELETIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador(a): Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
1º/2023

“Torna-te aquilo que és”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Aqui se encerra mais uma etapa em minha vida e não poderia estar com outro sentimento a não ser de orgulho e de dever cumprido. Muitas pessoas passaram por esse caminho que eu trilhei e dedico essas palavras a cada uma delas na forma da mais pura gratidão.

Primeiramente gostaria de agradecer minha família, que sempre será minha maior preciosidade. À minha mãe Érica, que sem ela eu não teria nem sido concebido ao mundo. Desde o meu primeiro suspiro recebi todo o amor, carinho e recursos necessários para que eu pudesse ter uma infância saudável, uma escolaridade de qualidade, além de uma vida plena com muito lazer, sempre com muita liberdade e uma relação de confiança. Não seria absolutamente nada sem ela, e por isso os meus mais profundos agradecimentos. À minha saudosa avó Mabel, que sempre será minha segunda mãe e esteve comigo desde o princípio, também me propiciando um ambiente familiar de muito amor e apoio. Ela tem e sempre terá crédito em todas as minhas conquistas. Sentirei saudades eternas. Que você esteja em paz, vovó. Ao meu irmão Pedro, que é e sempre será o meu maior exemplo e um dos pilares centrais da minha vida. Ele representa toda admiração e sabedoria que eu gostaria de ter e é a quem recorro quando preciso de conselhos, por muito tempo foi como se fosse um pai. O último dessa seleta lista não é propriamente da minha família, mas é como se fosse um irmão de outra mãe. Ao Guilber ('Pilpo') que conheci no primeiro semestre da graduação, tornando-se a minha principal companhia nesses quase 5 anos de UnB. Com ele compartilhei todos os tipos de momentos possíveis, bons e ruins, e é o meu laço mais forte da graduação que pretendo manter para o resto da vida. A vocês o meu mais sincero agradecimento. Sei que é impossível mensurar em palavras o valor que vocês têm e sempre terão para mim.

Agradeço ao Professor Guilherme Dotto Brand que foi o primeiro a abrir as portas para mim, mesmo com todas as dificuldades do período pós-pandêmico. Além de um exímio pesquisador, é um excelente orientador, sempre muito solícito, presente, paciente, fornecendo um ambiente muito colaborativo e construtivo no LSAB, instigando nosso senso crítico, o progresso e a multidisciplinaridade das ideias. É sem sombra de dúvidas uma das pessoas mais inteligentes que conheci, e é uma honra poder chamá-lo de meu orientador. Gostaria também de agradecer a Professora Aline Lima de Oliveira Paterno por ter aceitado ser minha orientadora de iniciação científica na ausência do Professor

Guilherme. Foi uma experiência muito construtiva e fundamental para mim, não seria possível sem ela. Sempre foi muito gentil e prestativa para que eu pudesse exercer essa atividade de maneira plena e com todas as questões burocráticas muito bem resolvidas. Não poderia deixar de agradecer ao Professor Gabriel Vignoli, que por mais que os procedimentos que tentamos fazer não terem dado certo (ainda), foi um excelente mentor, sempre com muita paciência e uma didática incrível. Tenho certeza de que seus conhecimentos ainda irão gerar muitos frutos intercolaborativos com o LSAB.

Agradeço também às minhas amigas Linara ('Deusa'), Larissa ('Cavalca'), Sabrina e Larizza por todos os momentos que partilhamos nas disciplinas (muitas vezes perrengues) e fora delas. Vocês foram as minhas parcerias mais firmes e competentes. Espero que em um futuro bem próximo possamos estar trabalhando juntos, porque nos damos muito bem. Devo agradecer também ao Lucas Dornelas que foi meu principal apoio nos surtos durante minha gestão na presidência do CAQUI. Admiro muito a calma, paciência, competência, perseverança e, principalmente, a liderança desse cidadão.

Houve alguns professores e técnicos que merecem meu reconhecimento, pois desempenham sua função tão bem que incentivam os alunos a irem nas aulas e de fato se interessarem pelo assunto. São eles Professor Alexandre Fonseca da divisão da analítica, Professora Maria Márcia Murta da divisão de orgânica e Hugo de Carvalho Farias, técnico do Laboratório de Ensino em Inorgânica. Vocês são exemplo de profissionais e seres humanos e iluminam o caminho dos estudantes, muito obrigado.

Eu não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à Laura, que por mais que não estejamos mais juntos, foi minha companhia nesses tempos sombrios da pandemia. Sempre guardarei as memórias daquela época com muito apreço, carinho e felicidade, além de uma relação de companheirismo. Você foi uma pessoa que ajudou muito no meu amadurecimento e sempre me apoiou em todas as minhas decisões e por tudo isso, o meu mais sincero obrigado. Desejarei sempre o seu melhor.

Agradeço a todos com quem tive a honra de dividir a bancada. À Fernanda Leonel, que me auxiliou diversas vezes na síntese dos peptídeos. Ao João Bueno que foi meu primeiro mentor na síntese dos peptídeos, além de toda a parte de dicróismo circular, desde a quantificação das vesículas até propriamente o dicróismo. Sempre mantivemos uma relação de apoio e ajuda constante, e por isso sou muito grato.

Agradeço aos professores José Roberto de Souza do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA), FM-UnB, ao Professor Marcelo Ramada do Laboratório de Análise de Biomoléculas da Pós-graduação da Universidade Católica

de Brasília e ao Professor Éder Barbosa do Laboratório da Embrapa Agroenergia. Sem a colaboração entre os laboratórios esse trabalho não seria possível. Em especial, gostaria de agradecer à Wanessa Félix, técnica do NuPMIA, que todas as vezes me ajudou, pacientemente, para realizar as purificações dos peptídeos com o HPLC e ao Stefan, da Católica, que sempre se dispôs a liofilizar os peptídeos e realizar os testes MIC.

Mesmo que minha memória tenha falhado, meus mais profundos e sinceros agradecimentos a todos que de qualquer forma tenham colaborado para que esse trabalho fosse executado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
TABELA DE AMINOÁCIDOS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Contextualização do cenário atual	15
1.1.1. Resistência Antimicrobiana	15
1.1.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana	18
1.2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs).....	21
1.2.1. Uma visão geral.....	21
1.2.2. Mecanismos de ação.....	23
1.3. Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs).....	26
1.4. O peptídeo Hs17.....	30
1.5. Seletividade.....	33
1.5.1. Composição de membranas em organismos.....	33
1.5.1.1. A importância e diversidade de membranas	33
1.5.1.2. Células procarióticas	33
1.5.1.3. Células eucarióticas	35
1.5.2. Como avaliar a seletividade de um antimicrobiano.....	37
1.5.3. Possíveis aplicações.....	39
1.5.3.1. Peptídeos antimicrobianos como carreadores de fármacos	39
1.5.3.2. Peptídeos antimicrobianos acoplados com marcadores fluorescentes para identificação de cepas	40
2. OBJETIVOS	42
2.1. GERAL.....	42
2.2. ESPECÍFICOS.....	42
3. METODOLOGIA.....	43

3.1.	Purificação do Hs17 por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	43
3.2.	Análise do Hs17 por espectrometria de massas	43
3.3.	Quantificação do peptídeo Hs17	43
3.4.	Determinação de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do Hs17 contra diferentes bactérias.....	44
3.5.	Obtenção e quantificação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e 2:1 DMPC: DMPG	45
3.6.	Avaliação da estrutura secundária de Hs17 por Dicroísmo Circular (CD).....	46
4.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	47
4.1.	Purificação do Hs17 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	47
4.2.	Análise do Hs17 por espectrometria de massas	48
4.3.	Quantificação do peptídeo Hs17	49
4.4.	Determinação de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do Hs17 contra diferentes bactérias.....	50
4.5.	Avaliação da estrutura secundária de Hs17 por Dicroísmo Circular (CD).....	52
5.	<i>CONCLUSÕES</i>	57
6.	<i>PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	58
7.	<i>REFERÊNCIAS</i>	59
	<i>ANEXO</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN Acetonitrila

AMP Peptídeo Antimicrobiano

CD Dicroísmo Circular

CL Cardiolipina

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CPP Peptídeos Penetradores de Células

DMPC Dimiristroil Fosfatidilcolina

DMPG Dimiristroil Fosfatidilglicerol

DP Desvio-Padrão

DSC Calorimetria de Varredura Diferencial

GluNAc N-acetilglicosamina

hBD1 b-defensin 1

HCA Análise Hierárquica de Agrupamento

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Hs IAP *Homo sapiens* Peptídeo Antimicrobiano Intragênico

IAP Peptídeo Antimicrobiano Intragênico

LPS Lipopolissacarídeo

LSAB Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas

LUV Vesícula Unilamelar Grande

MBC Concentração Bactericida Mínima

MDR Microrganismos Multirresistentes

MIC Concentração Inibitória Mínima

MRE Elipcidade Residual Média

MS Espectrometria de Massa

MurNAc N-acetilmurâmico

OM Membrana Externa

OMS Organização Mundial da Saúde

PAN-BR Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única

PBS Tampão Fosfato Salino

PCA Análise do Componente Principal

PC Fosfatidilcolina

PE Fosfatidiletanolamina

PG Fosfatidilglicerol

PS Fosfatidilserina

RAM Resistência Antimicrobiana

SM esfingomiéline

SMH Shai-Matsuzaki-Huang

SPPS Síntese de Peptídeo em Fase Sólida

SPR Ressonância Plasmônica de Superfície

TFA Ácido Trifluoroacético

BODIPY 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

UTI Unidade de Tratamento Intensivo

UV-Vis Ultravioleta-Visível

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo de três letras	Símbolo de uma letra	Carga isotópica
Alanina	Ala	A	71,037
Cisteína	Cys	C	103,009
Ácido aspártico	Asp	D	115,026
Ácido Glutâmico	Glu	E	129,042
Fenilalanina	Phe	F	147,068
Glicina	Gly	G	57,021
Histidina	His	H	137,058
Isoleucina	Iso	I	113,084
Lisina	Lys	K	128,094
Leucina	Leu	L	113,084
Metionina	Met	M	131,04
Asparagina	Asn	N	114,042
Prolina	Pro	P	97,052
Glutamina	Glu	Q	128,058
Arginina	Arg	R	156,101
Serina	Ser	S	87,032
Treonina	Thr	T	101,047
Valina	Val	V	99,068
Triptofano	Trp	W	186,079
Tironisa	Tyr	Y	163,063

RESUMO

Diante do cenário problemático causado pela ascensão de bactérias multirresistentes (MDR), torna-se fundamental a busca por novas moléculas antibacterianas, já que os antibióticos convencionais estão cada vez menos efetivos. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas constituintes dos mecanismos de defesa de muitos organismos, mostrando ser menos propensos a induzir resistência microbiana. Esses possuem certos padrões estruturais e físico-químicos que permitem que interajam preferencialmente com membranas de carga negativa, como aquelas encontradas em microrganismos procariotos. Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram estudados fragmentos encriptados em proteínas, com características físico-químicas similares aos AMPs, que também apresentam atividades antimicrobianas, os peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs). Recentemente foi feita uma varredura pelo proteoma humano e alguns desses fragmentos foram estudados. Dentre eles, o peptídeo Hs17 mostrou ser um eficiente agente antimicrobiano contra uma cepa bacteriana Gram-negativa (*E. coli*) de maneira seletiva, pois não apresentou interação mensurável com membranas de células eucarióticas. Tal seletividade é incomum entre AMPs e, especialmente, em IAPs. O presente trabalho visa ampliar a caracterização desse peptídeo para melhor compreender sua interação seletiva com membranas bacterianas. Para isso, foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e bactericida (MBC) para ampliar a caracterização de seu espectro antimicrobiano, além de estudos de dicroísmo circular (CD) para estudar a estrutura secundária do peptídeo frente a vesículas unilamelares grandes (LUVs) que mimetizam membranas procarióticas e membranas eucarióticas. Os resultados confirmaram que o IAP Hs17 é mais ativo contra cepas de bactérias Gram-negativas, com destaque para *Acinetobacter baumannii*, um importante agente patogênico humano. Além disso, o Hs17 não se estruturou frente a LUVs de DMPC (mimetizando células eucarióticas), estruturando-se em α -hélice ao interagir com LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, as quais mimetizam a composição fosfolipídica da membrana células procarióticas. Pretende-se, com o presente trabalho, compreender melhor as propriedades físico-químicas que conferem seletividade à IAPs, de forma a obter moléculas mais seletivas que sirvam tanto para o combate direto de microrganismos patogênicos quanto para o carreamento de fármacos conjugados.

Palavras-chave: Peptídeo, Hs17, AMP

ABSTRACT

Faced with the problematic scenario caused by the rise of multidrug-resistant bacteria (MDR), the search for new antibacterial molecules is essential, since conventional antibiotics are becoming less and less effective. Antimicrobial peptides (AMPs) are constituent molecules of the defense mechanisms of many organisms, showing to be less likely to induce microbial resistance. These have certain structural and physicochemical patterns that allow them to preferentially interact with negatively charged membranes, such as those found in prokaryotic microorganisms. In previous works by our research group, fragments encoded in proteins were studied, with physicochemical characteristics similar to AMPs, which also present antimicrobial activities, the antimicrobial intragenic peptides (IAPs). Recently, the human proteome was scanned and some of these fragments were studied. Among them, the Hs17 peptide proved to be an efficient antimicrobial agent against a Gram-negative bacterial strain (*E. coli*) in a selective manner, since it did not show measurable interaction with membranes of eukaryotic cells. Such selectivity is uncommon among AMPs and especially IAPs. The present work aims to expand the characterization of this peptide to better understand its selective interaction with bacterial membranes. For this, minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) assays were carried out to broaden the characterization of its antimicrobial spectrum, in addition to circular dichroism (CD) studies to study the secondary structure of the peptide against large unilamellar vesicles (LUVs).) that mimic prokaryotic membranes and eukaryotic membranes. The results confirmed that IAP Hs17 is more active against Gram-negative bacterial strains, especially *Acinetobacter baumannii*, an important human pathogenic agent. Furthermore, Hs17 was not structured against DMPC LUVs (mimicking eukaryotic cells), structuring itself in an α -helix when interacting with 2:1 DMPC:DMPG LUVs, which mimic the phospholipid composition of prokaryotic cell membranes. The aim of this work is to obtain a deeper understanding of the physicochemical properties that confer selectivity to IAPs, in order to obtain more selective molecules that serve both for the direct combat of pathogenic microorganisms and for the transport of conjugated drugs.

Keywords: Peptide, Hs17, AMP

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização do cenário atual

1.1.1. Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema iminente e por muitos anos mundialmente negligenciado (ALEKSHUN; LEVY, 2007) Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência microbiana é um grave problema de saúde pública e está relacionada ao aumento do tempo de internação, dos custos de tratamento e das taxas de morbimortalidade dos pacientes, sendo que, o uso dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar associado a práticas inadequadas de controle de infecção, são reconhecidamente fatores de risco para seleção e disseminação da resistência antimicrobiana (O'NEILL, 2016).

Estima-se que anualmente nos Estados Unidos (EUA) e na Europa (EU) 25 mil pessoas morram por ano devido a infecções causadas por microrganismos multirresistentes (MDR) enquanto na China este número pode chegar a 100 mil (GLASS, 2016). De acordo com a OMS, se a situação não mudar, a resistência antimicrobiana pode causar 10 milhões de mortes a cada ano até 2050 e danos catastróficos à economia, assim como, estima-se que até 2030 cerca de 24 milhões de pessoas poderiam ser forçadas à pobreza extrema (BRASIL, 2018). Mesmo que a transmissão de microrganismos multirresistentes seja reportada com maior frequência em unidades críticas, de cuidados intensivos, todos os serviços de saúde são afetados pela seleção e disseminação de MDR (ORSI, 2011).

A RAM ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas sofrem alterações ao longo do tempo e deixam de responder a medicamentos aos quais anteriormente eram susceptíveis. O agravamento deste cenário foi observado no contexto da pandemia do Covid-19, devido ao uso indiscriminado dos antibióticos (CORRÊA, 2022). A infecção é oriunda da presença do novo Coronavírus, SARS-CoV-2, um RNA-vírus zoonótico, de fita simples, descoberto no final de 2019 após um surto de pneumonia desconhecida em Wuhan, na China (WANG et al, 2020). Esse sintoma, então, justificou o uso dos antibióticos no tratamento da doença, mesmo sem a confirmação de coinfeção bacteriana, já que os sintomas são semelhantes às pneumonias bacterianas (HUTTNER et al, 2020).

A terapia antimicrobiana foi aplicada não só pela comunidade médica, em ambiente hospitalar, mesmo sem o embasamento científico de sua eficácia no tratamento

da COVID-19, mas também pela população leiga que fez uso da automedicação (GUIMARÃES, CARVALHO, 2020). Além disso, no Brasil, antibióticos foram inseridos no chamado kit-Covid e como consequência, a azitromicina, antibiótico já utilizado nos serviços de saúde, teve maior prescrição e venda ao longo de 2020 no país como um dos componentes do kit-Covid (MELO, 2021).

Outros estudos afirmam que os antibióticos foram prescritos em cerca de 59% dos casos de internação por COVID-19, independentemente da presença de infecção bacteriana, o que, mediante o potencial de adaptação e produção de mecanismos de resistência destes microrganismos, embasa a preocupação dos profissionais de saúde quanto ao aumento da ameaça de uma nova pandemia, desta vez causada por bactérias pan-resistentes, ou seja, resistentes a todas as classes de antimicrobianos disponíveis no mercado (WEI et al, 2020).

Estudos feitos no “Hospital IRCCS San Raffaele” em Milão (Itália) relataram a incidência de infecções bacterianas secundárias em relação aos pacientes positivados com SARS-CoV-2 internados precocemente em UTIs, sendo 9,3% de um total de 731 indivíduos. Em razão aos números que os profissionais obtiveram do estudo, foi concluído que houve uma alta incidência de infecções secundárias entre os pacientes com coronavírus, atribuindo aos agentes bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos, principalmente, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* (RIPA et al., 2021). Essas infecções secundárias se instalam em pacientes com sistema imunológico debilitado ou em pacientes em tratamento por uma infecção primária, como o caso da Covid-19. Com isso, mais uma motivação para o início do tratamento profilático de antibióticos, uma vez que os sintomas apresentados pelos pacientes requerem esse tipo de medicação (RAWSON et al., 2020), (HUTTNER; CATHO; PANO-PARDO; PULCINI; SCHOUTEN, 2020).

Os antibióticos mais utilizados no tratamento dos pacientes internados com Covid-19 foram Azitromicina, Claritromicina, Amoxicilina, que são antibióticos empíricos utilizados em casos leves, e foram utilizados antibióticos de largo espectro, para os casos graves. Entretanto, é importante ressaltar que o uso inadequado desses antibióticos como medida profilática, na tentativa de eliminar uma ampla gama de bactérias, pode estimular a resistência antimicrobiana (HSU, 2020).

As bactérias, assim como outros microrganismos, possuem alta capacidade de sofrer mutações e adquirir genes de resistência, se tornando resistentes aos antimicrobianos. O amplo uso de antimicrobianos implica em pressão seletiva de modo

que as cepas mais resistentes persistem, propagam-se, acumulando mecanismos de resistência (MAGIORAKOS et al. 2012). Tais mecanismos serão mais bem discutidos na sessão a seguir (1.1.2). A Azitromicina, por exemplo, droga pertencente à classe dos macrolídeos, é empregada para inibir a replicação viral e atuar como imunomodulador, diminuindo a gravidade dos casos da Covid-19 (IRIARTE, 2020). A principal ação bacteriana contra os macrolídeos é pela modificação do alvo efetor dessa classe nos ribossomos. As mutações observadas em bactérias resistentes impedem que o macrolídeo se ligue ao ribossomo e assim interrompa a translocação da cadeia peptídica. (IRIARTE, 2020). Um exemplo dessa ação são as bactérias Gram negativas que podem possuir diferentes porinas em sua membrana celular que bloqueiam a entrada da Azitromicina para a zona citoplasmática (IRIARTE, 2020).

Em 2018, antes mesmo da pandemia, formalizou-se uma agenda nacional, com a publicação do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) (BRASIL, 2018). A formulação do PAN-BR representa um avanço no reconhecimento da necessidade de uma abordagem multidisciplinar e multissetorial da RAM (CORRÊA, 2022). Dentre os principais desafios para sua implementação, destacam-se: a instituição de uma política sustentável, a execução descentralizada das atividades de controle, prevenção e monitoramento e o investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação para produção de antimicrobianos, métodos diagnósticos e vacinas por meio do acesso universal e equitativo (ESTRELA, 2018). Sendo assim, mais estudos são necessários para demonstrar a correlação da doença com a resistência, contribuindo para a resolução e estabelecendo novos caminhos para tratar patógenos comumente observados em infecções secundárias, a fim de evitar uma crise de saúde devido à resistência antimicrobiana (MINANTE, 2022).

1.1.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana

A questão da resistência pode ser encarada como uma equação de dois componentes: o antibiótico ou antimicrobiano, que inibe o crescimento de organismos suscetíveis e seleciona os resistentes, além da determinante de resistência genética selecionados pelo antimicrobiano (LEVY, 1994). Genes de resistência selecionados e seus hospedeiros se propagam sob contínua seleção antimicrobiana a fim de ampliar e estender o problema para outros hospedeiros e outras localizações geográficas (LEVY & MARSHALL, 2004).

A resistência antimicrobiana aos antibióticos pode ser atingida por meio de mecanismos intrínsecos ou adquiridos (ALEKSHUN et al. 2007) (Figura 1). Os mecanismos intrínsecos são aqueles caracterizados pela ocorrência natural de genes encontrados no hospedeiro, como AmpC β -lactamase de bactérias Gram-negativas e muitos sistemas de fluxo MDR (ALEKSHUN et al. 2007). Já os mecanismos adquiridos envolvem mutações em genes-alvo de antibióticos e a transferência de determinantes de resistência transmitidos por plasmídeos, bacteriófagos, transpósons e outros materiais de genes móveis (ALEKSHUN et al. 2007) (Figura 1).

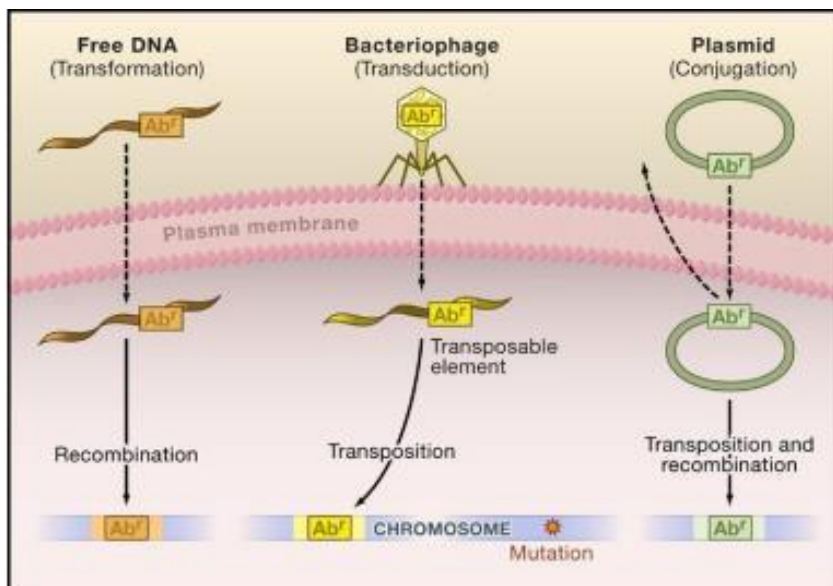


Figura 1: Aquisição de resistência antimicrobiana. As bactérias podem se tornar resistentes a antibióticos (Ab^r) por mutação do gene alvo no cromossomo. Eles podem adquirir material genético externo incorporando segmentos de DNA livres em seus cromossomos (transformação). Os genes também são transferidos após infecção por bacteriófago (transdução) e através de plasmídeos e transposons conjugativos

durante a conjugação. O elemento transponível de termo geral foi usado para designar (1) uma sequência de inserção, (2) transposomo composto (composto), complexo e conjugado, (3) transposição de bacteriófago, ou (4) integron (ALEKSHUN et al. 2007).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas evolutivamente conservadas, envolvidas em mecanismos de defesa de uma ampla variedade de organismos (GUANÍ-GUERRA, 2010). Normalmente são moléculas catiônicas e anfifílicas que adotam padrões estruturais quando interagem com membranas polianiônicas, como as de bactérias, em que as cadeias laterais segregam-se em regiões distintamente opostas da conformação enovelada, promovendo a inserção e ruptura da membrana citoplasmática, levando à morte das bactérias (ZASLOFF, 2002). Essas moléculas têm sido alvo de estudo como novos tratamentos terapêuticos e serão melhor descritas na seção 1.2. Por mais que a resistência antimicrobiana se dê em um grau menor para essas moléculas, elas não são isentas de tal acontecimento. A seguir serão descritos alguns mecanismos que as bactérias adotam para contornar os efeitos de um AMP.

Modificações da membrana relacionadas à resistência ao AMP

A membrana externa (OM) bacteriana e as arquiteturas da membrana interna podem ser alteradas e os locais para a ligação dos AMPs podem ser protegidos em resposta a níveis reduzidos de Ca^{2+} e Mg^{2+} , proteínas específicas e mudanças na composição lipídica. Isso reduz consideravelmente a fluidez da membrana e sua permeabilidade (ANDERSSON et al, 2016).

O conteúdo de fosfolípidos da membrana bacteriana, como fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL), reflete um estado global de proteção contra a formação de poros (ZHANG et al, 2014). A biossíntese, ‘turnover’ e translocação de fosfolípidos para locais alvo na membrana podem ser modulados pela expressão de proteínas intimamente relacionados à resistência contra AMPs (PARACHIN & FRANCO, 2014). Além disso, afinidade celular entre a membrana e os AMPs pode ser consideravelmente reduzida ao se minimizar a carga negativa da bicamada fosfolipídica, isto é, sua composição (MARIA-NETO et al, 2015).

Resistência bacteriana relacionada com modificações na parede celular

Modificações na bicamada polisacarídica de peptidoglicano e ácidos teicóicos na parede celular são um dos recursos mais prolíficos de bactérias Gram-positivas (CUNHA, 2017). As interações entre o AMP e a parede celular podem ser evitadas em *S. aureus* e *Staphylococcus xylosus*, que apresentam múltiplas cópias do ‘operon dlt’, uma sequência reguladora, que ao ser ativada promove a D-alanilação dos ácidos teicóicos na parede celular, reduzindo suas cargas aniônicas (KRISTIAN et al, 2005). Em algumas bactérias Gram-negativas, a afinidade dos lipopolissacarídeos (LPS) na OM por AMPs catiônicos pode ser reduzida pelo aumento de lipídeo A carregado positivamente com substituintes como palmitato, fosfoetanolamina e 4-amino-4-desoxi-L-arabinose em 1 ou 40 grupos fosfato (RAETZ & WHITFIELD, 2002).

Costuma-se afirmar que, em bactérias, quanto mais espessa a parede celular, menos eficiente é o antibiótico e, por consequência, um AMP também será. Sendo assim, melhorar a parede celular é uma estratégia adotada pelo *S. aureus* contra eritromicina, vancomicina, acriflavina e muitos outros AMPs. A camada de peptidoglicano da parede celular pode aumentar de espessura pela regulação positiva da síntese de glutamina em cepas de *E. coli* que são resistentes à mangainina II (HENDERSON et al, 2014).

Resistência bacteriana relacionada com modificações no metabolismo

Algumas bactérias possuem um arsenal de moléculas que impedem o metabolismo celular de sofrer o estresse causado pelos AMPs. Uma porção de vias pode ser reguladas para cima ou para baixo para aumentar a biossíntese de proteases, modificações de locais de membrana reconhecíveis por AMPs, superprodução de biofilmes e supressão de elementos superficiais relacionados à formação de poros (MARIA-NETO et al, 2015).

Um mecanismo de resistência ao AMP pelas bactérias é a clivagem proteolítica parcial ou total dos AMPs. Cepas de *S. aureus* que superproduzem a metaloprotease aureolisina são resistentes à catelicidina. *Proteus mirabilis* ao produzir grandes quantidades da metaloprotease ZapA pode evitar a atividade antimicrobiana do ‘b-defensin 1’ (hBD1), simplesmente por quebrar a proteína em seis ou nove peptídeos inócuos (JUSKO et al, 2012).

Sendo assim, bactérias adotam inúmeras estratégias para evitar o efeito letal dos antibióticos. A elucidação desses mecanismos de resistência pode auxiliar na criação de novos medicamentos. É fundamental ter a ciência da fluidez do genoma microbiano e a

relativa facilidade pela qual a resistência pode surgir por meio de mutação ou aquisição de gene. A descoberta de novos agentes necessários para curar doenças infecciosas vem pelo reconhecimento deste potencial para o aparecimento de resistência. (ALEKSHUN et al. 2007)

1.2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)

1.2.1. Uma visão geral

Dado o problema das bactérias MDR para a saúde pública, torna-se fundamental a busca por novas estratégias antibacterianas, sabendo que os antibióticos convencionais estão cada vez mais inefetivos, como um resultado da resistência (FJELL et al, 2012). AMPs são armas evolutivamente antigas (ZASLOFF, 2002). Produzidos em insetos, plantas, bactérias e vertebrados, os peptídeos antimicrobianos protegem contra uma ampla gama de agentes infecciosos (GUANÍ-GUERRA, 2010). Em mamíferos, esses peptídeos protegem contra bactérias, vírus, fungos e alguns parasitas (GUANÍ-GUERRA, 2010).

A sua ampla distribuição nos reinos vegetal e animal sugere que os AMPs desempenharam um papel fundamental na evolução bem-sucedida de organismos multicelulares (ZASLOFF, 2002). E contradizendo a crença de que bactérias, vírus e fungos podem e irão desenvolver resistência a qualquer substância concebível, os AMPs mantiveram-se como armas defensivas eficazes, apesar de sua linhagem antiga (ZASLOFF, 2002). Notavelmente, o desenvolvimento de resistência contra os AMPs se deu em um grau muito inferior, já que esses normalmente atuam atacando múltiplos alvos polianiônicos ou hidrofóbicos (FRIEDRICH, 2001). Sendo assim, é mais difícil de obter mutações que confirmam resistência à AMPs e métodos de testes, como por exemplo passagens múltiplas com metade do MIC (concentração inibitória mínima) de AMPs, são necessários para o desenvolvimento de qualquer resistência (PERRON, 2006). Dessa forma, essas moléculas ancestrais são componentes cruciais no sistema imune e atraem candidatos para novos tratamentos terapêuticos (GUANÍ-GUERRA, 2010).

AMPs podem ser classificados com base em suas estruturas secundárias, em que há quatro classes principais: folha- β , α -hélice, loop e peptídeos estendidos (HANCOCK & LEHER, 1998), representadas na Figura 2 (retirada e adaptada de POWERS & HANCOCK, 2003). A característica estabelecida de uma ampla gama de AMPs é o compartilhamento de propriedades anfífilas e catiônicas, o que permite interações com

as membranas carregadas negativamente (SCHMITT, 2015).

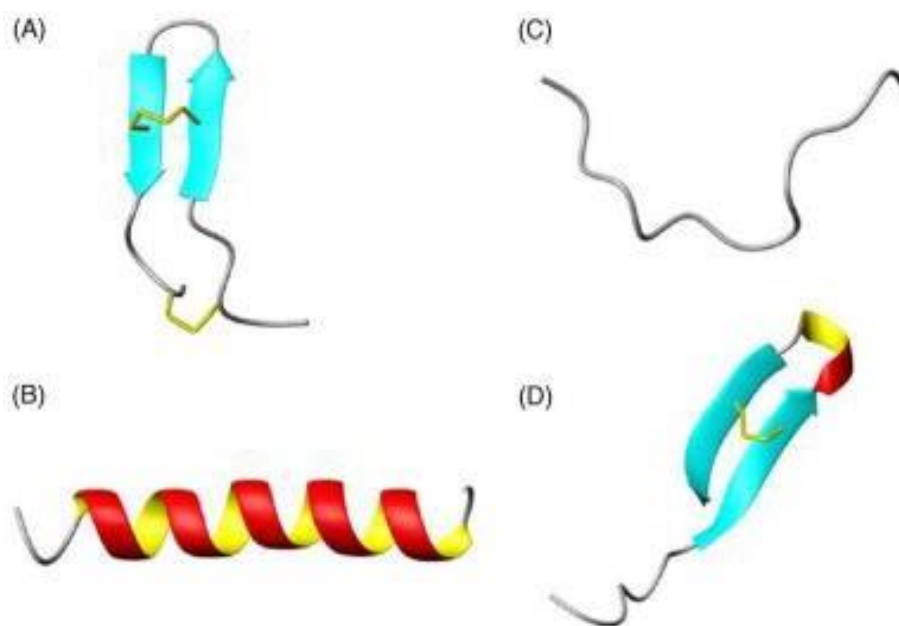


Figura 2: Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos: (A) Folha- β , tachyplesin I (LAEDERACH, 2002); (B) α -hélice, magainin 2 (GESELL, 1997); (C) Estendido, indolicidin (ROZEK, 2000); (D) Loop, thanatin (MANDARD et al, 2000). Ligações dissulfeto são indicadas em amarelo. Figura preparada com MOLMOL (KORADI, 1996). Imagem retirada e adaptada de POWERS & HANCOCK, 2003.

As interações de um AMP com a membrana não podem ser explicadas por um motivo sequencial particular de aminoácidos, elas se originam da combinação de características físico-químicas e padrões estruturais (BOMAN, 2003), como tamanho, composição de resíduos, carga líquida total, estrutura secundária, hidrofobicidade e caráter anfifílico (HALL, 2004). Essa capacidade de adotar conformações anfipáticas ou anfifílicas, muitas vezes induzidas pela interação com membranas citoplasmáticas ou miméticas (POWERS & HANCOCK, 2003), em que as cadeias laterais catiônica/hidrofílica e hidrofóbica segregam-se em regiões ou faces distintamente opostas da conformação enovelada. Esta topologia aparenta ser importante para a inserção e ruptura da membrana citoplasmática, levando à morte das bactérias (ZASLOFF, 2002). Este simples mecanismo físico de ação resultou em uma propensão relativamente baixa para o desenvolvimento de resistência (TEW, 2010).

A estrutura tridimensional de um AMP tem implicações para o mecanismo de sua atividade antimicrobiana, pois a conformação fornece informações sobre as interações intermoleculares que governam a ligação ao seu alvo biológico (HANEY et al, 2009). O

tema comum ao analisar a solução de muitos peptídeos antimicrobianos é que esses peptídeos não são estruturados em solução aquosa e que normalmente só adotam uma estrutura bem definida quando interagem com a membrana bacteriana (HANEY et al, 2009). Apesar de AMPs manifestarem uma grande diversidade estrutural, alguns padrões estruturais estão presentes, sendo a folha- β e a α -hélice as estruturas mais encontradas (HANCOCK & LEHER, 1998).

1.2.2. Mecanismos de ação

De maneira geral, os mecanismos de ação dos AMPs podem ser classificados em dois grupos (i) os mecanismos disruptivos de membrana, associados com a lise da membrana; e (ii) os mecanismos não disruptivos de membrana, em que o foco está na neutralização de alvos intracelulares (MALANOVIC & LOHNER, 2016). O primeiro passo para qualquer mecanismo é a interação entre o AMP e a membrana citoplasmática (CUNHA 2017). A força geradora dessa interação é a força eletrostática apresentada entre o AMP, sendo catiônico, e a superfície polianiônica da bactéria (NGUYEN, L.T. et al, 2011). Além disso, sua conformação, sendo anfifílica, aparenta ser importante para a inserção e ruptura da membrana citoplasmática das bactérias, levando à morte celular (ZASLOFF, 2002).

Acredita-se que a seletividade de AMPs se dá em razão das diferenças entre as composições dos fosfolípidos de membranas de bactérias e mamíferos (TEW, 2010). Membranas bacterianas possuem uma fração relativamente grande (maior do que 20 mol %) de lipídeos carregados negativamente e mantêm altos gradientes de potencial elétrico (com um potencial de transmembrana ($\Delta\psi$) de aproximadamente -120 mV) que atraem substâncias carregadas positivamente, como AMPs, enquanto membranas de plantas e animais são ricas em colesterol e lipídeos, não têm carga líquida e mantêm um fraco $\Delta\psi$ (FJELL, 2012).

Os mecanismos disruptivos são divididos em quatro modelos clássicos: (i) modelo 'toroidal', (ii) modelo tapete (Figura 3), (iii) modelo tapete ou detergente (Figura 3) e (iv) modelo 'barrel' (Figura 3) (CUNHA, 2017). Recentemente, novos modelos disruptivos foram descritos: (i) modelo 'toroidal' desordenado (Figura 3), (ii) modelo de afinamento de membrana, (iii) modelo de agrupamento de lipídeos carregados, (iv) modelo intermediário sem bicamada, (v) modelo de direcionamento de lipídeos oxidados, (vi) modelo transportador de ânions, (vii) modelo de despolarização da membrana não

lítica e (vii) modelo de eletroporação (CUNHA, 2017). Todos os modelos não são mutuamente exclusivos, permitindo que um único AMP possa apresentar uma estratégia envolvendo múltiplos mecanismos simultâneos (CUNHA, 2017).

No modelo ‘toroidal’, o AMP se liga à membrana e forma um canal de translocação “flip-flop” que abre a membrana verticalmente, com o AMP permanecendo intimamente associado aos grupos de cabeça lipídica durante todo o processo (SHRUTI et al, 2016). O modelo carpete proporciona o rompimento da membrana sem a internalização do AMP. No entanto, o AMP permanece associado com a membrana até que uma concentração crítica do peptídeo contribua para enfraquecer as interações hidrofóbicas dos fosfolípídeos estruturais, com os AMPs formando uma estrutura de tapete que aumenta a ruptura da membrana (SHRUTI et al, 2016). No modelo detergente, os AMPs têm um papel similar a um detergente, entrelaçando os fosfolípídeos, desagregando-os. Dependendo do AMP e da composição da membrana, esse modo de ação não proporciona o rompimento da membrana. Ao invés, forma um estreito canal para a passagem do AMP e de outras moléculas para dentro da célula (MALANOVIC & LOHNER, 2016). O modelo ‘barrel’ fornece a formação de um agregado regularmente organizado de AMPs que interage e se associa com a membrana. O oligômero do AMP leva à formação de poros na bicamada lipídica interagindo intimamente suas cadeias hidrofóbicas da membrana. Os poros transmembrana permitem a internalização da parte hidrofílica do AMP que está voltada para a região interna da membrana (NGUYEN et al, 2011). Por último, o modelo ‘toroidal’ desordenado. Esse modo de ação fornece uma formação estocástica de poros após distorção lipídica para dentro que permite a agregação de no máximo dois peptídeos no centro do poro. Mas na região periférica externa do poro, muitos peptídeos são configurados antes da translocação (NGUYEN et al, 2011; SHRUTI et al, 2016).

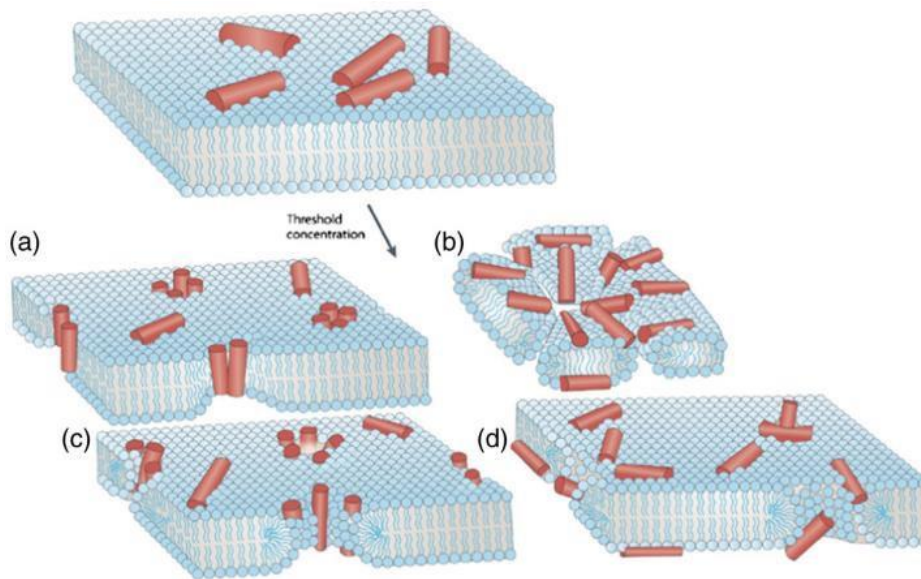


Figura 3: Mecanismos de ruptura de membrana de AMPs propostos incluem (a) modelo ‘barrel-stave’, (b) modelo carpete, (c) modelo ‘toroidal pore’ e (d) modelo ‘toroidal pore’ desordenado. Imagem tirada e adaptada de ONG et al, 2014.

Os mecanismos disruptivos estão relacionados com a interferência na biossíntese associada à membrana, síntese macromolecular no citoplasma e funções metabólicas (HANCOCK & SAHL, 2006). Existem duas maneiras diferentes de um AMP entrar na célula (CUNHA, 2017). A primeira é uma translocação espontânea obscura através da membrana; o outro é principalmente resultado da presença de uma estrutura secundária no AMP que causa a permeabilização da membrana. Nesse método, denominado de Shai-Matsuzaki-Huang (Figura 4), um AMP α -helicoidal se liga paralelamente à membrana. Resíduos hidrofóbicos voltados para a membrana permitem a permeabilização de parte dos AMPs e a mudança de sua organização para o modo transversal formando poros toroidais (NGUYEN et al, 2011; MALANOVIC & LOHNER, 2016).

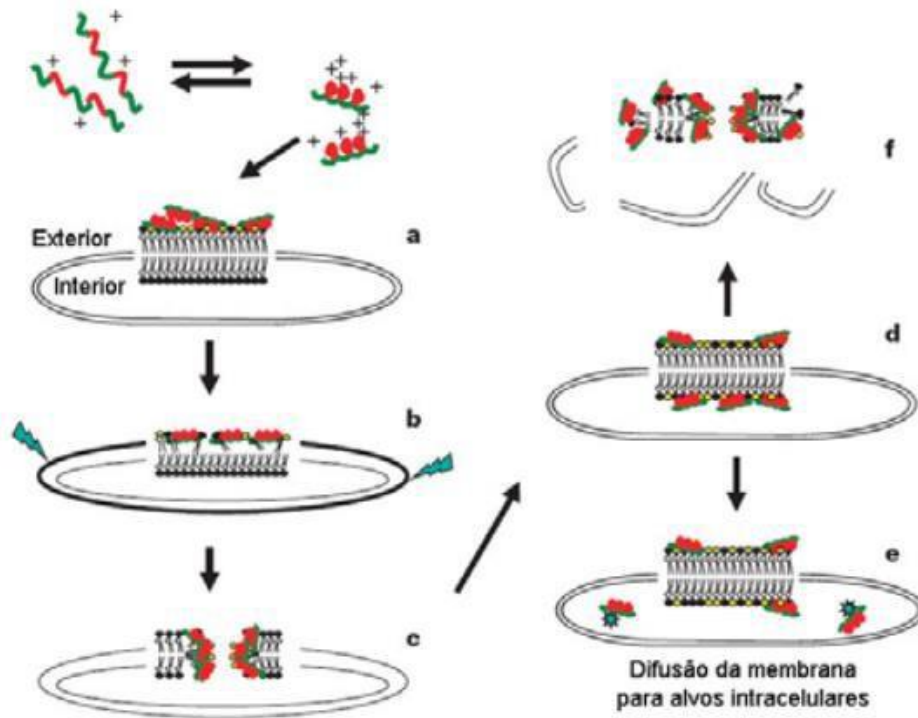


Figura 4: Modelo SMH de ação de peptídeos antimicrobianos. Um peptídeo em α -hélice é representado. **A.** Recobrimento em forma de tapete da face externa da membrana. **B.** Integração do peptídeo na membrana e achatamento da face externa. A área da face externa expande-se em relação à face interna (apontado pelas setas). **C.** Transição de fase e formação de poros transitórios. **D.** Transporte de peptídeos e fosfolípidos para a face interna da membrana. **E.** Difusão dos peptídeos para alvos internos (em alguns casos). **F.** Colapso da membrana em fragmentos e ruptura física da membrana celular do alvo. Fosfolípidos ácidos possuem grupamentos “cabeça” representados em vermelho os resíduos positivos e em verde os resíduos hidrofóbicos. Imagem retirada e modificada de ZASLOFF, 2002.

1.3. Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs)

Partindo da premissa de que existe uma riqueza de peptídeos biologicamente ativos que podem estar presentes dentro das proteínas, Brand (2012) e colaboradores descrevem uma metodologia para encontrar peptídeos antimicrobianos encriptados em sequências de proteína. Esse trabalho introduz uma metodologia baseada na filtragem *in silico* de fragmentos antimicrobianos putativos de proteínas, associados com testes biológicos, permitindo categorizar os peptídeos em grupos de diferentes graus de afinidade para membranas biológicas e selecionar novas sequências de AMPs codificadas em proteínas maiores. Essa metodologia se baseou no desenvolvimento de um software exploratório,

chamado de Kamal (<http://www.cenargen.embrapa.br/kamal/>), como uma ferramenta primária para descobrir essas sequências antimicrobianas encriptadas com base na semelhança físico-química com AMPs conhecidos (BRAND et al. 2012). O Kamal realiza uma digestão *in silico* de proteínas, derivadas de bases de dados, em uma janela deslizante de fragmentos peptídicos de comprimento definido. Estes então são filtrados usando como critério sequências-base para identificar um conjunto de peptídeos candidatos com atividades potencialmente desejáveis (BRAND et al. 2012).

Alguns desses peptídeos foram sintetizados quimicamente e foram submetidos à interação com vesículas unilamelares (LUVs) compostas de DMPC e 2:1 DMPC: DMPG por meio de calorimetria diferencial de varredura (DSC), a fim de analisar o comportamento da fase termotrópica das membranas e dicroísmo circular (CD) para determinar o efeito da interação com a membrana na estrutura secundária do peptídeo (BRAND et al. 2012). Uma análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados resultantes. Os efeitos produzidos por esses peptídeos na transição de fase principal de membranas modelo foram correlacionados com o grau de conteúdo de peptídeo α -helicoidal obtido após titulação com LUVs das mesmas composições (BRAND et al. 2012). Os resultados das membranas modelo foram também correlacionados com as potências antimicrobianas contra algumas cepas bacterianas. As moléculas resultantes desse processo foram denominadas peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs) (BRAND et al. 2012).

De maneira geral, IAPs (Figura 5) são sequências internas de proteínas com semelhanças físico-químicas com AMPs que, uma vez identificados e sintetizados como cadeias polipeptídicas individuais, apresentam atividade antimicrobiana (RAMADA et al. 2017; BRAND et al. 2018; BRAND et al. 2019; MARIANO et al. 2021). Muitas das proteínas codificadas pelos genomas de praticamente quaisquer organismos podem ser considerados como reservatórios de IAPs, conferindo-lhes amplo potencial biotecnológico (RAMADA et al. 2017; BRAND et al. 2018; BRAND et al. 2019; MARIANO et al. 2020).

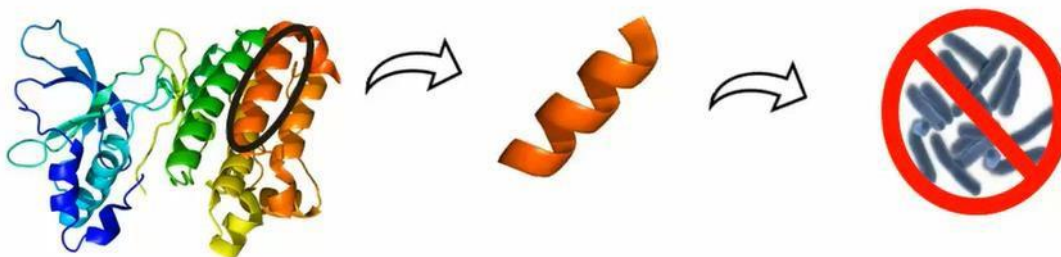


Figura 5: Representação esquemática da definição de IAP.

Ramada (2017) e colaboradores se utilizaram da mesma estratégia para a triagem de peptídeos encriptados bioativos, mostrando uma nova geração de IAPs com atividades antimicrobianas e antifúngicas obtidas de várias sequências de proteínas pertencentes a diferentes plantas (RAMADA et al. 2017). O trabalho demonstrou que IAPs podem ser tão ativos quanto os AMPs já conhecidos, com seletividade e amplitude de espectros antimicrobiano semelhantes, além de fornecer evidências adicionais de que os organismos manifestando a existências de IAPs podem ser uma alternativa viável à tecnologia transgênica em relação à utilização de AMPs convencionais (RAMADA et al. 2017).

Uma vez que tais peptídeos podem interagir com membranas de diferentes maneiras, resultando em diferentes acontecimentos, Brand (2018) e colaboradores desenvolveram uma metodologia preditiva para categorizar peptídeos ativos de membrana e estabelecer uma ligação com suas propriedades físico-químicas. Partindo de trabalhos anteriores (BRAND et al.2012), foi explorada a interação de uma série de IAPs com membranas modelo, a partir de técnicas de DSC e CD. Os dados biofísicos obtidos foram submetidos a métodos estatísticos e os agrupamentos peptídicos resultantes foram correlacionados com a estrutura peptídica e com a sua atividade antimicrobiana (BRAND et al. 2018). As propriedades físico-químicas foram reavaliadas com base em grupos de peptídeos (Figura 6). Os dados indicam que peptídeos membranolíticos produzem perfis característicos de transição térmica (DSC) em vesículas modelo e isso pode ser utilizado para categorizar novas moléculas com atividade biológica desconhecida (BRAND et al, 2018). Esse incremento no modelo de Brand (2012) pode resultar numa estrutura experimental unificada para a previsão de novas classes de peptídeos ativos de membrana (BRAND et al, 2018).

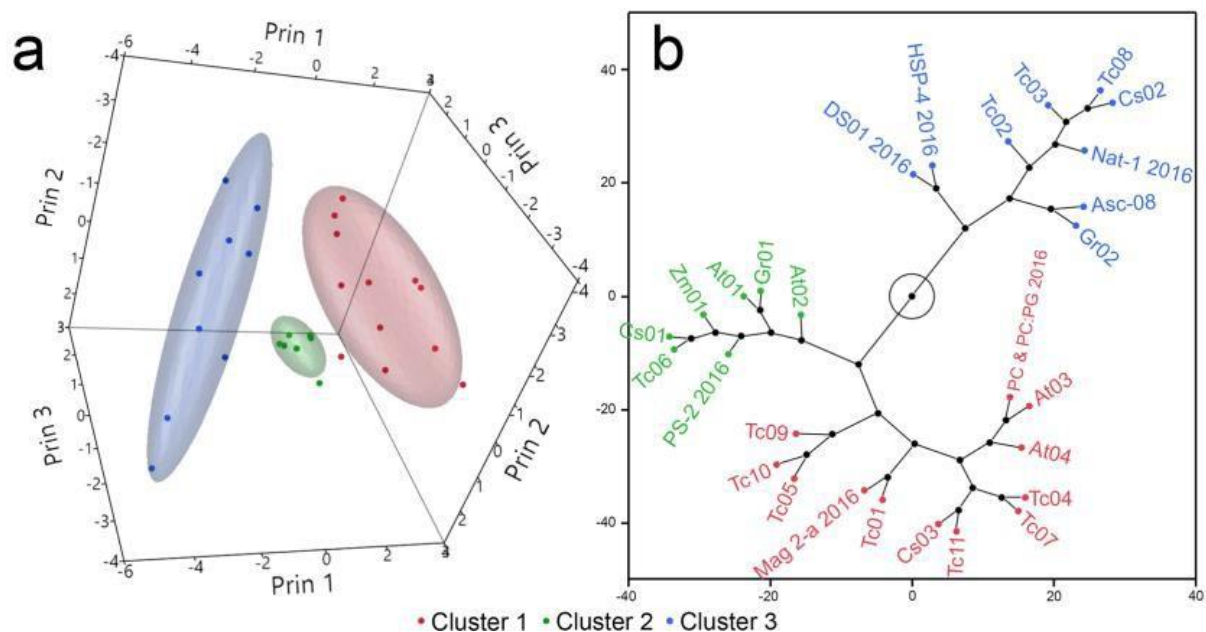


Figura 6: A estatística multivariada revela semelhanças na perturbação induzida por peptídeos da transição de fase principal de membranas modelo sondados por calorimetria de varredura diferencial. Um algoritmo de análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi aplicado a localizações de peptídeos nos primeiros 5 componentes principais. (a) Gráfico de dispersão 3-D das posições dos peptídeos nos três primeiros componentes principais. Os agrupamentos de peptídeos, obtidos da HCA, são codificados por cores: Cluster 1, em vermelho, cluster 2, em verde e cluster 3, em azul. Elipsóides de contorno normal foram calculados para aglomerados de peptídeos. (b) Gráfico de constelação do dendrograma obtido de HCA categoriza peptídeos em grupos discretos. As identidades de clusters são representadas pelo mesmo código de cores. Figura retirada e adaptada de BRAND et al, 2018.

Mais adiante, Brand (2019) e colaboradores voltaram suas atenções para o proteoma humano, utilizando-se mais uma vez da ferramenta Kamal para prospecção de IAPs em proteínas humanas, denominados Hs IAPs ('Homo sapiens Intragenic Antimicrobial Peptides'). Os novos Hs IAPs não apenas perturbam a transição de fases principal das membranas modelo, dobram-se em segmentos α -helicoidais anfífilos após a ligação com as membranas e exibem atividades antimicrobianas distintas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como leveduras e fungos filamentosos, mas também um desses IAPs, o Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), é um potencial inibidor da liberação induzida por lipopolissacarídeo de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos murinos (BRAND et al. 2019).

Mais recentemente, em um trabalho ainda não publicado, Brand e colaboradores expandiram o conhecimento acerca dos Hs IAPs. Para tal, o proteoma humano, baixado do banco de dados EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/reference_proteomes) foi submetido ao software Kamal, programado para revelar potenciais IAPs dentro de proteínas, realizando uma varredura mediante os seguintes parâmetros: segmentos anfífilicos, α -helicoidais, de 16 a 24 resíduos de aminoácidos, com carga líquida $\geq +2$, dentre outros. Esses critérios foram aplicados ao proteoma humano modelo, que inclui 20.596 proteínas. Como resultado 1.827 sequências únicas foram identificadas (dados submetidos para publicação). Esses, por sua vez, foram encontrados dentro da estrutura primária de 460 proteínas, correspondendo a quase 2% das proteínas humanas e constituem elementos estruturais de proteínas de múltiplas classes e funções biológicas (dados submetidos para publicação). Dessa forma, os dados indicam que os IAPs podem ser encontrados em múltiplas proteínas do proteoma humano. No entanto, proteínas transmembrana e proteínas periféricas de membrana são particularmente ricas nesses segmentos, apontando que essas podem ser relevantes para a adsorção transitória da membrana e provavelmente para a modulação de suas atividades fisiológicas no ambiente celular.

1.4. O peptídeo Hs17

Como fruto desse trabalho, muitas proteínas foram mapeadas na periferia do interior da membrana plasmática. O filho da proteína ‘sevenless homolog 1 (SOS1)’ é um exemplo. Foi localizado o IAP Q07889 (723-739), cuja estrutura primária é GKAMKKWVESITKIIQ, em uma localização superficial na estrutura da proteína SOS1 (Figura 7). Este potencial IAP abrange uma região que corresponde aos últimos resíduos de um domínio RasGEFN, com alta densidade de carga positiva (Figura 7), e além disso, foi demonstrado que alguns de seus resíduos de aminoácidos formam uma alça inibitória com o domínio DH da mesma proteína (dados submetidos para publicação). Esse IAP foi nomeado Hs17.

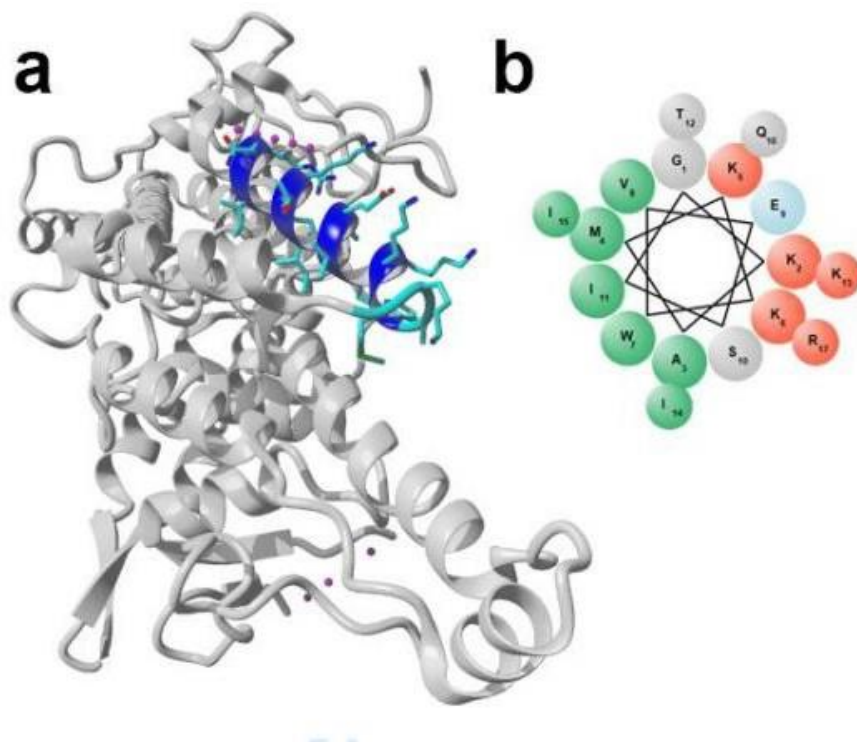


Figura 7: (a) Estrutura tridimensional do SOS1 (código PDB 1NVU), destacando segmento anfifílico catiônico Q07889 (723-739), GKAMKKWVESITKIIQ, em localização superficial da proteína. (b) Gráfico de roda helicoidal do fragmento correspondente demonstrando seu caráter anfifílico. Resíduos carregados positivamente são representados em vermelho, resíduos carregados negativamente em azul, resíduos hidrofóbicos em verde e resíduos polares sem carga em cinza. Imagem retirada e adaptada de trabalho ainda não publicado.

Inspirado nos resultados desse trabalho, um projeto de iniciação científica foi realizado para avaliar a potência antimicrobiana desses segmentos cuja proteína parental é periférica de membrana em comparação com segmentos derivados de proteínas que não configuram nessa classe. Para isso foram escolhidos seis desses potenciais Hs IAPs retornados pelo Kamal (três de cada classe), sendo o Hs17 um deles. Os peptídeos foram sintetizados em fase sólida, purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e suas estruturas primárias aferidas por espectrometria de massas.

Com a confirmação da obtenção dos peptídeos foram executados ensaios de concentração inibitória mínima como uma primeira forma de caracterizar sua atividade biológica. Os resultados obtidos se encontram na tabela 2. Foram utilizadas duas cepas bacterianas: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, representantes dos grupos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. O Hs17 se destacou por sua

seletividade, apresentando atividade apenas para *E. coli* inibindo seu crescimento a uma concentração de 8 μM . Isso sugere que novos ensaios com outras cepas de bactérias podem ser realizados para verificar o estabelecimento de um padrão, podendo, assim, abrir uma nova perspectiva de sua aplicação biotecnológica para a inibição de organismos Gram-negativos.

Tabela 1: Estrutura primária, identificação de proteínas parentais e concentração inibitória mínima de Hs IAPs (dados submetidos para publicação).

Potencial IAP	Nome	Código Uniprot Nome da proteína fonte	Resíduos (Prim.- último)	Grupo da proteína parental	Concentração inibitória mínima (μM , média \pm DP*)	
					<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TVLKRVLKELWRVVMN	Hs15	O14795 Protein unc-13 homolog B	1287-1302	Periférica	4	8
AEVITKFINVAKLLQ	Hs16	Q8IV61 Ras guanyl-releasing protein 3	219-234	Periférica	32	NA
GKAMKKWVESITKIIQ	Hs17	Q07889 Son of sevenless homolog 1	723-738	Periférica	8	NA
WKFLKTVVNKLFEFMH	Hs18	O14980 Exportin-1	559-574	Não-periférica	2	4
LVSKVSQLIHLLNRLQ	Hs19	Q6AI08 HEAT repeat-containing protein 6	93-109	Não-periférica	16	64
RTLLKKVWVWRSVVQK	Hs20	Q8NA72 Centrosomal protein POC5	278-294	Não-periférica	12 \pm 4	NA

* Caso não seja mostrado, DP = 0.

NA = Não detectada.

Por fim, Brand em seu relatório de pós-doutorado (dados submetidos para publicação) iniciou uma primeira prospecção dos efeitos dos IAPs em células eucarióticas, já que suas atividades biológicas se estendem além da atividade microbica, atuando também em células eucarióticas. Para tal, os mesmos peptídeos foram utilizados (Hs15-20) e foi determinada sua citotoxicidade para células epiteliais normais, da linhagem MCF10A, retirada de epitélio da glândula mamária. Foram realizados, então, ensaios de determinação de viabilidade celular.

Esses dados indicaram que o Hs17 sequer interagiu com uma célula epitelial normal, sendo essencialmente inofensivos, mesmo em concentrações altas. Essa é uma característica incomum, já que os demais peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana foram também, em algum grau, citotóxicos (RAMADA et al. 2017; BRAND et al. 2019).

1.5. Seletividade

1.5.1. Composição de membranas em organismos

1.5.1.1. A importância e diversidade de membranas

Membranas apresentam um papel central tanto na estrutura quanto nas funções de todas as células, procarióticas e eucarióticas, animais e plantas. As membranas não apenas definem compartimentos, como também determinam a natureza de toda a comunicação entre o interior e o exterior. A grande maioria das funções bioquímicas fundamentais em células envolve membranas em algum ponto, incluindo processos como replicação de DNA procariótico, biossíntese e secreção de proteínas, bioenergia e respostas hormonais (GENNIS, 1989).

Por meio de micrografias eletrônicas de células de mamíferos, é possível observar a riqueza de organelas membranosas que compreendem grande parte do volume intracelular. No entanto, é de conhecimento geral que os princípios estruturais para todas as membranas são basicamente os mesmos. Essas características, portanto, permitem estabelecer um sistema único de membrana, no entanto, tomando cuidado para um ponto crucial – a imensa diversidade de membranas. A diversidade se deve principalmente às diferentes funções das proteínas presentes em cada membrana e à maneira como essas proteínas interagem umas com as outras, bem como componentes citoplasmáticos. As interações resultam em morfologias distintas, podendo resultar em inconstâncias laterais dentro de uma dada membrana. Sendo assim, é possível estudar membranas em geral, mas exige-se uma compreensão da base molecular e biológica para a diversidade estrutural e funcional da membrana (GENNIS, 1989).

1.5.1.2. Células procarióticas

Em quase todas as bactérias é encontrada uma parede celular semirrígida por fora da membrana, sendo o peptidoglicano o componente mais importante. No polímero de peptidoglicano, as moléculas de N-acetilglicosamina (GluNAc) alternam-se com moléculas de N-acetilmurâmico (MurNAc), sendo essas moléculas ligadas de forma cruzada por tetrapeptídeos. A camada de peptidoglicano possui função estrutural e confere rigidez à parede celular bacteriana (BRAND et al. 2007). Bactérias podem ser divididas em Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 8), de acordo com a sua coloração pelo reagente de Gram, que tem afinidade pela camada de peptidoglicano – espessa em

bactérias Gram-positivas e delgada em Gram-negativas (MADIGAN et al. 2000).

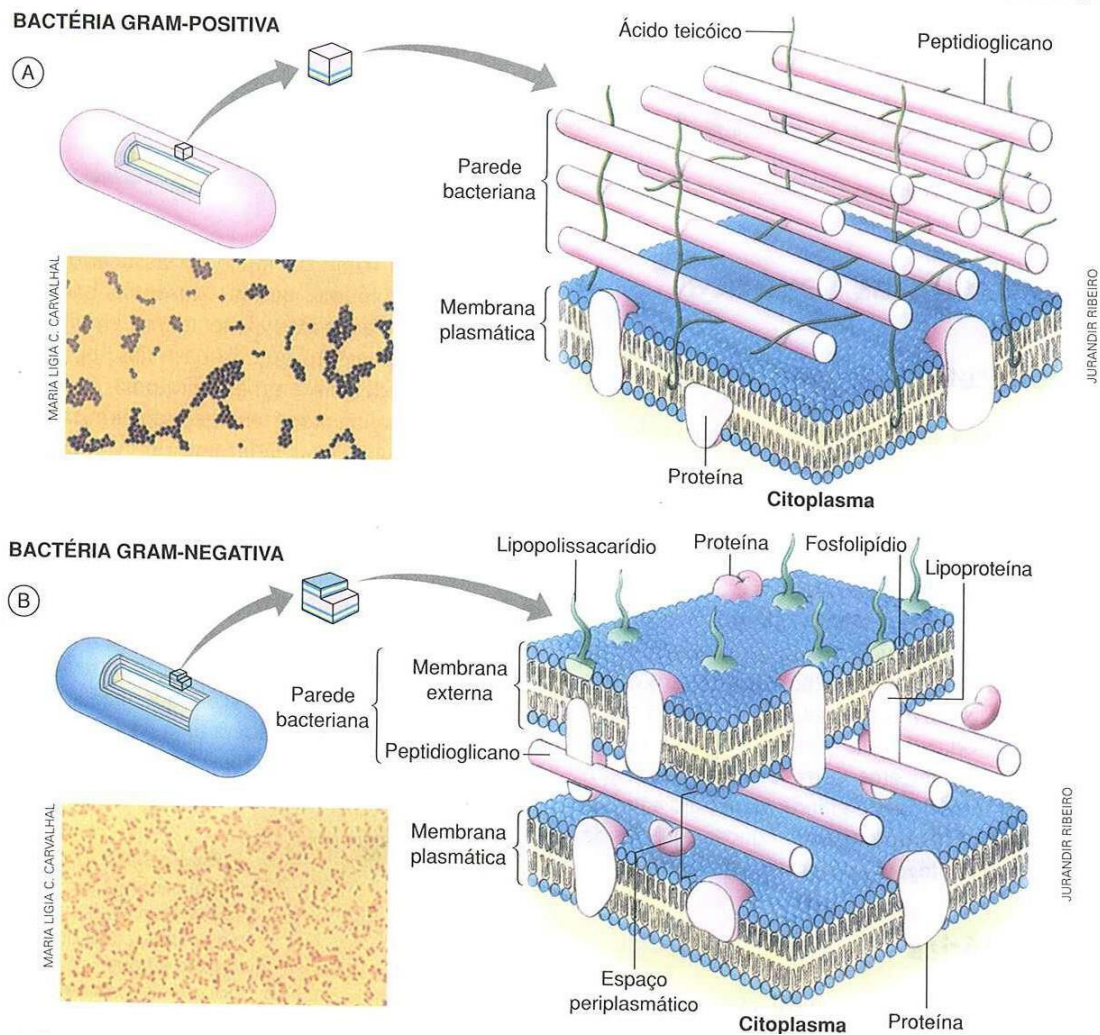


Figura 8: Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias **A.** Gram-positivas e **B.** Gram-negativas. A micrografia mostra bactérias com o tipo de coloração característica de cada uma. Imagem retirada e adaptada de <https://olhonavaga.com.br/flashcards/cartao?id=19659>. Acesso em 02 de jul. de 2023.

Bactérias Gram-positivas

A parede celular dos organismos Gram-positivos possui uma camada relativamente espessa de peptidoglicano, de 20 a 80 nm de espessura, que está firmemente ligada à superfície externa da membrana celular. Além disso, a parede celular possui uma molécula adicional, o ácido teicóico, que é constituído por um carboidrato, fosfatos e um álcool que pode ser o glicerol ou o ribitol. As bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa nem espaço periplasmático. Dessa forma, as enzimas digestivas não

retidas no periplasma são liberadas no meio, tornando-se às vezes tão diluídas que os organismos não obtêm benefício algum dessas enzimas.

Bactérias Gram-negativas

A parede celular de uma bactéria Gram-negativa é mais fina, porém mais complexa que a de bactérias Gram-positivas. Somente 10-20% da parede celular é formado pelo peptidoglicano, sendo os restantes polissacarídeos, proteínas e lipídeos. A parede celular contém uma membrana externa, que constitui a superfície externa da parede, deixando apenas um espaço periplasmático muito estreito. A membrana externa das bactérias Gram-negativas é em bicamada. Ela forma a camada mais externa da parede celular e está ligada ao peptidoglicano por uma camada quase contínua de pequenas moléculas de lipoproteínas. Essas estão embutidas na membrana externa e covalentemente ligadas ao peptidoglicano. A membrana externa age como uma peneira grosseira e exerce pequeno controle no movimento de substâncias para dentro e para fora da célula. No entanto, ela controla o transporte de determinadas proteínas no meio – proteínas chamadas de porinas formam canais através da membrana externa.

Uma parte importante da membrana externa é o lipopolissacarídeo (LPS) e é comumente utilizado para identificar células Gram-negativas. É a parte integrante da parede celular e somente é liberado até que a parede celular da bactéria morta seja decomposta. O LPS é composto por polissacarídeos e pelo lipídeo A, que é responsável pelas propriedades tóxicas que fazem com que qualquer infecção por Gram-negativos se transforme num problema médico potencialmente sério.

1.5.1.3. Células eucarióticas

A membrana plasmática de uma célula eucariótica (Figura 9) possui a mesma estrutura em mosaico fluido das células procarióticas, porém diferem destas em alguns aspectos, especialmente na grande variedade de lipídeos que contêm. Os principais componentes da membrana são proteínas e lipídeos. Para humanos, a composição de lipídeos é PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), PS (fosfatidilserina), SM (esfingomielina), colesterol e gangliosídeo, sendo que as quantidades relativas desses lipídeos e proteínas variam significativamente (GENNIS, 1989). Carboidratos podem consistir em até 10% do peso de algumas membranas, mas esse está invariavelmente na

forma de glicolípido ou glicoproteína (GENNIS, 1989).

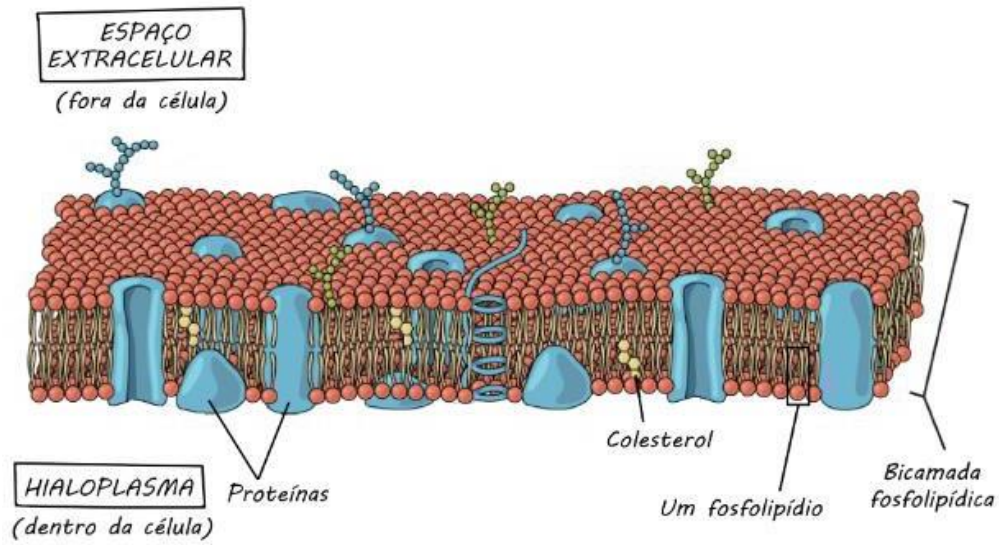


Figura 9: Representação da membrana de uma célula eucariótica. Retirada e adaptada de <https://pt.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/prokaryotic-and-eukaryotic-cells/a/plasma-membrane-and-cytoplasm>. Acesso em 02 de jul. de 2023. Modificada de OpenStax Biology.

1.5.2. Como avaliar a seletividade de um antimicrobiano

Os AMPs são produzidos em todos os organismos vivos e possuem normalmente amplo espectro de atividade para vários organismos celulares incluindo células procarióticas e eucarióticas (PAPO & SHAI, 2003). Para exercer sua atividade, esses peptídeos primeiramente interagem e atravessam uma membrana externa e só então podem se ligar e inserir na membrana citoplasmática, para o caso de bactérias Gram-negativas (PAPO & SHAI, 2003).

A atividade seletiva desses peptídeos depende também de outros parâmetros que caracterizam tanto o peptídeo quanto a célula alvo (PAPO & SHAI, 2003). Em relação à célula alvo, as características são estrutura, comprimento e complexidade do polissacarídeo hidrofílico encontrado em sua camada externa e no que diz respeito às propriedades do peptídeo, estas incluem o volume da molécula, sua estrutura e seu estado oligomérico em solução e em membranas (PAPO & SHAI, 2003). Esses parâmetros, então, afetam a capacidade dos AMPs em se difundir através da barreira externa da célula e atingir sua membrana citoplasmática (PAPO & SHAI, 2003).

Para facilitar o estudo, utiliza-se um modelo do sistema AMP-microrganismo é geralmente feita pela confecção de membranas de composição fosfolipídica compatível com as membranas da célula alvo, no entanto, sem as macroestruturas (BRAND, 2007). Sendo assim, a investigação de interações dos peptídeos com essas membranas em solvente tamponado permite uma avaliação comparativa entre peptídeos, já que permite um maior controle sobre os fatores de interação (BRAND, 2007).

Dessa forma, modelos de membranas fosfolipídicas têm sido usados para estudar o modo de ação dos AMPs. Os estudos demonstram que peptídeos que atuam em bactérias, preferencialmente, são capazes de interagir e permear eficientemente fosfolipídeos aniônicos, enquanto peptídeos que lizem células eucarióticas se ligam e permeiam ambas as membranas de fosfolipídeos, ácida e zwitteriônica (PAPO & SHAI, 2003). A membrana interna de bactérias, Gram-negativas e positivas (membrana única), são compostas de fosfolipídeos carregados negativamente e, em contraste, a superfície externa de membrana de células de mamíferos possuem fosfolipídeos zwitteriônicos e colesterol, portanto, a propriedade mais conservada dos AMPs, que se trata da sua carga líquida positiva, permite que eles se liguem preferencialmente à membrana negativamente carregada (PAPO & SHAI, 2003; MATSUZAKI et al. 1989).

Os fosfolipídeos que compõem a membrana das células dos mamíferos são

distribuídos assimetricamente – o folheto externo é composto predominantemente de fosfatidilcolina zwitteriônica (PC) e esfingomiéline (SM), enquanto o folheto interno é composto de fosfatidilserina (PS), carregada negativamente (VERKLEIJ, 1979), sendo essa a razão para o uso de LUVs contendo PC para mimetizar a superfície externa de mamíferos. Em contraste, os eritrócitos humanos, por exemplo, também possuem um grande número de porções de carboidratos contendo ácido siálico altamente carregados negativamente na forma de glicoproteínas e glicoesfingolipídeos, formando sua barreira glicocálix externa (PAPO & SHAI, 2003). No entanto, os eritrócitos não são significativamente afetados pela maioria dos AMPs de ocorrência natural (PAPO & SHAI, 2003). Uma alternativa para explicar tal fenômeno seria que provavelmente os peptídeos estão ligados primeiro via atração eletrostática à camada de glicocálix, mas como a maioria dos AMPs não hemolíticos catiónicos tem baixa afinidade com as membranas zwitteriônicas, aumenta-se a complexidade para serem liberados dessa barreira aniônica de glicocálix e adentrarem a membrana fosfolipídica (PAPO & SHAI, 2003). Por fim, embora a seletividade de peptídeos para membranas bacterianas possa resultar, pelo menos em parte, da exibição preferencial de resíduos aniônicos nessas membranas, a incapacidade de interagir ou se ligar a fosfolipídeos zwitteriônicos não significa dizer que o AMP não terá citotoxicidade considerável para células normais de mamíferos (PAPO & SHAI, 2003).

Uma série de técnicas biofísicas pode ser empregada para avaliar a interação desses peptídeos com as membranas miméticas, as LUVs. São elas calorimetria de titulação isotérmica (ITC), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e ressonância plasmônica de superfície (SPR) (BRAND et al. 2007). A técnica envolvendo CD será abordada a seguir, já que será um dos procedimentos desse trabalho.

Dicroísmo circular

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) representa uma importante fonte de informações estruturais para peptídeos e proteínas, possibilitando a rápida avaliação da estrutura secundária do polímero, do enovelamento, conversão, e estabilidade estrutural frente a ligantes (GREENFIELD, 2006). A técnica consiste na medição da absorção heterogênea da luz plano polarizada por soluções com moléculas assimétricas, e a consequente conversão em luz elipticamente polarizada.

Ao avaliar as elipticidades molares em função dos comprimentos de onda da região do UV distante (190 – 260nm), determina-se a estrutura secundária de peptídeos mediante comparação com o padrão de absorbância da amostra. Uma vez que os cromóforos do *backbone* peptídico estão alinhados, as transições $n \rightarrow \pi^*$ (240nm), do nitrogênio amídico, e $\pi \rightarrow \pi^*$ (190nm) da ligação C=O, são deslocadas devido à assimetria do ambiente que contém os cromóforos (KELLY, 2006). Assim, os ângulos diédricos ϕ e ψ influenciam as transições eletrônicas e produzem padrões de absorbância para cada uma das estruturas secundárias típicas (GREENFIELD, 2006). Alfa-hélices possuem dois mínimos na elipticidade, em 222nm e 208nm, e um máximo em 193nm; e folhas-beta um mínimo em 218nm e máximo em aproximadamente 195nm (GREENFIELD, 2006) (Figura 10).

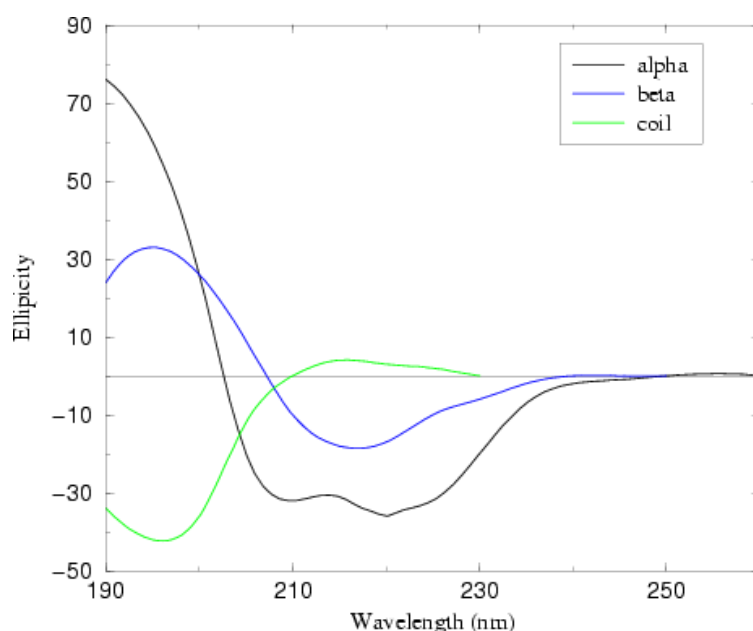


Figura 10: Diferentes padrões de espectro de CD para diferentes estruturas secundárias. A linha preta representa o padrão de uma α -hélice, a linha azul o padrão do espectro de uma folha- β , e a linha verde da conformação *coil*. Circular Dichroism - Integrated Structural Biology, Grenoble. Disponível em: <https://www.isbg.fr/biophysics-characterisation/circular-dichroism/?lang=fr>. (Acesso em: 02 jul. 2023)

1.5.3. Possíveis aplicações

1.5.3.1. Peptídeos antimicrobianos como carreadores de fármacos

Os peptídeos catiônicos provaram ser de fundamental importância não só como agentes farmacêuticos, mas também como carreadores de fármacos atuando em processos celulares (HORVÁTI et al. 2017). Os oligopeptídeos catiônicos, incluindo peptídeos de penetração celular (CPP) e alguns AMPs, detêm a capacidade de atravessar a membrana lipídica e acessar alvos intracelulares (YEUNG et al. 2011; MARR et al. 2006). No entanto, a falta de especificidade e a extensa citotoxicidade de alguns dos CPPs ainda precisam ser maturadas (HORVÁTI et al. 2017). Um peptídeo com alto tráfego intracelular e atividade antimicrobiana com baixa citotoxicidade em células humanas fará com que se tenha um desenvolvimento no efeito terapêutico desses (HORVÁTI et al. 2017).

Qian (2019) desenvolveu um trabalho baseado nos copolímeros PCL₁₆-b-K_n mimetizando AMPs e demonstrou que esses não apenas exibiram ampla capacidade antibacteriana, mas também de se automontar em vesículas, com polilisina hidrofílica, formando a coroa e a membrana, respectivamente (QIAN et al. 2019). Esse tipo de vesícula conseguiu encapsular e liberar fármacos, mantendo um certo controle de liberação intracelular, além de uma alta capacidade de eliminar células cancerígenas, com baixa citotoxicidade para células normais (QIAN et al. 2019). Portanto, as vesículas de copolímeros em blocos anfifílicas podem funcionar como carreadores multifuncionais de drogas em nanomedicina para tratamento de câncer (QIAN et al. 2019).

1.5.3.2. Peptídeos antimicrobianos acoplados com marcadores fluorescentes para identificação de cepas

Sondas fluorescentes conjugadas a antibióticos e antimicrobianos são entidades químicas com enorme potencial para a obtenção de imagens de locais de infecção, em razão da sua alta seletividade para estruturas de células microbianas em relação a células de mamíferos (CHENG et al. 2014; WELLING et al. 2015). Considerando que a maioria dos peptídeos não contém grupos químicos que permitam sua visualização direta, muitas vezes precisam ser modificados com ‘reportadores’ ou grupos reativos para posterior derivatização (SCHUMACHER & HACKENBERGER, 2015). Aminoácidos não naturais contendo marcadores bio-ortogonais podem ser incorporados em locais específicos de sequências peptídicas por SPPS (ZHAO et al. 2015).

Van Oosten (2013) recentemente reportou uma vancomicina marcada com fluorescência de infravermelho próximo para imagens *in vivo* e em tempo real de infecções bacterianas em um modelo de mioceite em camundongos (VAN OOSTEN,

2013). Mendive-Tapia (2016) desenvolveu um aminoácido fluorogênico Trp-BODIPY com uma ligação C-C sem espaçador entre Trp, que mostrou notável aumento da fluorescência em microambientes hidrofóbicos, e essa incorporação desse aminoácido em AMPs curtos não prejudica sua seletividade para células fúngicas e permite imagens fúngicas rápidas e diretas, sem nenhuma etapa de lavagem (MENDIVE-TAPÍA et al. 2016). Por fim, Chen (2015) trabalhou com um fragmento de AMP UBI₂₉₋₄₁, que já havia sido descrito como tendo afinidade bacteriana, marcando-o com um corante fluorescente de infravermelho próximo para investigar sua capacidade de direcionamento em diferentes bactérias (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) e modelos de camundongos infectados por bactérias (Figura 11). Todos os resultados apontaram para o segmento UBI₂₉₋₄₁ como um ligante de direcionamento para construir agentes antibacterianos para terapia de direcionamento de bactérias (CHEN et al. 2015).

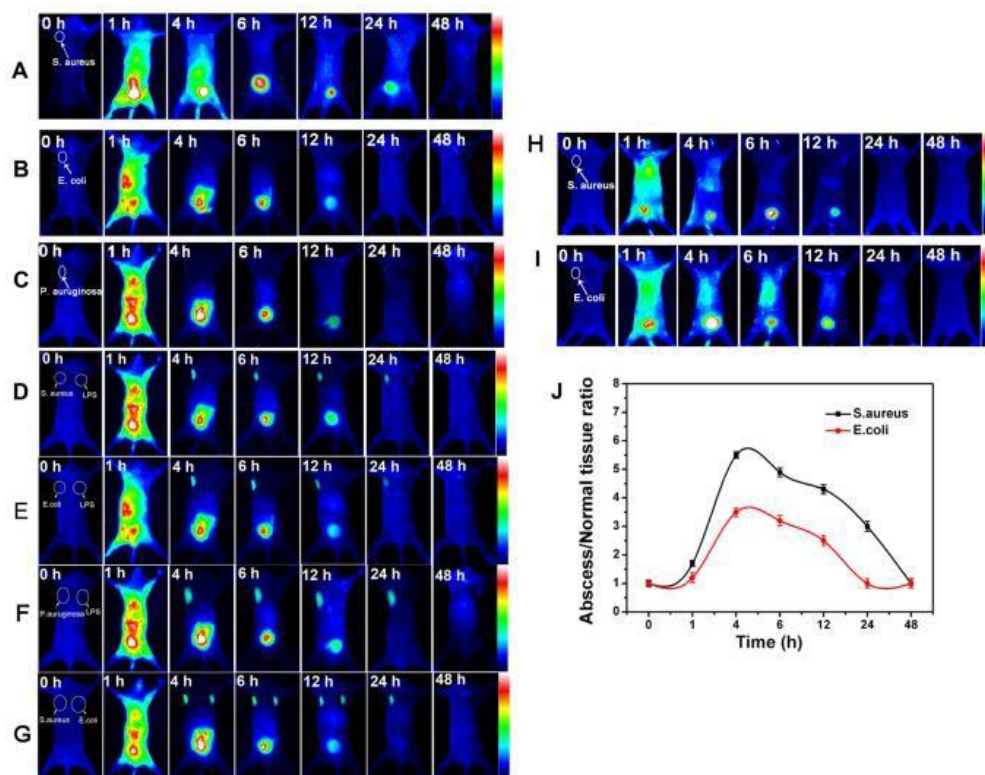


Figura 11: Imagens de fluorescência de NIR de ICG02 e ICG02- UBI₂₉₋₄₁ após a injeção em diferentes modelos de camundongos. Imagem retirada e adaptada de CHEN et al. 2015.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral caracterizar o peptídeo Hs17, estudando sua estrutura secundária, assim como, determinando seu MIC e MBC contra diferentes bactérias a fim de avaliar a extensão da sua atividade antimicrobiana e também seu grau de seletividade para procariotos, para então determinar seu potencial como possível fármaco.

2.2. ESPECÍFICOS

- Purificar uma quantidade maior do Hs17, sintetizado por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), pela técnica de HPLC.
- Avaliar a ação antimicrobiana do peptídeo Hs17 frente a diferentes cepas bacterianas, mediante ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e bactericida (MBC)
- Avaliar a estrutura secundária de Hs17 na presença de vesículas unilamelares (LUVs) compostas por dimiristroil fosfatidilcolina (DMPC) e 2:1 DMPC: DMPG (dimiristroil fosfatidilglicerol) por Dicroísmo Circular (CD).

3. METODOLOGIA

O peptídeo Hs17 foi sintetizado por meio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS) em um trabalho anterior (dados não publicados). Dessa forma, esse trabalho foi realizado como descrito a seguir.

3.1. Purificação do Hs17 por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A purificação do peptídeo foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, FM-UnB, por Cromatografia Líquida de Alta eficiência, em fase reversa, utilizando a coluna preparativa C-18 com o monitoramento dos comprimentos de onda: 216 nm (referente a absorção da ligação peptídica) e 280 nm (relacionado a absorção da cadeia lateral do triptofano), mediante o gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v) (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min : 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min: 100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). O material foi re-solubilizado em água + 0,1 % TFA em uma concentração de 20 mg/mL, antes de realizar as injeções. As frações foram coletadas e posteriormente liofilizadas.

3.2. Análise do Hs17 por espectrometria de massas

A fração recolhida do HPLC foi liofilizada na Universidade Católica de Brasília e levada para a análise por espectrometria de massa para que fosse possível identificar a fração que se encontra o material desejado e corroborar a sua estrutura primária. A fração foi identificada com base na razão massa/carga esperada do peptídeo sintetizado utilizando um espectrômetro de massa do tipo Q-TOF MS (Maxxis, Bruker) do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis - LQB da Embrapa Agroenergia. O peptídeo Hs17 foi também analisado pelo espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Speed, Bruker) do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia – UnB e teve sua fração com íon correspondente ao peptídeo de interesse fragmentada, técnica LIFT, para que seja feito o sequenciamento.

3.3. Quantificação do peptídeo Hs17

A quantificação do peptídeo foi realizada por espectroscopia UV-Vis com o auxílio do espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU do Laboratório NuPMIA da Faculdade

de Medicina da UnB. Uma quantidade do peptídeo foi solubilizada em 500 µL de água ultrapura (Milli-Q), e em seguida, 10 µL dessa solução foi diluída em 990 µL de água ultrapura. A diluição é feita com o intuito de manter os valores de absorvância dentro do limite superior da Lei de Beer-Lambert (0,7 u.a.). Essa solução teve a leitura, em duplicata, obtida para o valor de absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Por possuir um resíduo de triptofano, o Hs17 foi quantificado por meio do coeficiente de extinção molar, que é de 5500 M⁻¹ cm⁻¹ (KIRSCHENBAUM, 1978). A média dos valores obtidos no espectrofotômetro foi dividida pelo valor de referência para a obtenção da concentração em µM. Multiplicando-se essa concentração pelo valor da diluição da solução (100 vezes), a concentração em mM é obtida. Como diz a fórmula a seguir:

$$C_p = (A_{280} \times FD) / \epsilon$$

C_p – Concentração do peptídeo

A₂₈₀ – Absorvância do peptídeo em 280 nm

FD – Fator de diluição (100)

ε – Coeficiente de extinção molar à 280 nm, em cubeta de 1 cm (Triptofano = 5500 M⁻¹ cm⁻¹);)

3.4. Determinação de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do Hs17 contra diferentes bactérias

O parâmetro utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos foi a sua concentração inibitória mínima (MIC, do inglês minimal inhibitory concentration). Nesse ensaio foram seguidos os protocolos M7-A10 e M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute – (CLSI, instituto de padrões clínicos e laboratoriais, em português). Diferentes concentrações dos peptídeos (de 128 – 0,5 µM, concentração final) foram incubadas com as células ([bactérias] = 5x10⁵ células. mL⁻¹), em meio de cultura líquido, seguindo os protocolos acima citados. O peptídeo Hs02 foi utilizado como controle negativo (não havendo crescimento) e para fins comparativos. Os microrganismos foram colocados em poços contendo apenas meio de cultura, servindo como controle positivo (há crescimento dos organismos). Além disso, como controle para o meio de cultura, foram colocados poços sem peptídeo ou microrganismo, para garantir sua esterilidade. O teste foi realizado junto com o Professor Marcelo Ramada do

Laboratório de Análise de Biomoléculas, programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnológicas da Universidade Católica de Brasília em triplicatas biológicas com os seguintes microrganismos: *K. pneumoniae* ATCC 13883, *A. baumannii* ATCC 13304, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. epidermidis* Statens Seruminstitut cepa 1. Após o período de incubação (24 h) foi avaliado se houve o crescimento dos organismos em cada poço pela sua turbidez. Foi considerado o MIC onde não foi observado crescimento de microrganismos. Para determinar o MBC, 50 µL de caldo são retirados de todos os poços que não mostraram sinais visíveis de crescimento/turbidez (MIC e diluições mais altas) e distribuídos em placas de ágar MH (ANDREWS, 2000). As placas foram então incubadas a 37° C por 24 horas. O MBC foi definido como a menor concentração de peptídeo que impediu o crescimento das bactérias em meio de cultura livre de antimicrobianos (ANDREWS, 2000).

3.5. Obtenção e quantificação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e 2:1 DMPC: DMPG

As vesículas foram confeccionadas seguindo o método utilizado por Brand (2007). Para as vesículas de DMPC (Dimiristroil Fosfatidilcolina), foi medido 20 mg do fosfolípídeo e solubilizado em 2 mL de clorofórmio (CHCl₃). Essa solução foi completada com mais 20 mL de CHCl₃ e seca em rotaevaporador até a formação de um filme translúcido. Esse filme foi seco por mais 3 h em bomba à vácuo. Após a secagem, o filme foi solubilizado em 2 mL de tampão PBS pH 7,4 (12,12 mM de fosfato de sódio dibásico, 7,88 mM de fosfato de sódio monobásico e 150 mM de cloreto de sódio) e encaminhado para extrusão. Essa se trata da passagem forçada das vesículas por um filtro de policarbonato. As vesículas foram extrusadas mais ou menos 19 vezes. Após a extrusão as vesículas foram quantificadas, baseado no método estabelecido por Stewart. Então, foi recolhido 20 µL da solução extrusada de vesículas, em triplicata. O solvente foi evaporado e as vesículas solubilizadas em 2 mL de CHCl₃. Foi adicionado 1 mL da solução de ferrotiocianato de amônio (2,7 g de cloreto férrico hexahidratado e 3,0 g de tiocianato de amônio em 100 mL de água) e a mistura submetida a agitação em vórtex

por 1 min. Em seguida, foi recolhida a fração orgânica e analisada no espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU do Laboratório NuPMIA da Faculdade de Medicina da UnB no comprimento de onda de 488 nm. Os resultados foram aplicados a equação da reta, obtida previamente para a curva.

3.6. Avaliação da estrutura secundária de Hs17 por Dicroísmo Circular (CD)

A avaliação da estrutura secundária do peptídeo Hs17 foi feita por dicroísmo circular na presença de vesículas grandes unilamelares (LUVs) de dimiristroil fosfatidilcolina (DMPC) e uma mistura 2:1 de DMPC:DMPG (dimiristroil fosfatidilglicerol). As vesículas foram utilizadas para induzir a estruturação do peptídeo. Foram preparadas soluções contendo 40 µM do peptídeo em tampão PBS 20 mM em pH 7,4 com diferentes concentrações de vesículas: 0, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2000 µM para as análises. As análises, dessa forma, foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co., Japão) no Laboratório de Biofísica Molecular, Instituto de Biologia, UnB. Os espectros foram adquiridos em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, com janela espectral de 200 a 260 nm, em um intervalo de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 s. O acúmulo de 5 varreduras foi utilizado para confecção dos espectros finais. A elipcidade residual média (MRE – $[\theta]$) foi calculada com base na seguinte fórmula (KELLY, 2005):

$$[\theta] = 100. \frac{\theta.M}{l.c.n}$$

Onde $[\theta]$ está relacionado a elipcidade relativa ao comprimento de onda, M é a massa molar do peptídeo, c é a concentração do peptídeo em mg.mL^{-1} , d é o caminho óptico e n o número de resíduos do peptídeo. A helicidade percentual, que é referente a porcentagem do peptídeo que se estruturou em α -hélice, foi obtida por meio do software BeStSel (Beta Structure Selection, <https://bestsel.elte.hu/index.php>) que faz uma deconvolução de toda a estruturação da proteína com base em todos os comprimentos de onda.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação do Hs17 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O cromatograma obtido para o peptídeo Hs17 (Figura 12) mostrou a eficiência do método de síntese de peptídeos em fase sólida, gerando um único pico majoritário. O tempo de retenção permitiu a coleta individual desse pico do peptídeo, por apresentar resolução satisfatória. Desta forma, a obtenção de uma maior quantidade de produto purificado para a realização dos demais testes foi possível.

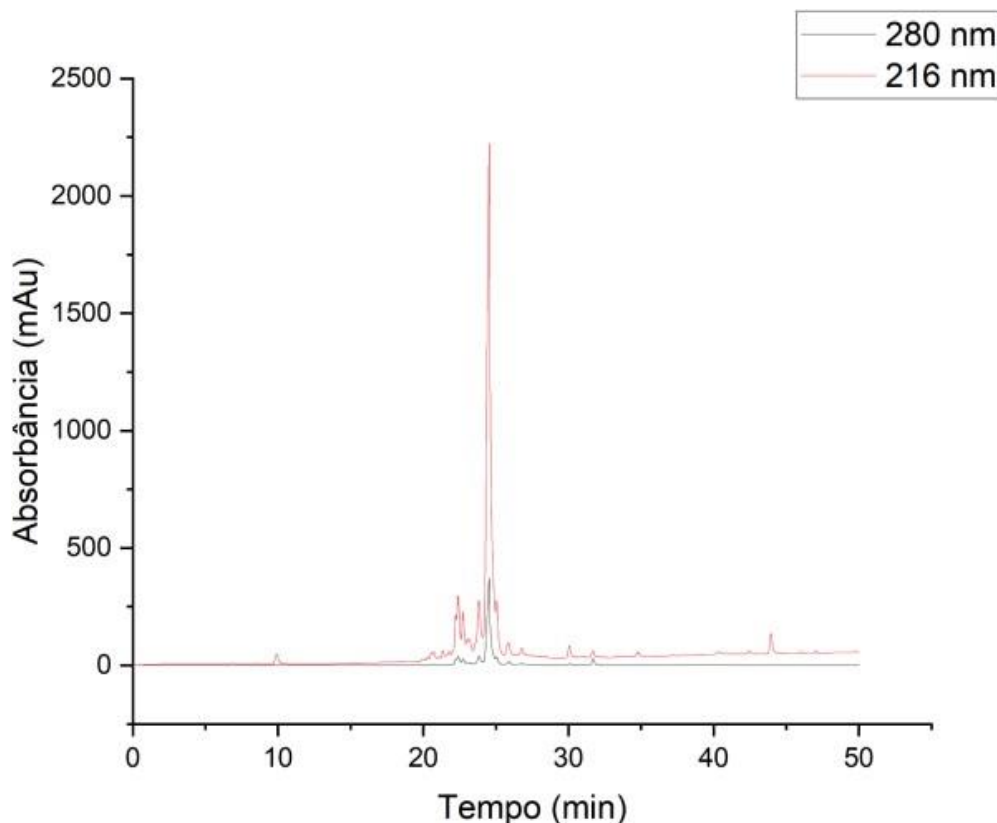


Figura 12: Cromatograma do peptídeo Hs17; eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min: 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min:

100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). Possui um único pico majoritário em aproximadamente 24 minutos.

4.2. Análise do Hs17 por espectrometria de massas

A análise foi feita por meio de dois espectrômetros. O espectro de Q-TOF (Figura 13) retornou um erro de 10 ppm (Tabela 2), que é relativamente alto. Porém, o espectro de fragmentação MS/MS feito por MALDI (Figura 14) confirmou a estrutura primária do Hs17, levando à conclusão de que provavelmente o Q-TOF estava descalibrado.

Tabela 2: Massa teórica vs. massa experimental e erro em ppm do peptídeo Hs17 medidos por Q-TOF

Peptídeo	Massa teórica [M+2H⁺]²⁺	Massa experimental [M+2H⁺]²⁺	Erro (ppm)
Hs17	930,0509	930,0606	10,4295

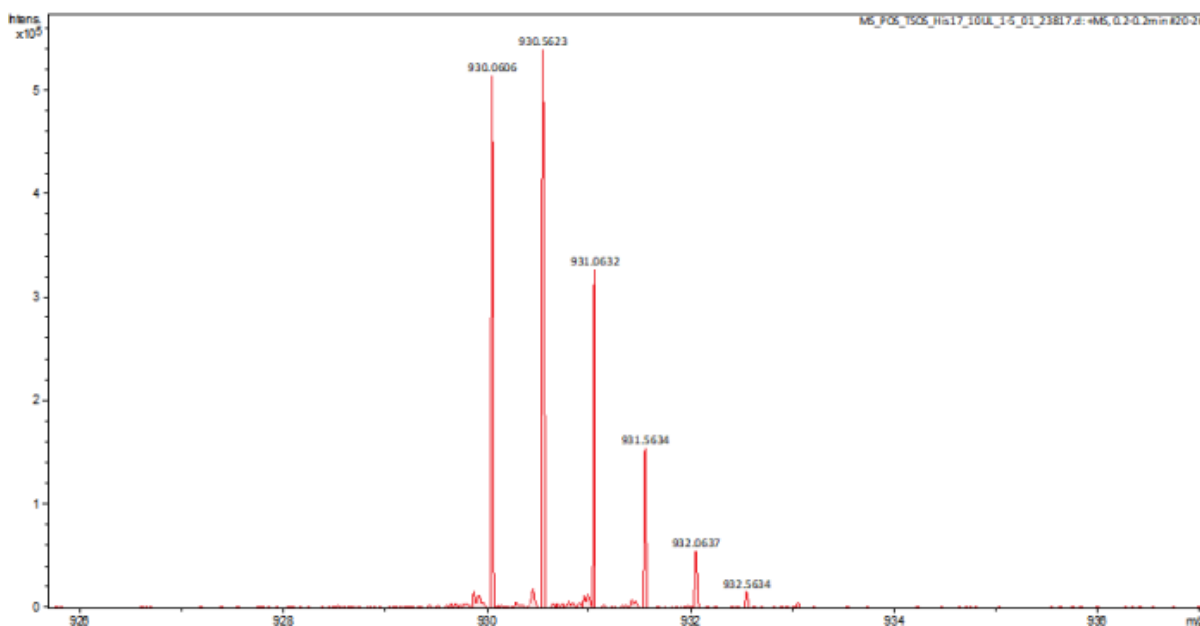


Figura 13: Espectro MS do Hs17 obtido por meio de Q-TOF MS (Maxxis, Bruker). Imagem aproximadamente na faixa de m/z 926 a m/z 937.

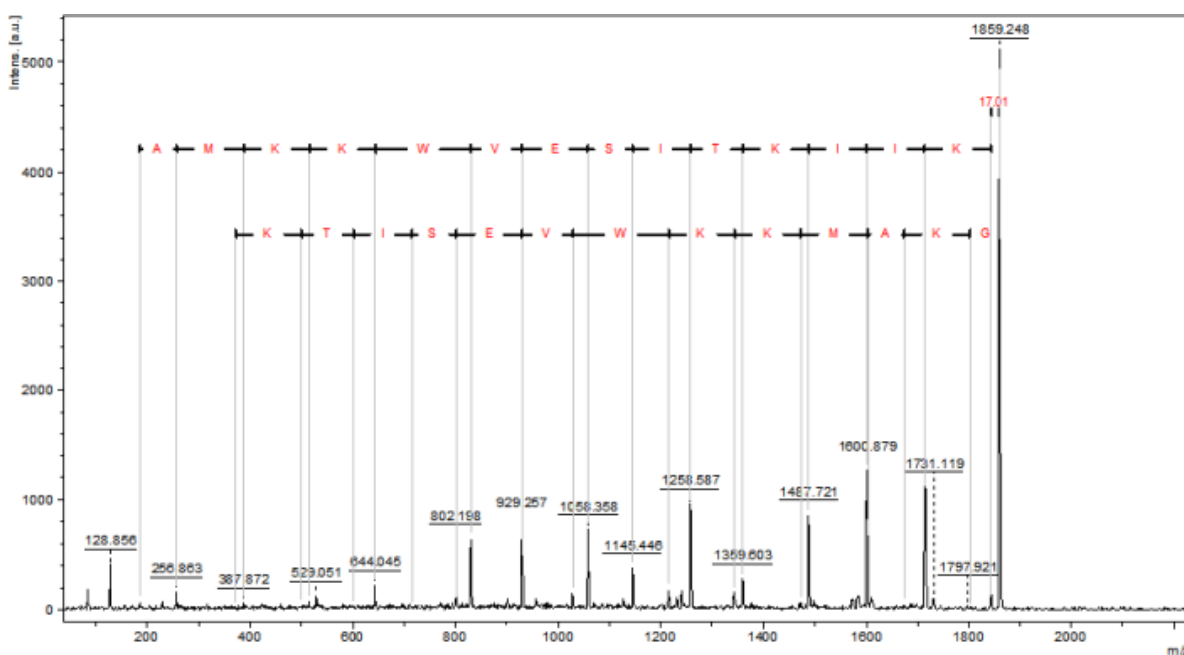


Figura 14: Sequenciamento pela fragmentação do íon feita por MALDI LIFT-TOF/TOF do peptídeo Hs17. Estrutura primária: GKAMKKWVESITKIIK.

4.3. Quantificação do peptídeo Hs17

Para a quantificação, foi pesado 5,6 mg do peptídeo já liofilizado para ser solubilizado em 500 μ L de água MiliQ. Partindo dessa solução estoque, foi coletada

uma alíquota de 10 µL e avolumada com 990 µL. Sendo assim, um fator de diluição de 100. A quantificação foi feita utilizando um espectrômetro de absorção UV/Vis e foram obtidas as seguintes absorvâncias (Tabela 3):

Tabela 3: Absorvância do peptídeo Hs17, realizada em duplicata, em 280 nm e absorvância média.

Absorvância replicata 1	Absorvância replicata 2	Absorvância média
0,2360	0,2570	0,2465

Utilizando o valor de absorvância média, a concentração da solução estoque foi calculada utilizando a equação apresentada no capítulo 3.2, retornando um valor de **4,48 mM**.

4.4. Determinação de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do Hs17 contra diferentes bactérias

Seguindo os passos apresentados na seção 3.3, foi determinado o MIC e o MBC contra quatro cepas de bactérias diferentes, sendo duas do grupo de bactérias Gram-positivas (*S. mutans* ATCC 25175 e *S. epidermidis* Statens Seruminstitut cepa 1) e duas Gram-negativas (*K. pneumoniae* ATCC 13883 e *A. baumannii* ATCC 13304). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4. Para enriquecer, os dados da iniciação científica previamente realizada (dados submetidos para publicação), sendo esses os resultados de MIC para as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram adicionados.

Tabela 4: Valores de MIC e MBC (µM) referente à ação do peptídeo Hs17 contra cepas de bactérias patogênicas.

	Cepas bacterianas	Concentração Inibitória Mínima (µM, média ± DP)	Concentração Bactericida Mínima (µM, média ± DP)
Gram-Negativas	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	32 ± 0	64 ± 0
	<i>A. baumannii</i> ATCC 13304	8,7 ± 3,6	9,6 ± 3,6
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	8 ± 0	-
Gram-Positivas	<i>S. epidermidis</i> Statens Seruminstitut cepa 1	32 ± 0	64 ± 0
	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	128 ± 0	128 ± 0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29223	NA	-

NA = Não detectada; (-) = Não realizada

Observa-se que, com exceção da cepa *S. aureus*, o Hs17 inibiu o crescimento de todas as cepas. Comparando sua potência relativamente entre as classes, é notório sua atividade maior em cepas Gram-Negativas, com destaque para *E. coli* e *A. baumannii*

pelo qual o peptídeo desenvolveu uma maior potência antimicrobiana, com um MIC de aproximadamente 8 μM em ambas. Para as demais cepas, obteve-se MICs considerados elevados, quando comparados a outros IAPs já descritos.

Fazendo uma comparação com o peptídeo Hs02, que é uma referência, devido ao seu amplo espectro e potente atividade antimicrobiana (BRAND et al. 2019; BESSA et al. 2019), o Hs17 é bem menos potente. Embora mais potente, o Hs02 não apresenta muita seletividade, apresentando citotoxicidade significativa a partir de 10 μM ao reduzir a viabilidade celular de neutrófilos para aproximadamente 64%, assim como fibroblastos e eritrócitos (VIANA DE FREITAS et al. 2023). Ao calcular o índice terapêutico desse peptídeo, considerando o IC₅₀ de fibroblasto sendo aproximadamente 8 μM (WAN et al. 2007) e o MIC para *E. coli* igual a 2 μM (BRAND et al. 2019; BESSA et al. 2019), tem-se uma janela girando em torno de 4 vezes. Trata-se de uma janela curta para aplicação, sendo assim, essa molécula está em desenvolvimento para ampliação desta janela.

Mais recentemente foi publicado um trabalho de um Hs IAP que também apresentou alta seletividade para bactérias Gram-negativas. Trata-se do Hs10, que além de inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos, também se apresentou pouco citotóxico para fibroblastos humanos (SANTOS et al. 2023). Os dados indicam que o peptídeo não apresentou citotoxicidade significativa até 512 μM em fibroblastos, além de um MIC de 32 μM para a cepa *E. coli* (SANTOS et al. 2023), indicando uma janela maior que 16 vezes, sendo assim, muito seletivo, mesmo que com uma potência antimicrobiana reduzida.

Já o peptídeo Hs17, com um IC₅₀ de 128 μM (dados submetidos para publicação) e o MIC de 8 μM para a *E. coli*, como visto na tabela 4, ao se calcular o índice terapêutico, encontra-se a mesma janela de 16 vezes do peptídeo Hs10, demonstrando grande seletividade para bactérias Gram-negativas e pouco citotóxico, além de apresentar uma atividade antimicrobiana direta intermediária.

Levando-se em conta os valores de MBC, percebe-se que para as cepas *K. pneumoniae* e *S. epidermidis* o MBC dobrou em relação à MIC. Isso indica que na MIC, embora tenha inibido o crescimento, ainda há bactéria viva. Não é o caso para a *S. mutans*, em que os dois valores se equivalem. Isso indica que se empregando a concentração de peptídeo indicada pelo MIC, é capaz não só de inibir o crescimento dessa bactéria, como também matar toda a população colocada nas placas. Por fim, destaca-se os valores da *A. baumannii*. Nota-se que houve uma variação mínima do MBC para o MIC, podendo

considerar que podem se encontrar no erro das medidas, ou seja, é preciso uma concentração relativamente baixa do Hs17 para aniquilar essa bactéria.

4.5. Avaliação da estrutura secundária de Hs17 por Dicroísmo Circular (CD)

Buscando compreender as bases de ação seletiva do Hs17 contra procariotos em relação a eucariotos, foi investigada a estruturação do peptídeo na presença de vesículas (LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG). Para isso, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD). A concentração de 40 μM do peptídeo foi um parâmetro que foi mantido fixo em todas as medidas, variando a concentração das vesículas. Na ausência de vesículas, os peptídeos não demonstraram estruturação, pois apresentaram sinal negativo próximo a 200 nm, perfil característico de estruturas aleatórias (GREENFIELD, 2006). Na presença de vesículas de DMPC, vesículas de carga neutra, não houve estruturação dos peptídeos, devido ao aparecimento do sinal negativo próximo a 200 nm, em todas as concentrações de vesículas (Figura 15). Na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, vesículas de carga negativa, o Hs17 apresentou estruturação na forma de uma α -hélice, devido ao aparecimento característico das bandas negativas em 210 e 220 nm (Figura 16). Observa-se a formação de uma leve estruturação a partir de uma concentração de vesícula de 320 μM , denotada pelo aparecimento não tão expressivo das duas bandas negativas. A estruturação começa a ficar mais significativa a partir de uma concentração de 640 μM , mostrando as bandas características de α -hélice bem definidas.

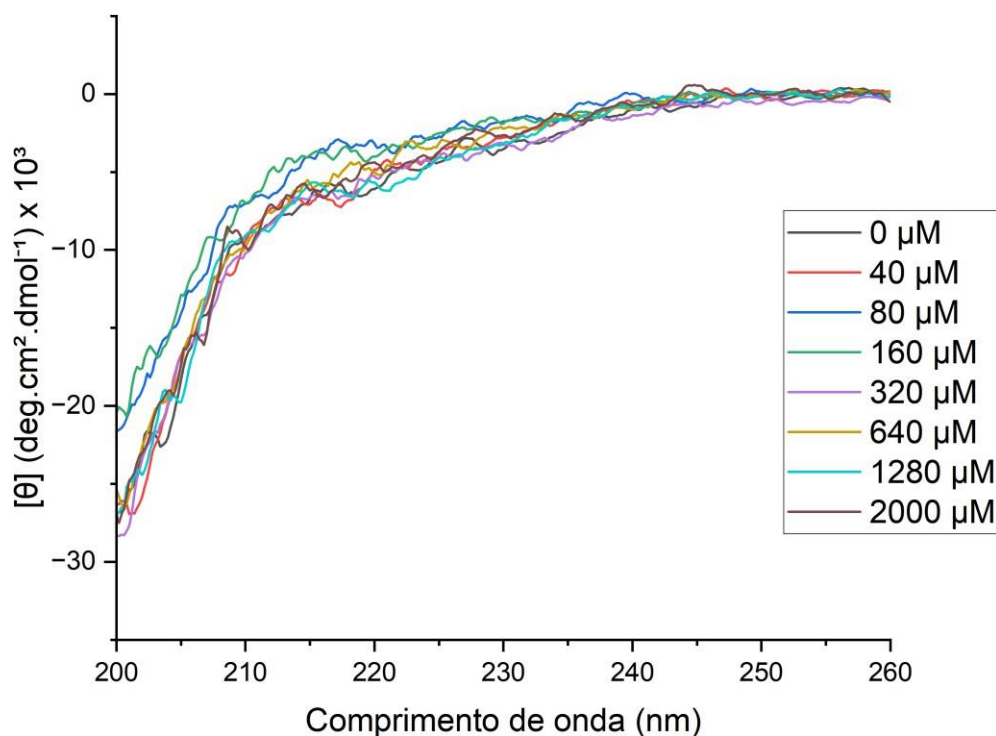


Figura 15: Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs17 na presença de vesículas de DMPC em diferentes concentrações. A legenda indica as diferentes concentrações de vesículas que foram utilizadas no teste, em μM e suas respectivas cores: 0 (preto), 40 (vermelho), 80 (azul), 160 (verde), 640 (amarelo), 1280 (ciano) e 2000 (marrom). A elipcidade molar se encontra na unidade de $(\text{graus.cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) \times 10^3$ (os valores foram divididos por 1000 para melhoria da escala de visualização).

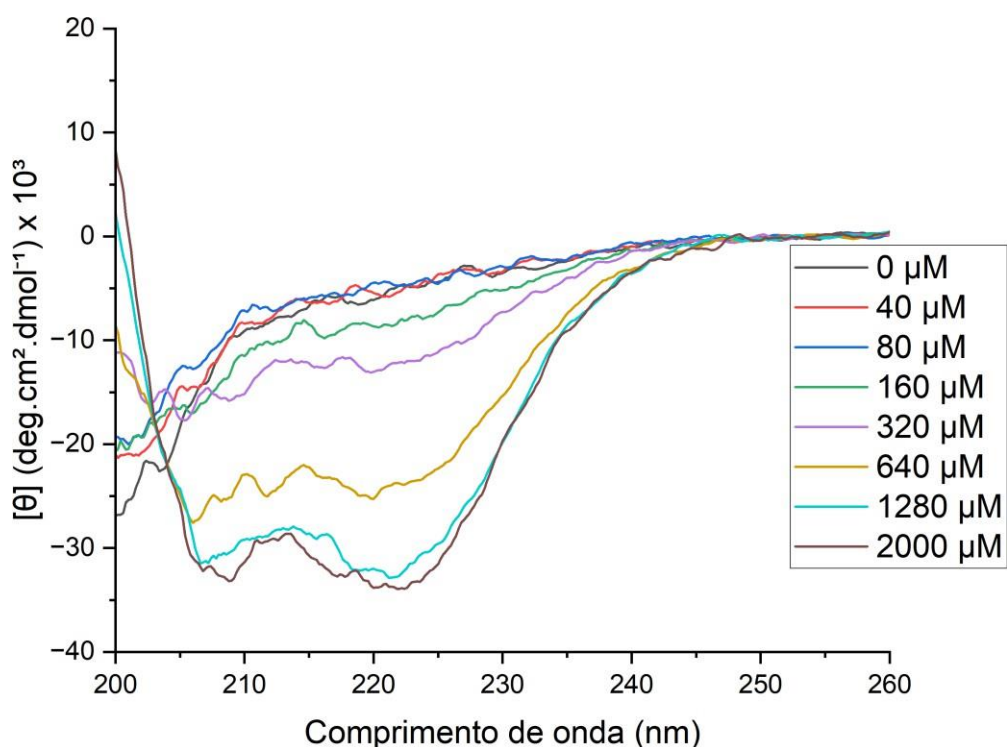


Figura 16: Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs17 na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG em duas concentrações. A legenda indica as diferentes concentrações de vesículas que foram utilizadas no teste, em μM e suas respectivas cores: 0 (preto), 40 (vermelho), 80 (azul), 160 (verde), 640 (amarelo), 1280 (ciano) e 2000 (marrom). A elipicidade molar se encontra na unidade de $(\text{graus.cm}^2 .\text{dmol}^{-1}) \times 10^3$ (os valores foram divididos por 1000 para melhoria da escala de visualização).

Esses resultados indicam que o peptídeo Hs17 estrutura, exclusivamente, após interação com vesículas de carga negativa (2:1 DMPC:DMPG), demonstrando que essa ocorre de maneira maioritariamente eletrostática, garantindo seletividade para esse tipo de membrana. Essa constatação é corroborada pelos dados de helicidade percentual obtidos para o peptídeo (Tabela 5). As análises feitas pelo BeStSel estão na forma de anexo.

Tabela 5: Dados de helicidade percentual do peptídeo Hs17 na presença de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG

Concentração LUVs (μM)	Hs17 % Hélice (DMPC)	Hs17 % Hélice (DMPC:DMPG)
0	0,0	0,0
40	0,0	3,6
80	0,0	1,3
160	1,2	15,6
320	1,7	27,8
640	0,0	62,1
1280	0,0	65,8
2000	1,3	64,9

Observa-se que na ausência de vesículas (concentração de 0 μM), foi confirmado que não há estruturação do peptídeo. Na presença de vesículas de DMPC, o Hs17 praticamente não estruturou, com percentual de α -hélice flutuando em pouco mais de 1% mostrando que para esse tipo de vesículas neutras, a estruturação não acontece. Esse comportamento observado é incomum para Hs IAPs. Em trabalhos anteriores (RAMADA et al. 2017; BRAND et al. 2019), estudos de dicroísmo circular foram realizados para uma série de Hs IAPs e, por mais que vesículas 2:1 DMPC:DMPG induzam maiores helicidade percentuais, todos os peptídeos se estruturaram em algum grau frente a vesículas de DMPC. Para as vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, obteve-se estruturação em α -hélice significativa a partir de uma concentração de 640 μM de vesícula, com valores de percentual ultrapassando 60%. Isso indica uma preferência pela estruturação na presença de vesículas negativas. Dessa forma, compactando todos esses resultados, é possível afirmar que se obteve um forte indício de que o peptídeo Hs17 é um bom agente seletivo para vesículas que mimetizam membranas de procariotos.

A capacidade da maioria dos peptídeos antimicrobianos catiônicos de interagir e permear membranas de fosfolipídios modelo é crucial para sua função biológica, no entanto, a interação com membranas modelo não pode garantir que o peptídeo será biologicamente ativo, pois a atividade biológica depende também de outros parâmetros que caracterizam tanto o peptídeo quanto a célula-alvo (PAPO & SHAI, 2003). Estes incluem o estado oligomérico do peptídeo em solução e membranas, a estrutura do peptídeo, a estabilidade da estrutura ativa (ou seja, a energia necessária para mudar sua conformação de uma estrutura desordenada em solução para uma estrutura anfipática na membrana lipídica), a distribuição geral das cargas positivas e aminoácidos hidrofóbicos

ao longo da cadeia peptídica e o tipo e a largura da parede celular que cobre a membrana fosfolipídica citoplasmática da célula (PAPO & SHAI, 2003). Estudos que levem em consideração todos esses parâmetros poderão abordar melhor o atual modo de ação dos peptídeos antimicrobianos e auxiliar no desenvolvimento desse grupo de peptídeos antimicrobianos que atuem por um novo modo de ação, como futuros agentes terapêuticos no combate microbiano (PAPO & SHAI, 2003).

5. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o peptídeo Hs17, avaliando a extensão da sua atividade antimicrobiana e também seu grau de seletividade para procariotos, além de obter uma mais profunda compreensão das propriedades físico-químicas que conferem seletividade à IAPs, de forma a obter moléculas mais seletivas que sirvam tanto para o combate direto de microrganismos patogênicos quanto para o carreamento de fármacos conjugados. Para isso, foram feitos ensaios de MIC e MBC, para avaliar sua ação antimicrobiana frente à diferentes cepas bacterianas e sua estrutura secundária avaliada por CD, mediante interação com LUVs DMPC (carga neutra) e 2:1 de DMPC:DMPG (carga negativa).

Os resultados mostraram, reafirmando resultados anteriores, que o IAP Hs17 é mais ativo contra cepas de bactérias Gram-negativas, indicando ser um ótimo agente seletivo para essa classe de bactérias. Destaca-se a bactéria *Acinetobacter baumannii*, um importante agente patogênico humano, na qual o peptídeo desenvolveu uma maior potência antimicrobiana, com um MIC de 8,7 μM e um MBC que flutuou pouco em relação ao MIC, podendo considerá-los aproximadamente equivalentes. Isso indica que uma quantidade relativamente pequena do peptídeo é capaz não só de inibir o crescimento, como também aniquilar essa bactéria.

A análise da estruturação do peptídeo Hs17 na presença de LUVs de DMPC (carga neutra) e uma mistura 2:1 de DMPC:DMPG (carga negativa) por dícroísmo circular (CD) mostrou que o peptídeo estruturou-se acima de 60% na presença das membranas negativas (a partir de 640 μM), em relação às membranas neutras, na qual a estruturação foi de praticamente 0%, concluindo que a interação eletrostática entre peptídeo e membrana consiste em um dos fatores determinantes para a estruturação, sendo, então, mais um indicativo de seletividade. Isso demonstra que o peptídeo Hs17 apresenta uma propensão maior de associar-se a células de caráter negativo e podem ser explorados no direcionamento para regiões infeccionadas específicas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Sendo assim, esse conjunto de resultados corroboraram para eleger o peptídeo Hs17 como um bom agente seletivo antimicrobiano para procariotos, mais especificamente bactérias Gram-negativas. Como foi discutido na seção 1.5.3, existem algumas aplicações possíveis para uma molécula dotada de tal capacidade seletiva. Uma aplicação interessante seria fazer algo similar ao peptídeo UBI₂₉₋₄₁ (CHEN et al. 2015), sintetizando novamente o Hs17, acoplado a um marcador fluorescente ou um fármaco. Sua alta especificidade para interagir com um tipo específico de célula, aliada com sua baixa citotoxicidade para células humanas, além de sua atividade antimicrobiana direta ser muito superior ao UBI₂₉₋₄₁, leva à motivação para essas perspectivas futuras do produto na esperança de ampliar sua capacidade biotecnológica.

No entanto, para um entendimento mais preciso deste peptídeo como um agente seletivo é necessária a compreensão de que a membrana modelo é bem diferente de uma célula viva, muito porque esses precisariam atravessar a parede celular antes de chegar na membrana citoplasmática e isso depende de muitas propriedades do peptídeo, como por exemplo, a estrutura e o estado oligomérico, além de condições do meio, como temperatura e pH. Estudos que aprofundem mais nessas questões, além de uma variedade maior de aplicação de técnicas biofísicas, como DSC, dariam uma maior confiabilidade aos resultados. Porém, o trabalho conferiu uma compreensão mais aprofundada das propriedades físico-químicas que conferem seletividade a um IAP, a fim de prospecções futuras.

7. REFERÊNCIAS

- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, mar. 2007.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43–57, maio. 2016.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl_1, p. 5–16, 1 jul. 2001.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde - Série: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. 1 ed. Brasília, 2021.
- BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, nov. 2013.
- BECHINGER, B.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Protein Science**, v. 2, n. 12, p. 2077–2084, dez. 1993.
- BESSA, L. J. et al. Intragenic Antimicrobial Peptide Hs02 Hampers the Proliferation of Single- and Dual-Species Biofilms of *P. aeruginosa* and *S. aureus*: A Promising Agent for Mitigation of Biofilm-Associated Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3604, 23 jul. 2019.
- BLOM, T. S. et al. Mass Spectrometric Analysis Reveals an Increase in Plasma Membrane Polyunsaturated Phospholipid Species upon Cellular Cholesterol Loading. **Biochemistry**, v. 40, n. 48, p. 14635–14644, dez. 2001.
- BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254, n. 3, p. 197–215, set. 2003.

BRAND, G. D. et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. 1-20, 6 ago. 2019.

BRAND, G. D. Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. 2007. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BRAND, G. D. et al. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332–49340, dez. 2002.

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45848, set. 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022**. Brasília; 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde e Política Externa. **Os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde: (1998-2018)**. Brasília, 2018.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169–184, abr. 2004.

CARVALHO, W.; GUIMARÃES, Á. S. Desinformação, Negacionismo e Automedicação: a relação da população com as drogas “milagrosas” em meio à pandemia da COVID-19. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 3, ago. 2020.

CHEN, H. et al. Bacteria-Targeting Conjugates Based on Antimicrobial Peptide for

Bacteria Diagnosis and Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 2505–2516, jul. 2015.

CHENG, Y. et al. Fluorogenic Probes with Substitutions at the 2 and 7 Positions of Cephalosporin are Highly BlaC-Specific for Rapid Mycobacterium tuberculosis Detection. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 35, p. 9360–9364, ago. 2014.

CORRÊA, J. S. et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, p. e20210589, 2022.

COSTA S. R. **Prospecção, síntese e aplicação de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) da peçonha de bothrops sp.** Tese (mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília. 2019.

DA CUNHA, N. B. et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 234–248, fev. 2017.

DENNISON, S. et al. Amphiphilic α -Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure / Function Relationships. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 31–39, 2005.

DI GRAZIA, A. et al. The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂ Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-20, jun. 2015.

EPAND, R. F. et al. Interactions of the antimicrobial β -peptide β -17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 6, p. 1240–1248, mar. 2003.

EPAND, R. M. Detecting the presence of membrane domains using DSC. **Biophysical Chemistry**, v. 126, n. 1–3, p. 197–200, mar. 2007.

FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. Structure-Activity Relationship Study of Antimicrobial Dermaseptin S4 Showing the Consequences of Peptide Oligomerization on Selective Cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 6, p. 4230–4238, fev. 2000.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, jan. 2012.

FRIEDRICH, C. L. et al. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24015–24022, jun. 2001.

GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 9, n. 2, p. 127–135, 1997.

GLASS report: early implementation 2016-2017. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241513449>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, dez. 2006.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, abr. 2010.

Guidelines for the Control of Multidrug Resistant Organisms. Disponível em: <<https://docplayer.net/85010240-Guidelines-for-the-control-of-multidrug-resistant-organisms.html>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

HALL, K.; MOZSOLITS, H.; AGUILAR, M.-I. Surface plasmon resonance analysis of

antimicrobial peptide–membrane interactions: affinity & mechanism of action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 10, n. 5–6, p. 475–485, nov. 2003.

HALL, R. M. et al. Mobile Gene Cassettes and Integrons in Evolution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 870, n. 1, p. 68–80, maio 1999.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, dez. 2006.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82–88, fev. 1998.

HANEY, E. F. et al. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1639–1655, ago. 2009.

HENDERSON, J. C. et al. Antimicrobial Peptide Resistance of *Vibrio cholerae* Results from an LPS Modification Pathway Related to Nonribosomal Peptide Synthetases. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 10, p. 2382–2392, out. 2014.

HSU, J. How covid-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. **BMJ**, p. m1983, 18 maio 2020.

HUTTNER, B. D. et al. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 808–810, jul. 2020.

IRIARTE, D. A. **Resistência Bacteriana aos Macrolídeos: um olhar sobre a azitromicina**. 2020. 15 f. TCC (Graduação em Medicina) - UFSCAR, São Carlos, 2020.

JUSKO, M. et al. A Metalloproteinase Karilysin Present in the Majority of *Tannerella forsythia* Isolates Inhibits All Pathways of the Complement System. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2338–2349, mar. 2012.

KELLER, R. C. A. Prediction of Lipid-Binding Regions in Cytoplasmic and Extracellular Loops of Membrane Proteins as Exemplified by Protein Translocation Membrane Proteins. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 1, p. 21–29, jan. 2013.

KELLER, R. C. A. Identification and in silico analysis of helical lipid binding regions in proteins belonging to the amphitropic protein family. **Journal of Biosciences**, v. 39, n. 5, p. 771–783, dez. 2014.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, ago. 2005.

KIRSCHENBAUM, D. M. Molar absorptivity and $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions—XVIII. **International Journal of Biochemistry**, v. 11, n. 6, p. 487–500, jan. 1980.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 51–55, fev. 1996.

KRISTIAN, S. A. et al. d-Alanylation of Teichoic Acids Promotes Group A Streptococcus Antimicrobial Peptide Resistance, Neutrophil Survival, and Epithelial Cell Invasion. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6719–6725, out. 2005.

LAEDERACH, A.; ANDREOTTI, A. H.; FULTON, D. B. Solution and Micelle-Bound Structures of Tachyplesin I and Its Active Aromatic Linear Derivatives, **Biochemistry**, v. 41, n. 41, p. 12359–12368, out. 2002.

LANSBURY, L. et al. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 81, n. 2, p. 266–275, ago. 2020.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host

defence. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23–27, fev. 1999.

LEMAITRE, B. et al. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973–983, set. 1996.

LEVY, S. B. Balancing the drug-resistance equation. **Trends in Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 341–342, out. 1994.

LEVY, S. B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 2002.

LEVY, S. B. **The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative power**. 2 ed. Cambridge, MA: Perseus Pub, 2002.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. S12, p. S122–S129, dez. 2004.

MAE, M.; LANGEL, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 509–514, out. 2006.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, p. 59, set. 2016.

MANDARD, N. et al. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 2, p. 404–410, set. 1998.

MANOHAR, P. et al. Secondary Bacterial Infections in Patients With Viral Pneumonia. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 420, ago. 2020.

MARIA-NETO, S. et al. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 3078–3088, nov. 2015.

MARR, A.; GOODERHAM, W.; HANCOCK, R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 468–472, out. 2006.

MATSUZAKI, K. et al. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 981, n. 1, p. 130–134, maio. 1989.

MELO, J. R. R. et al. Automedicação e uso indiscriminado de medicamentos durante a pandemia da COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, 2021.

MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 245–250, mar. 2009.

MENDIVE-TAPIA, L. et al. Spacer-free BODIPY fluorogens in antimicrobial peptides for direct imaging of fungal infection in human tissue. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10940, mar. 2016.

MINANTE, B. I. et al. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA PÓS-COVID-19: REVISÃO DE LITERATURA. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 3, n. 3, mar. 2022.

MOTHÉ, C. G; AZEVEDO, A. D. A. Análise Térmica de Materiais. 1 ed. ArtLibert, 2009.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial

peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.

O’Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: HM Government and Wellcome Trust; 2016. Review on Antimicrobial Resistance.

OLIVOTTO, M. et al. Electric fields at the plasma membrane level: A neglected element in the mechanisms of cell signalling. **BioEssays**, v. 18, n. 6, p. 495–504, jun. 1996.

OMS. Antimicrobial resistance: draft global action plan on antimicrobial resistance, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization, 2016.

ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 28–45, nov. 2014.

ORSI, G. B.; FALCONE, M.; VENDITTI, M. Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 8, p. 653–679, ago. 2011.

ORVÁTI, K. et al. Comparative analysis of internalisation, haemolytic, cytotoxic and antibacterial effect of membrane-active cationic peptides: aspects of experimental setup. **Amino Acids**, v. 49, n. 6, p. 1053–1067, jun. 2017.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693–1703, nov. 2003.

PARACHIN, N. S.; FRANCO, O. L. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 8 abr. 2014.

PAYNE, D. J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 29–40, jan. 2007.

PERRON, G. G.; ZASLOFF, M.; BELL, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences***, v. 273, n. 1583, p. 251–256, 22 jan. 2006.

PONTI, D. et al. An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochemical Journal*, v. 370, n. 1, p. 121–127, fev. 2003.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, nov. 2003.

QIAN, Y. et al. Polycaprolactone-Based Mimetic Antimicrobial Peptide Copolymers Vesicles as an Effective Drug-Carrier for Cancer Therapy. *Polymers*, v. 11, n. 11, p. 1783, out. 2019.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 71, n. 1, p. 635–700, jun. 2002.

RAMADA, M. H. S. et al. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 13263, out. 2017.

RAWSON, M. T. et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: a rapid review to support covid-19 antimicrobial prescribing. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 9, p. 2459-2468, maio. 2020.

RIPA, M. et al. Secondary infections in patients hospitalized with COVID-19: incidence and predictive factors. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 27, n. 3, p. 451–457, mar. 2021.

RIVERO, M. et al. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Biotechnology*, v. 157, n. 2, p. 334–343, jan. 2012.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. W. Structure of the Bovine Antimicrobial Peptide Indolicidin Bound to Dodecylphosphocholine and Sodium Dodecyl Sulfate Micelles, **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 15765–15774, dez. 2000.

SANTOS, M. A. et al. Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 1, p. 130265, jan. 2023.

SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 958–970, maio 2016.

SCHUMACHER, D.; HACKENBERGER, C. P. More than add-on: chemoselective reactions for the synthesis of functional peptides and proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 22, p. 62–69, out. 2014.

SHARMA, S.; SAHOO, N.; BHUNIA, A. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 46–53, set. 2015.

SILVA, L. O. P.; NOGUEIRA, J. M. R. Indiscriminate use of antibiotics during the pandemic: increasing in post-COVID-19 bacterial resistance. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 2, 2021.

SONDERMANN, H. et al. Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras Activator Son of Sevenless. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 393–405, out. 2004.

STEWART, J. C. M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 10–14, maio 1980.

TACCONELLI, E. et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 1–55, jan. 2014.

TARTAGLIA, M. et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. **Nature Genetics**, v. 39, n. 1, p. 75–79, jan. 2007.

TEW, G. N. et al. De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 1, p. 30–39, jan. 2010.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.

VAN OOSTEN, M. et al. Real-time in vivo imaging of invasive- and biomaterial-associated bacterial infections using fluorescently labelled vancomycin. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 2584, out. 2013.

VERKLEIJ, A. J. et al. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 323, n. 2, p. 178–193, out. 1973.

VIANA DE FREITAS, T. et al. Release of immunomodulatory peptides at bacterial membrane interfaces as a novel strategy to fight microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 4, abr. 2023.

WAN, H.-X. et al. Discovery of Trp-Nle-Tyr-Met as a novel agonist for human formyl peptide receptor-like 1. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 317–326, jul. 2007.

WANG, X. et al. Nosocomial outbreak of COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 6, jun. 2020.

WANG, G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 5, p. 545–594, maio. 2014.

WEI, W. et al. Limited Role for Antibiotics in COVID-19: Scarce Evidence of Bacterial

Coinfection. **SSRN Electronic Journal**, 2020.

WEINSTEIN, R. Controlling Antimicrobial Resistance in Hospitals: Infection Control and Use of Antibiotics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 188–192, abr. 2001.

WELLING, M. M. et al. Development of a Hybrid Tracer for SPECT and Optical Imaging of Bacterial Infections. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 839–849, maio. 2015.

WONG, K. K. et al. Engineering a Cell-Free Murein Biosynthetic Pathway: Combinatorial Enzymology in Drug Discovery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 51, p. 13527–13528, dez. 1998.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, mar. 2003.

YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2161–2176, jul. 2011.

ZHANG, T. et al. Cardiolipin Prevents Membrane Translocation and Permeabilization by Daptomycin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11584–11591, abr. 2014.

ZHAO, G.; LONDON, E. An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: Relationship to biological hydrophobicity. **Protein Science**, v. 15, n. 8, p. 1987–2001, ago. 2006

ZHAO, L. et al. Synthesis of a Cytotoxic Amanitin for Biorthogonal Conjugation. **ChemBioChem**, v. 16, n. 10, p. 1420–1425, jul. 2015.

ANEXO

Anexo A Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para as soluções de peptídeo Hs17 com DMPC

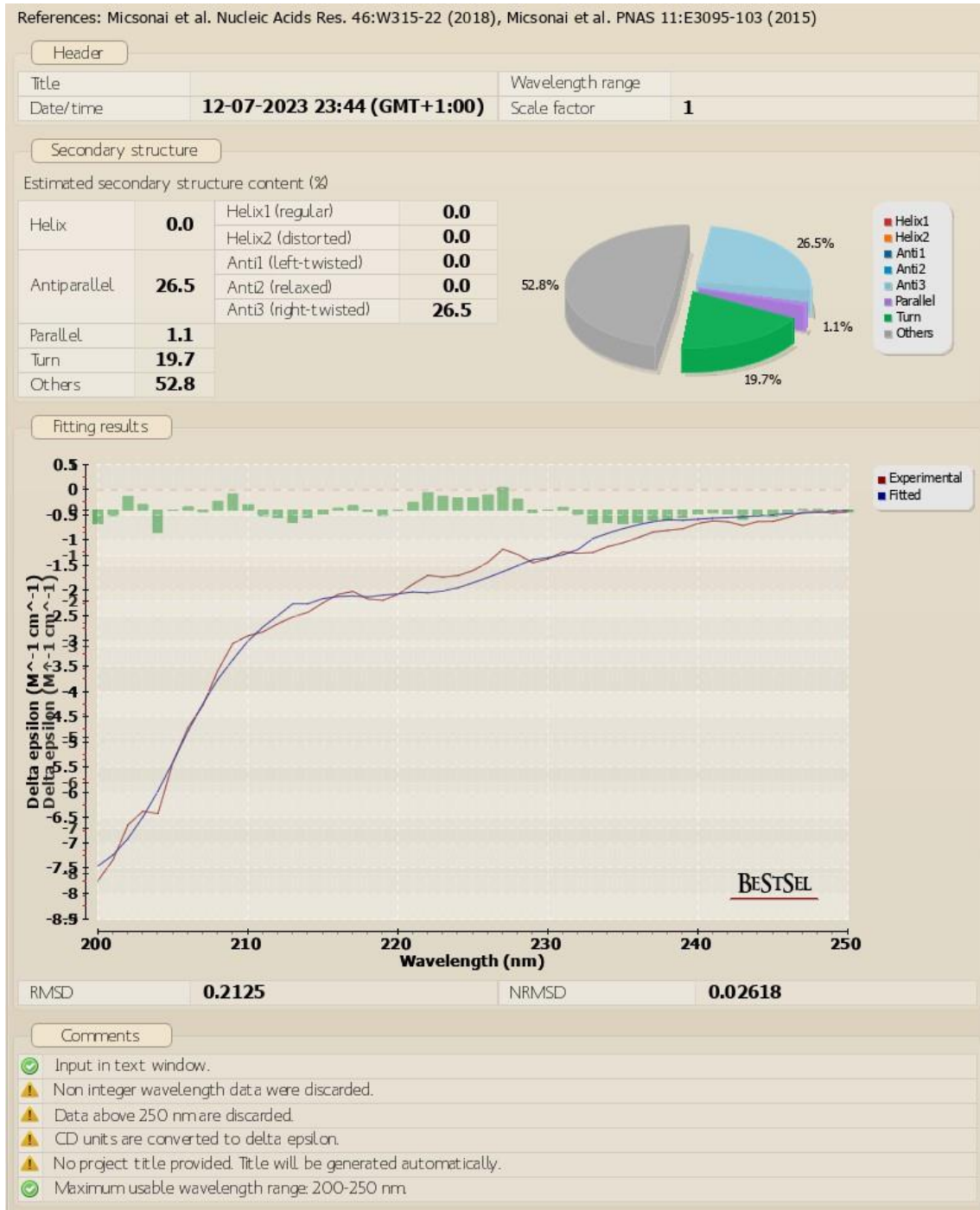


Figura A1: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 0 μ M de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

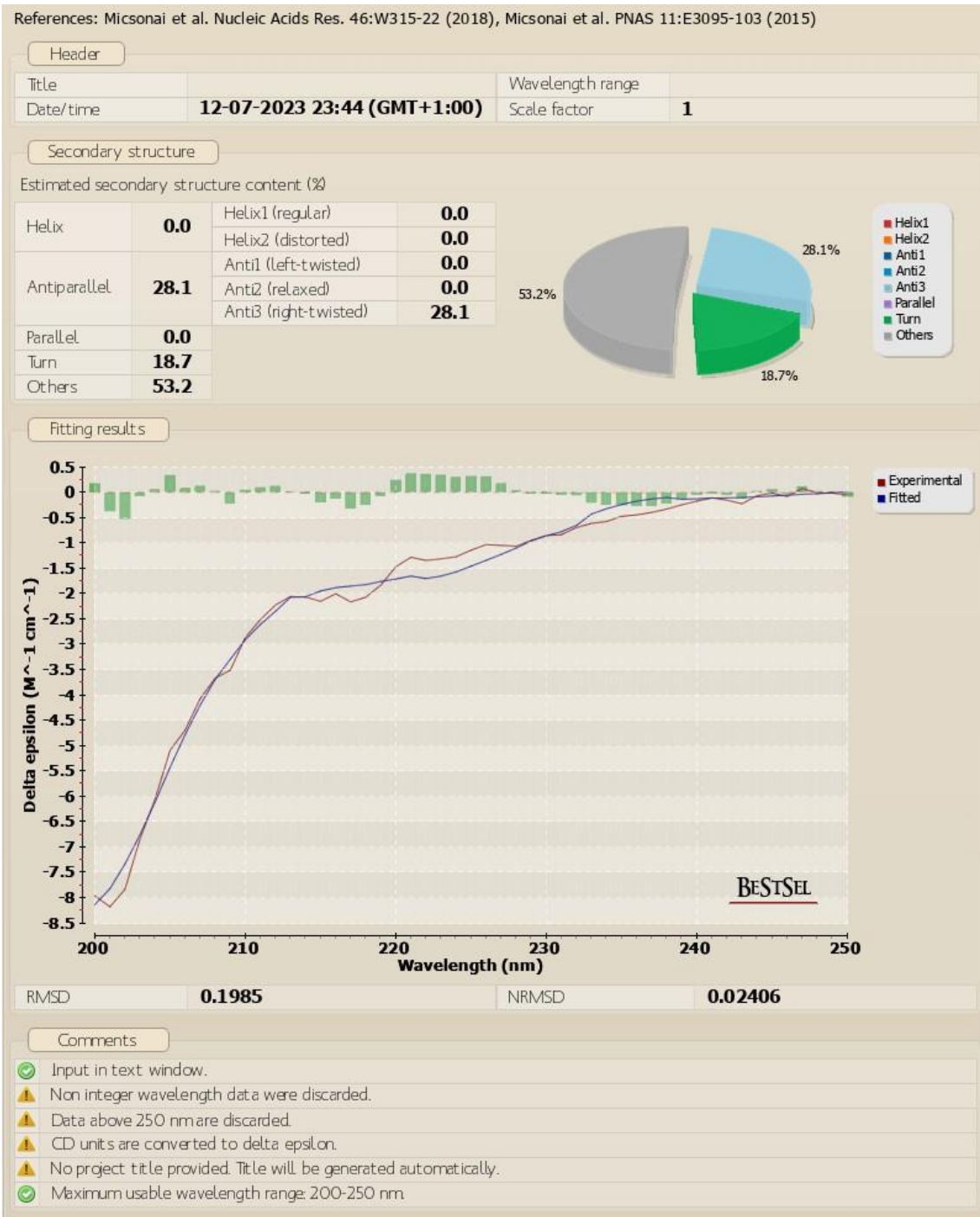


Figura A2: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 40 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

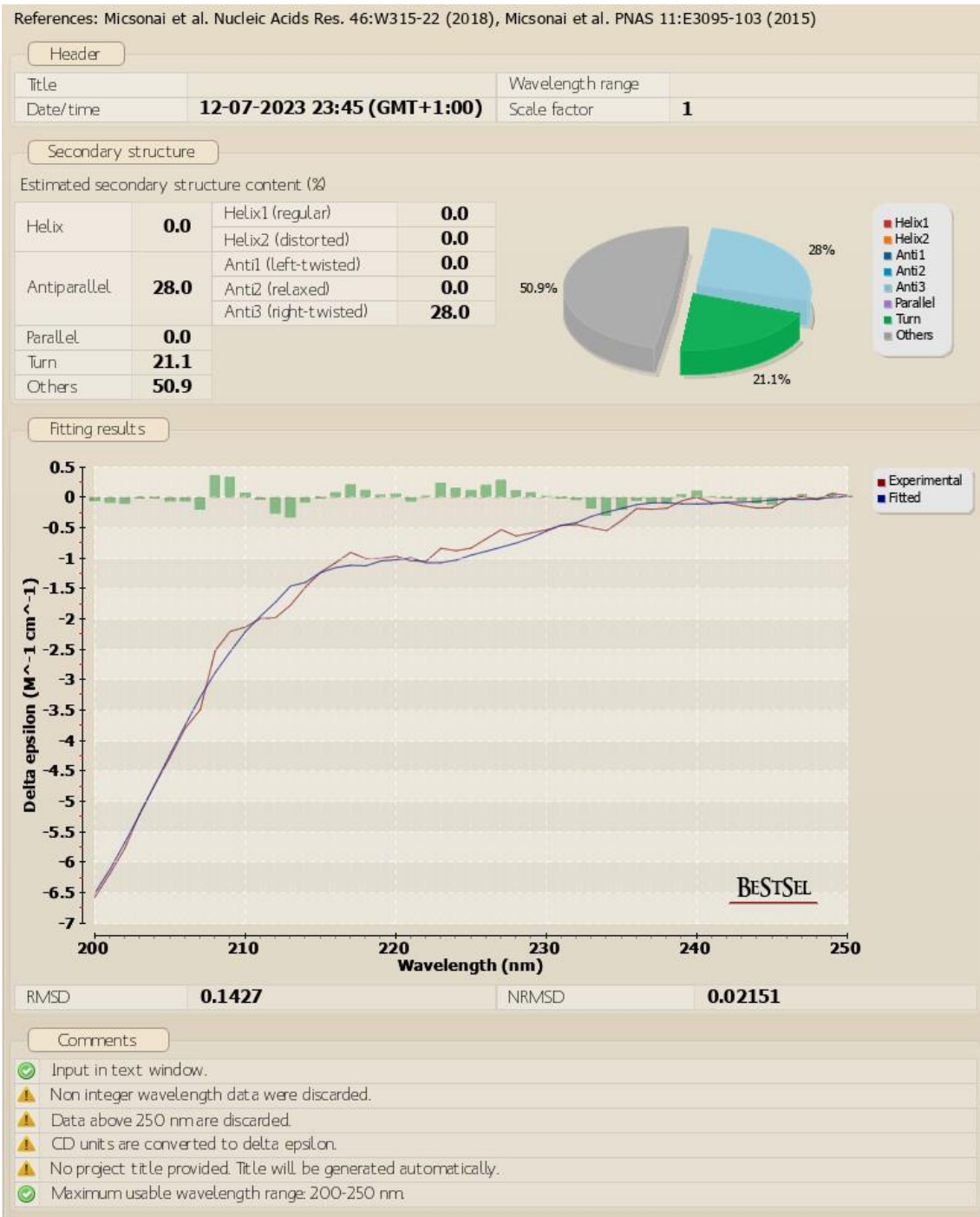


Figura A3: Deconvolução dos dados de elipcidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 80 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

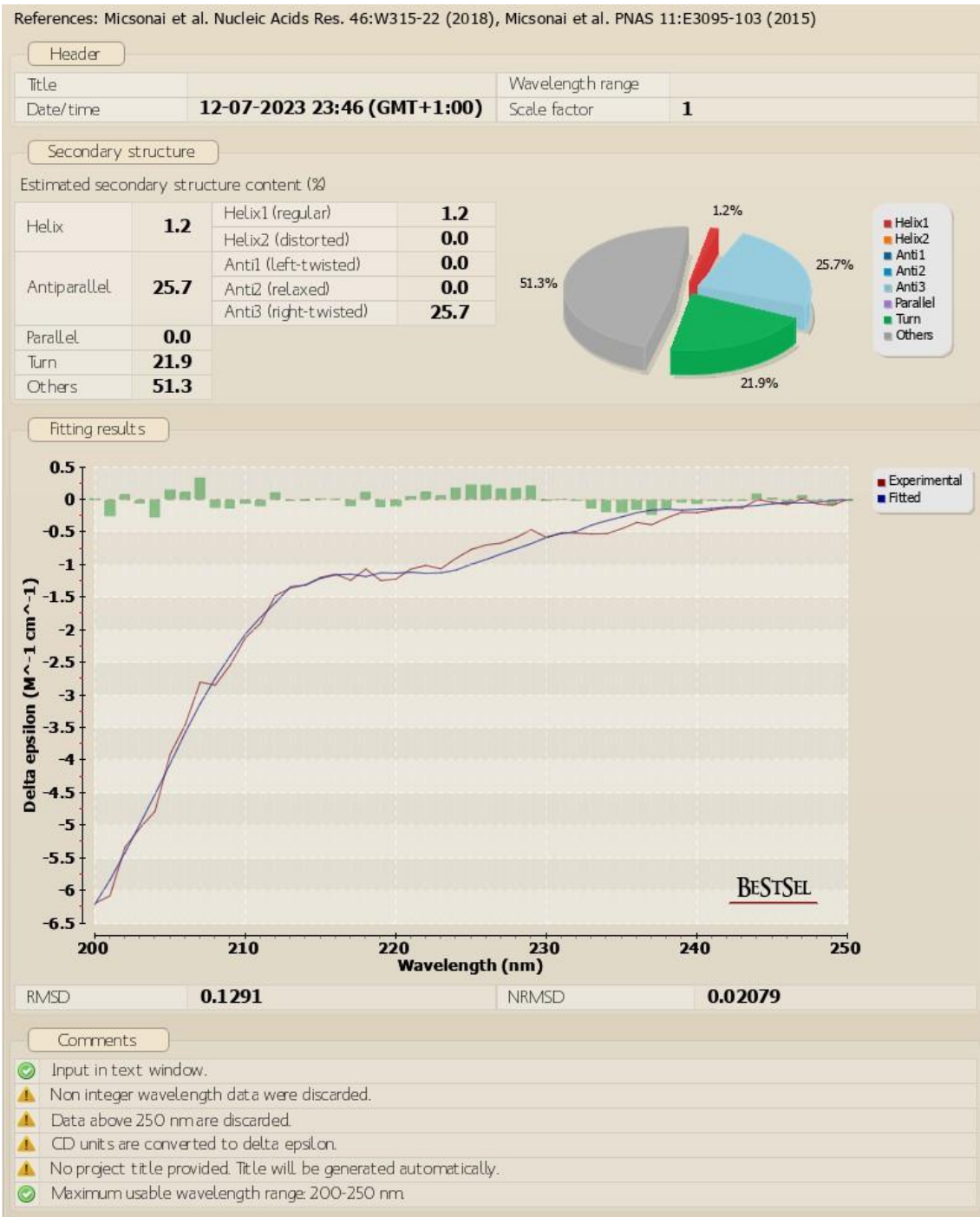


Figura A4: Deconvolução dos dados de elipcidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 160 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

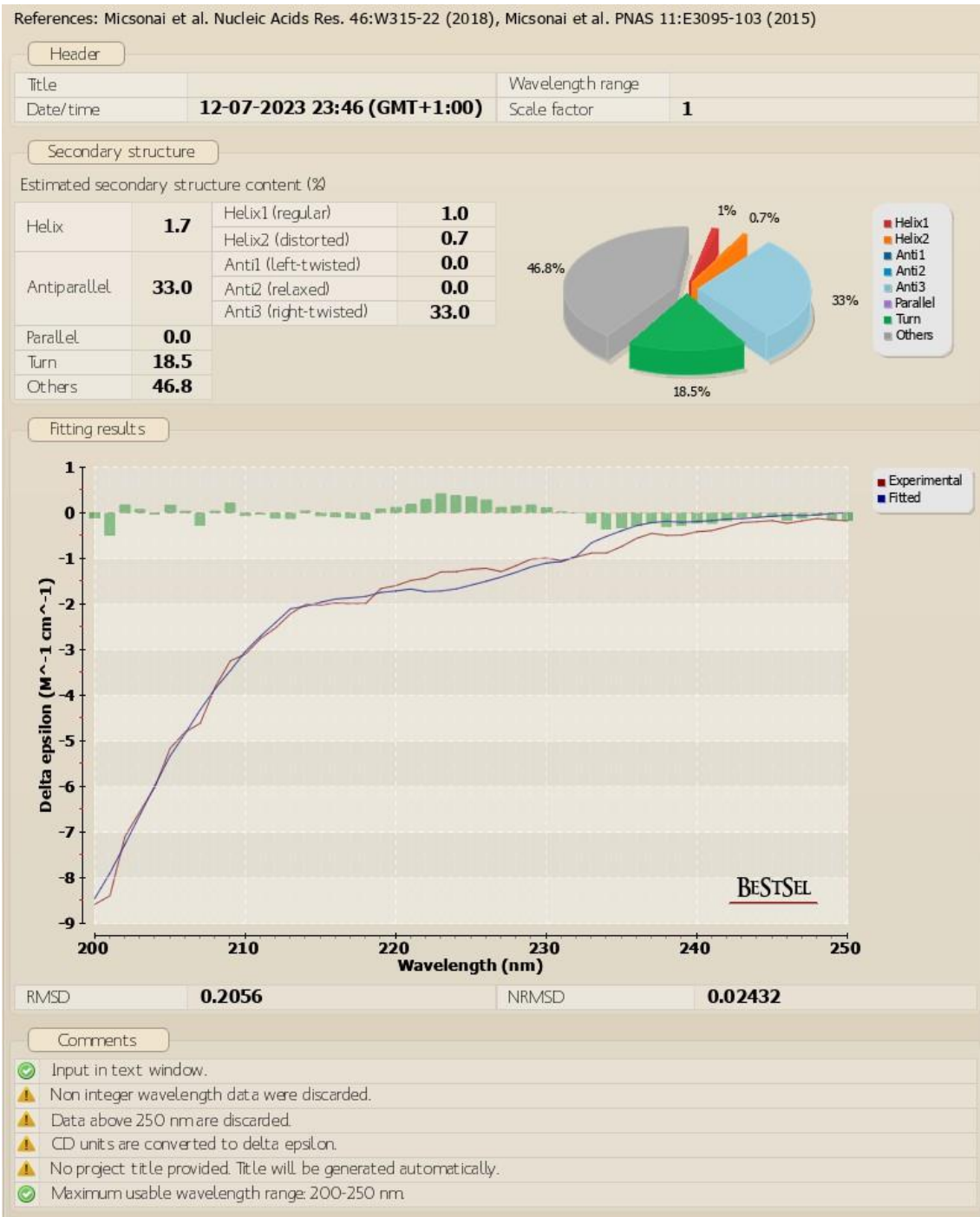


Figura A5: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 320 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

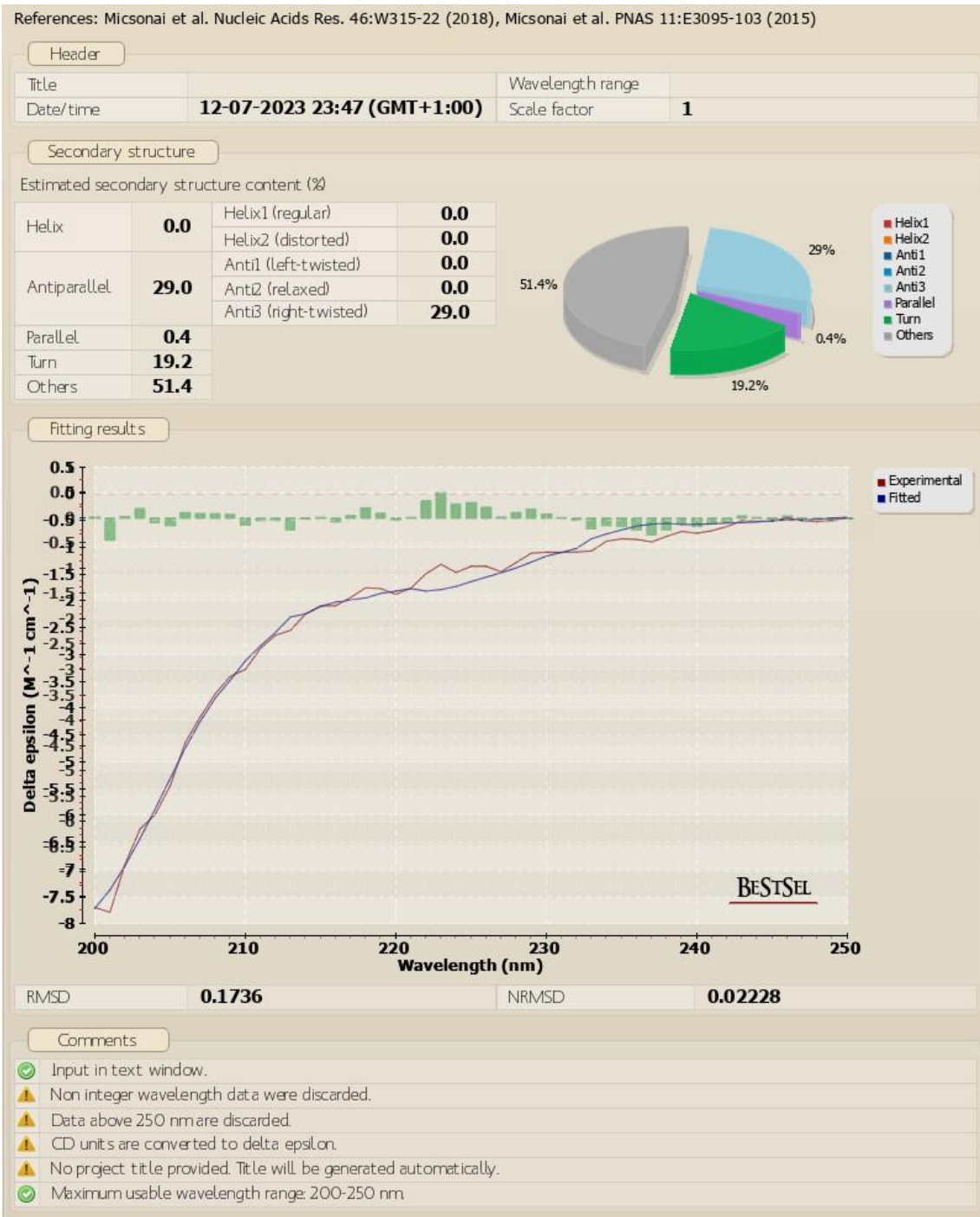


Figura A6: Deconvolução dos dados de elipcidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 640 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

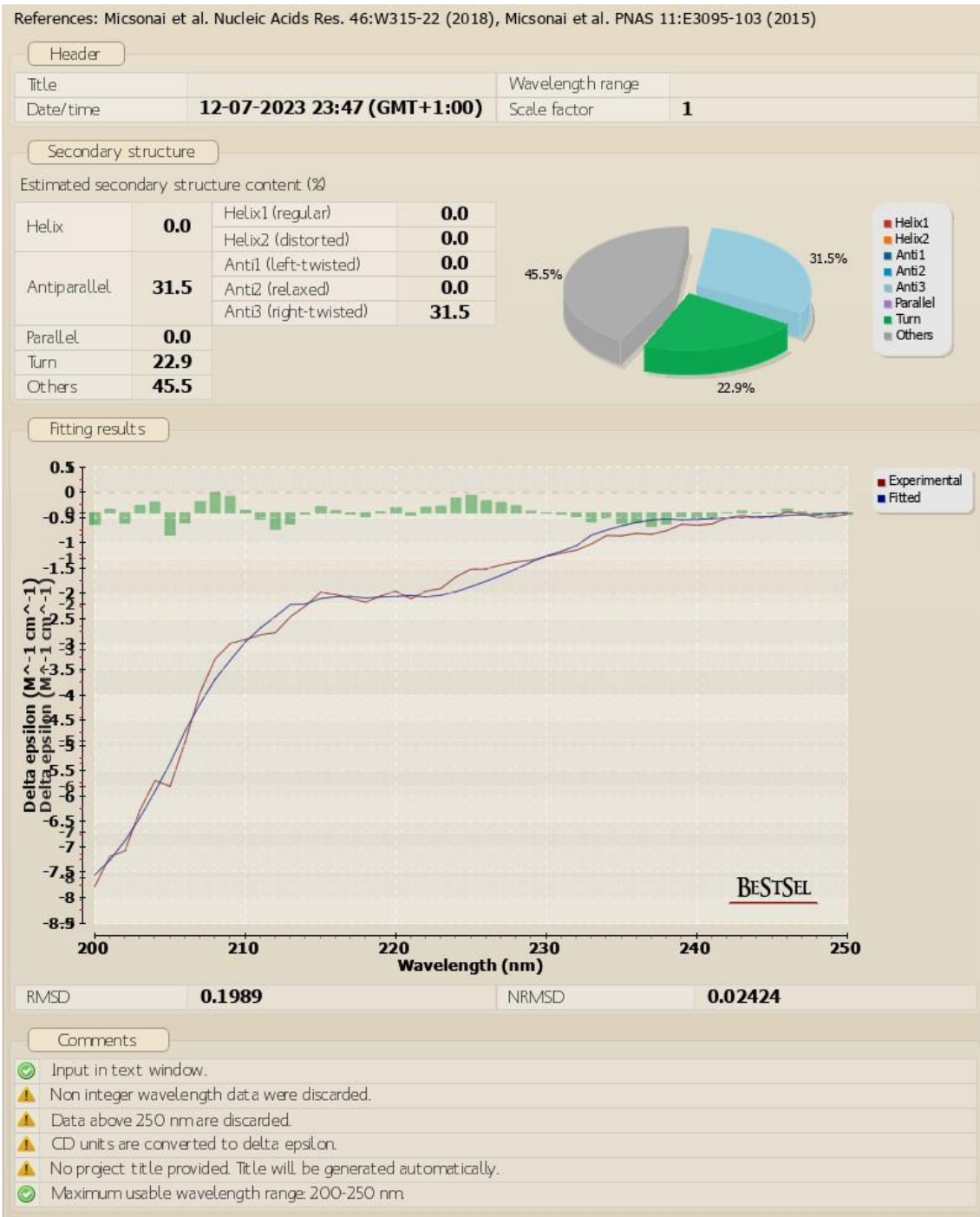


Figura A7: Deconvolução dos dados de elicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 1280 μ M de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

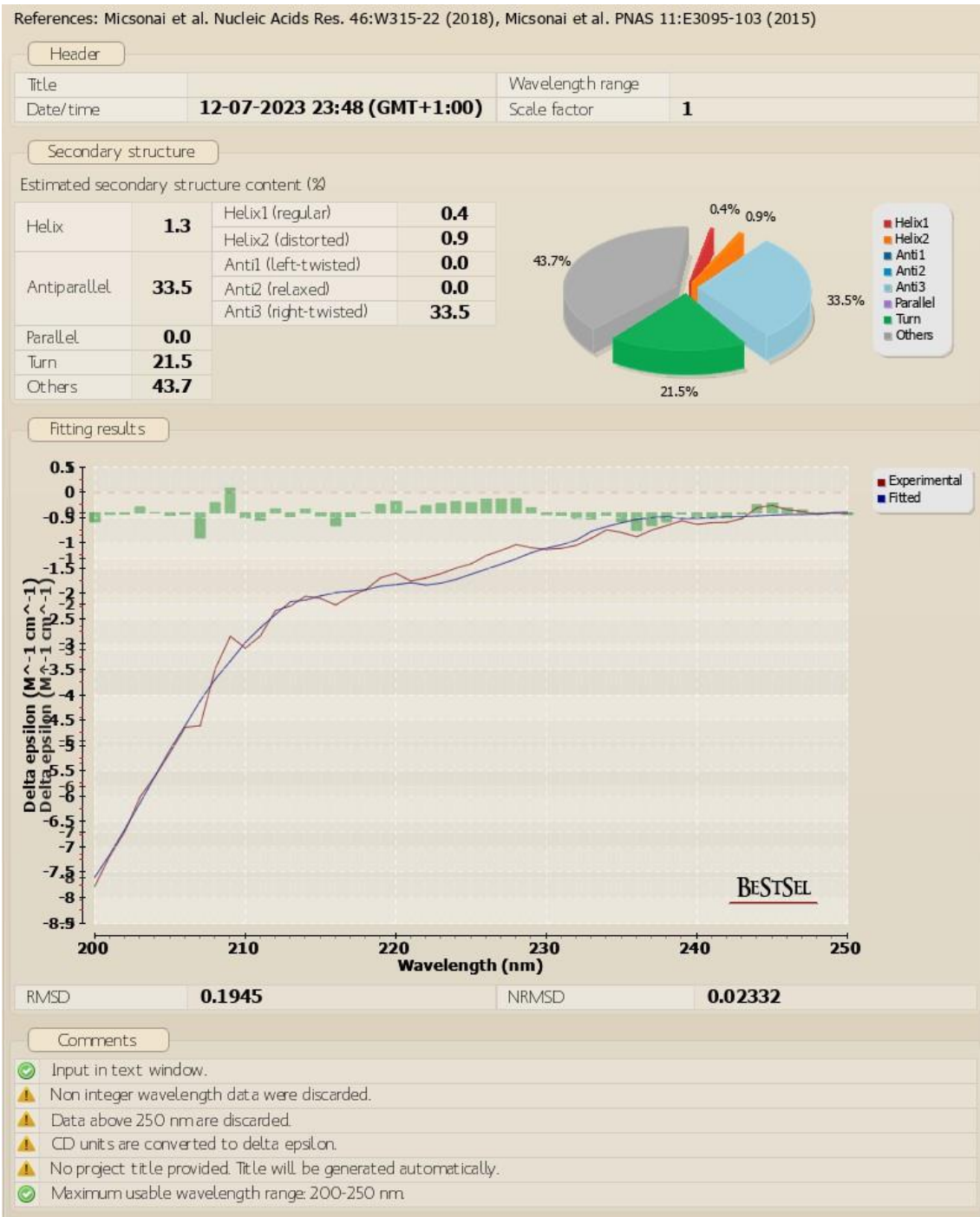


Figura A8: Deconvolução dos dados de elicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 2000 μM de DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

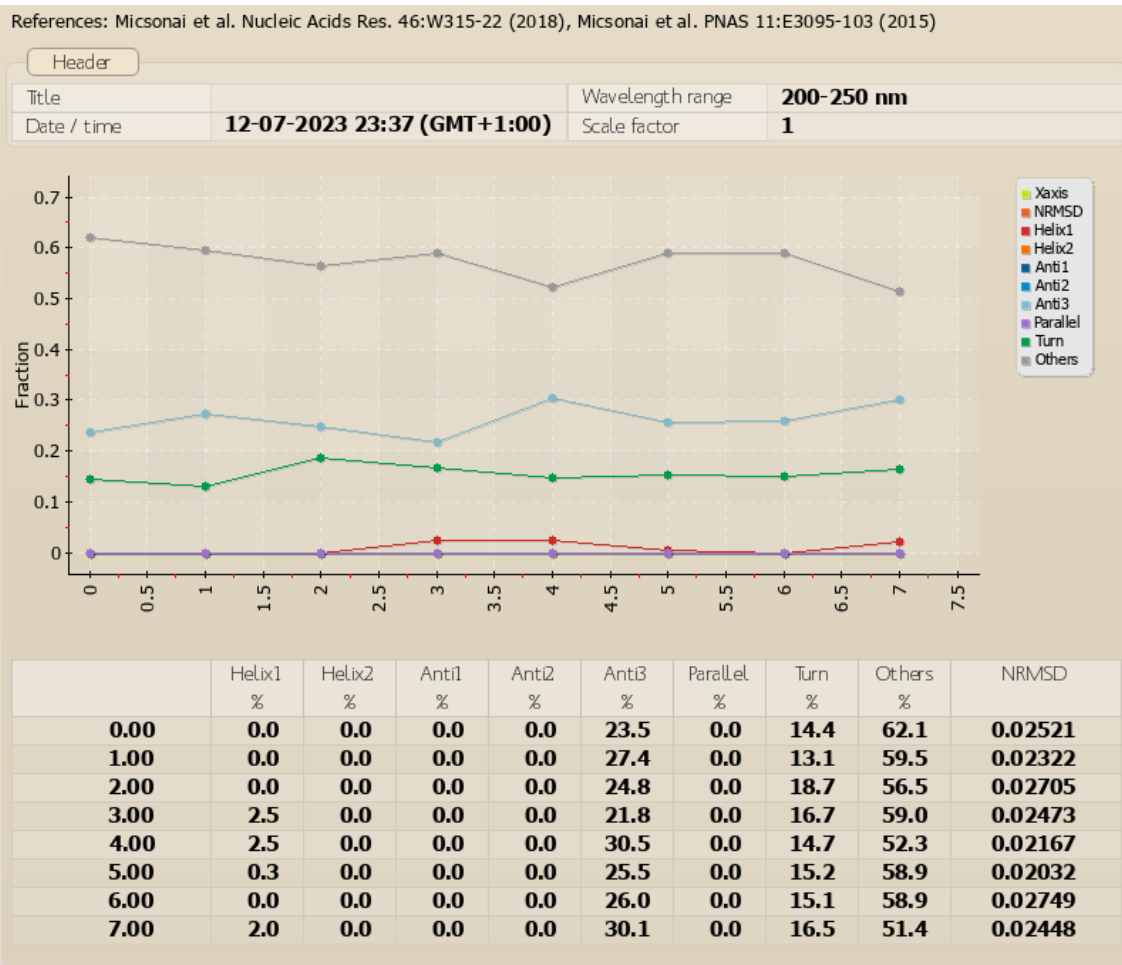


Figura A9: Multi-espectro para todas as soluções DMPC. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 12 jul. 2023.

Anexo B Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para as soluções de peptídeo Hs17 com 2:1 DMPC:DMPG

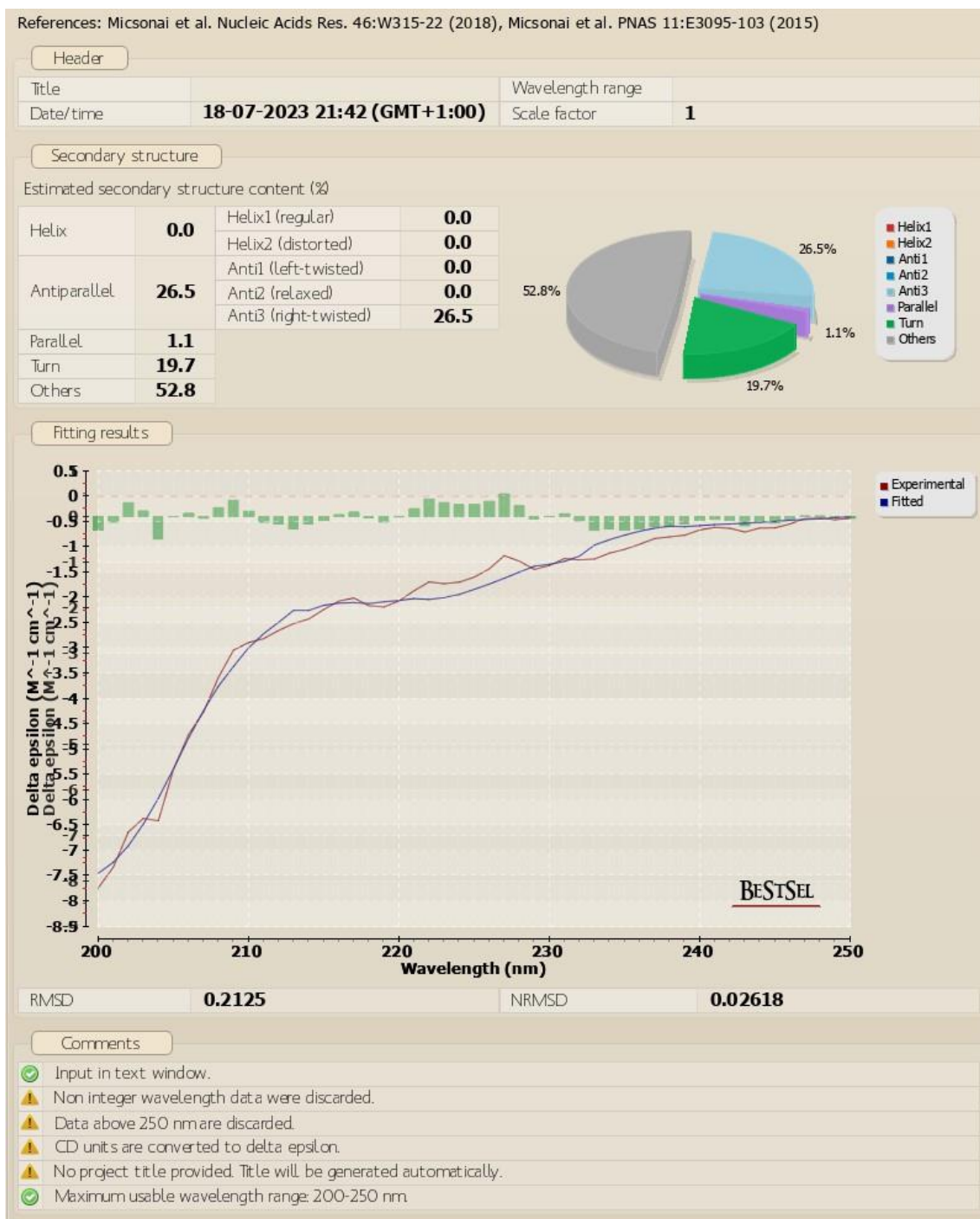


Figura B1: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 0 μ M de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

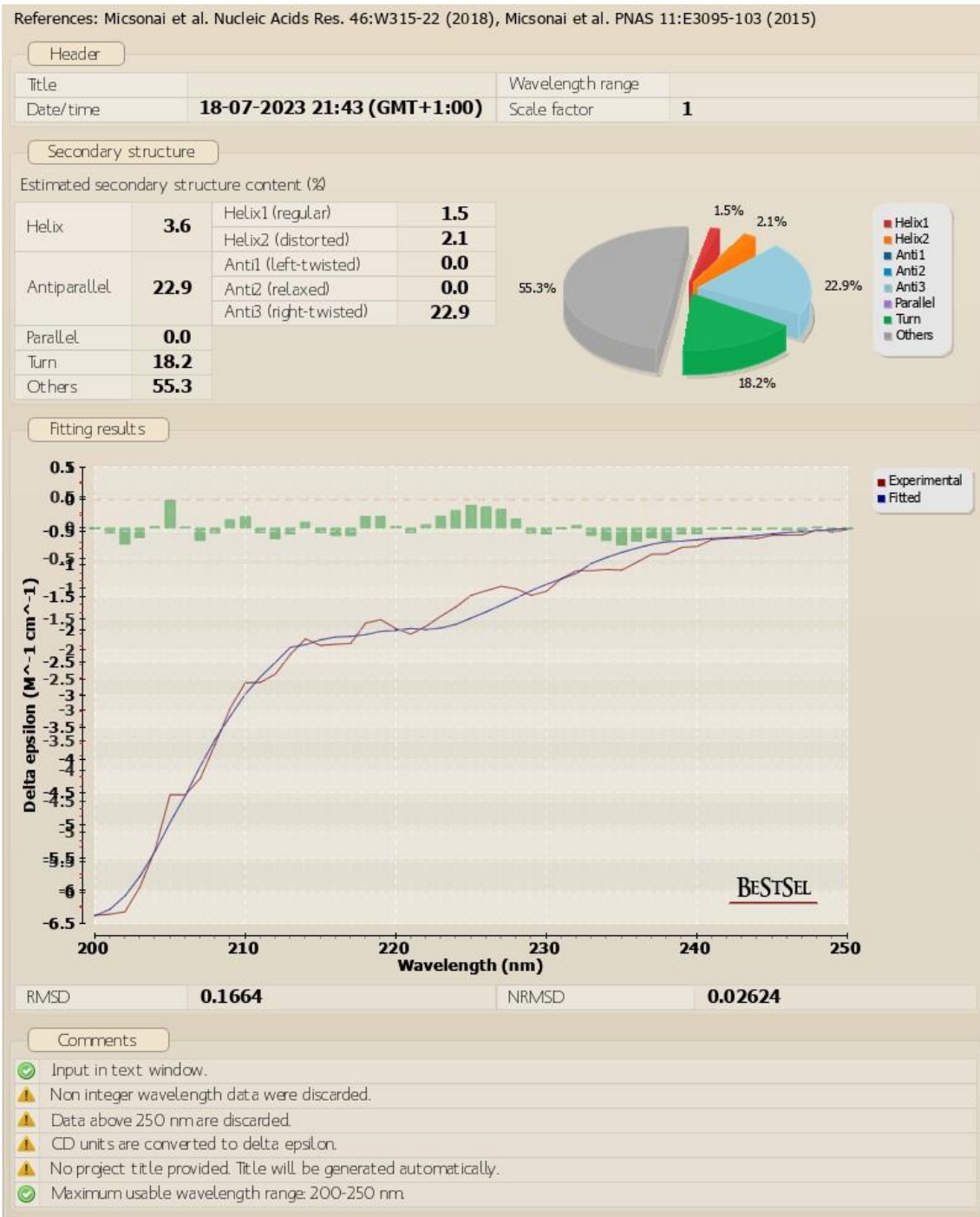


Figura B2: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 40 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

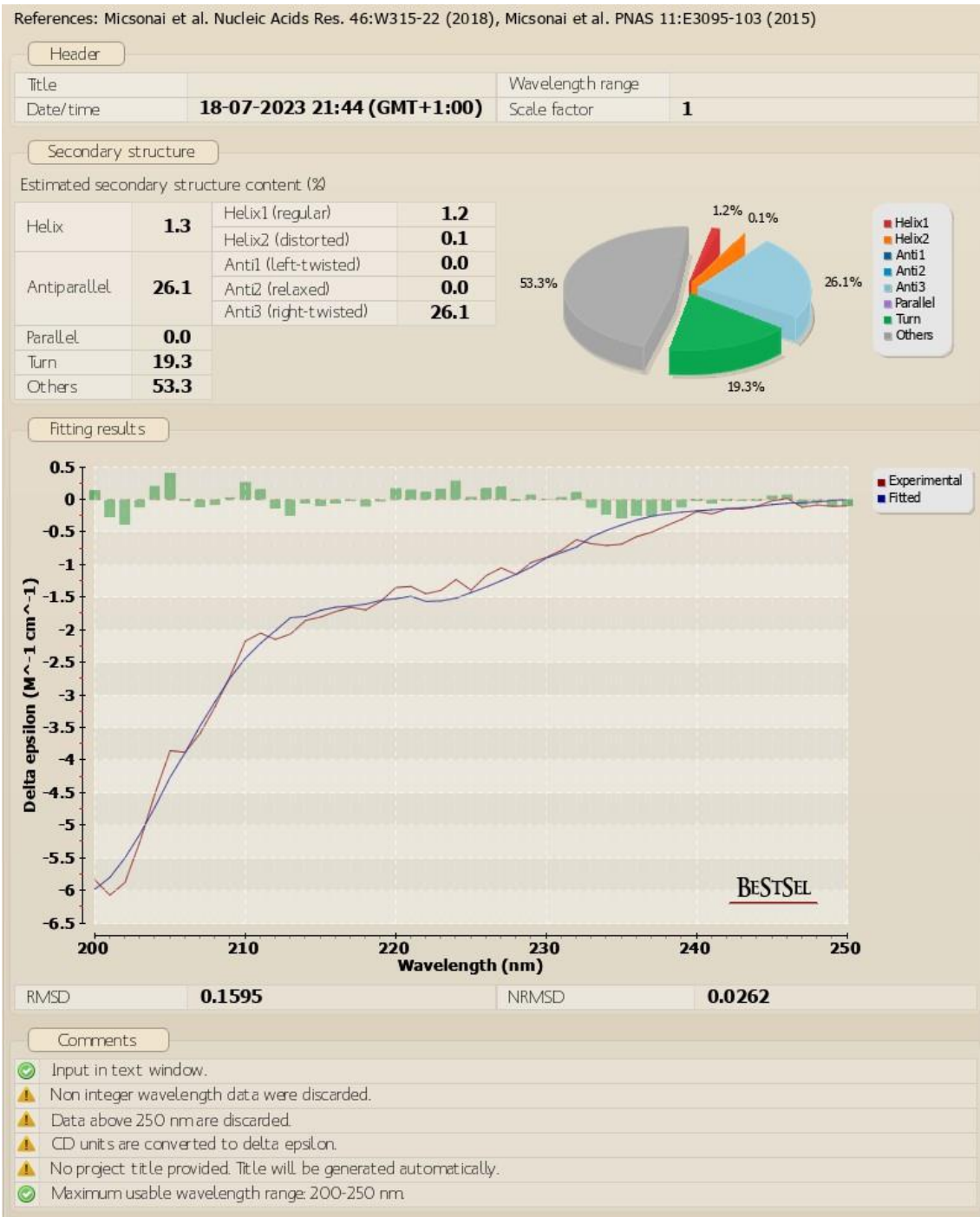


Figura B3: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 80 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

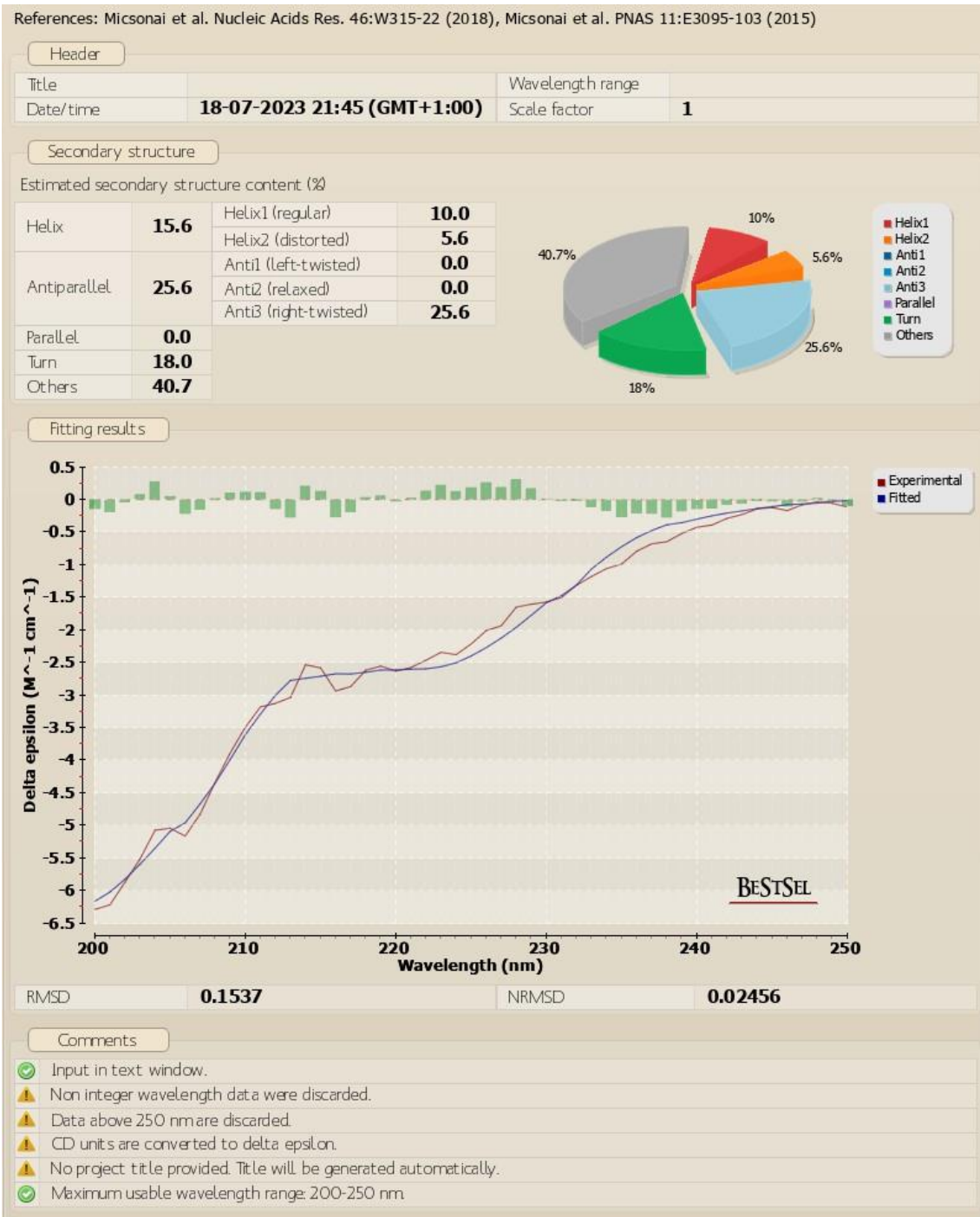


Figura B4: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 160 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

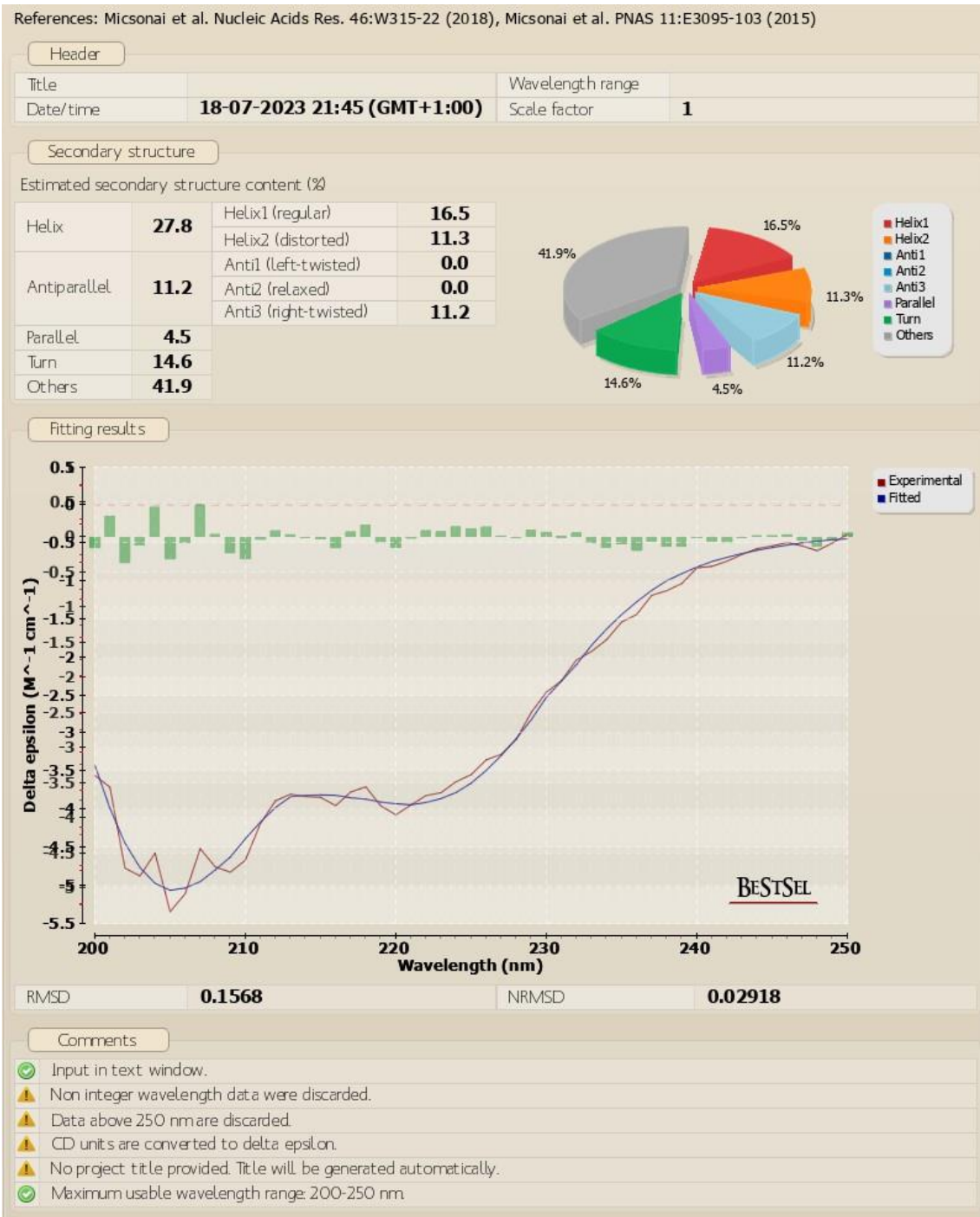


Figura B5: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 320 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

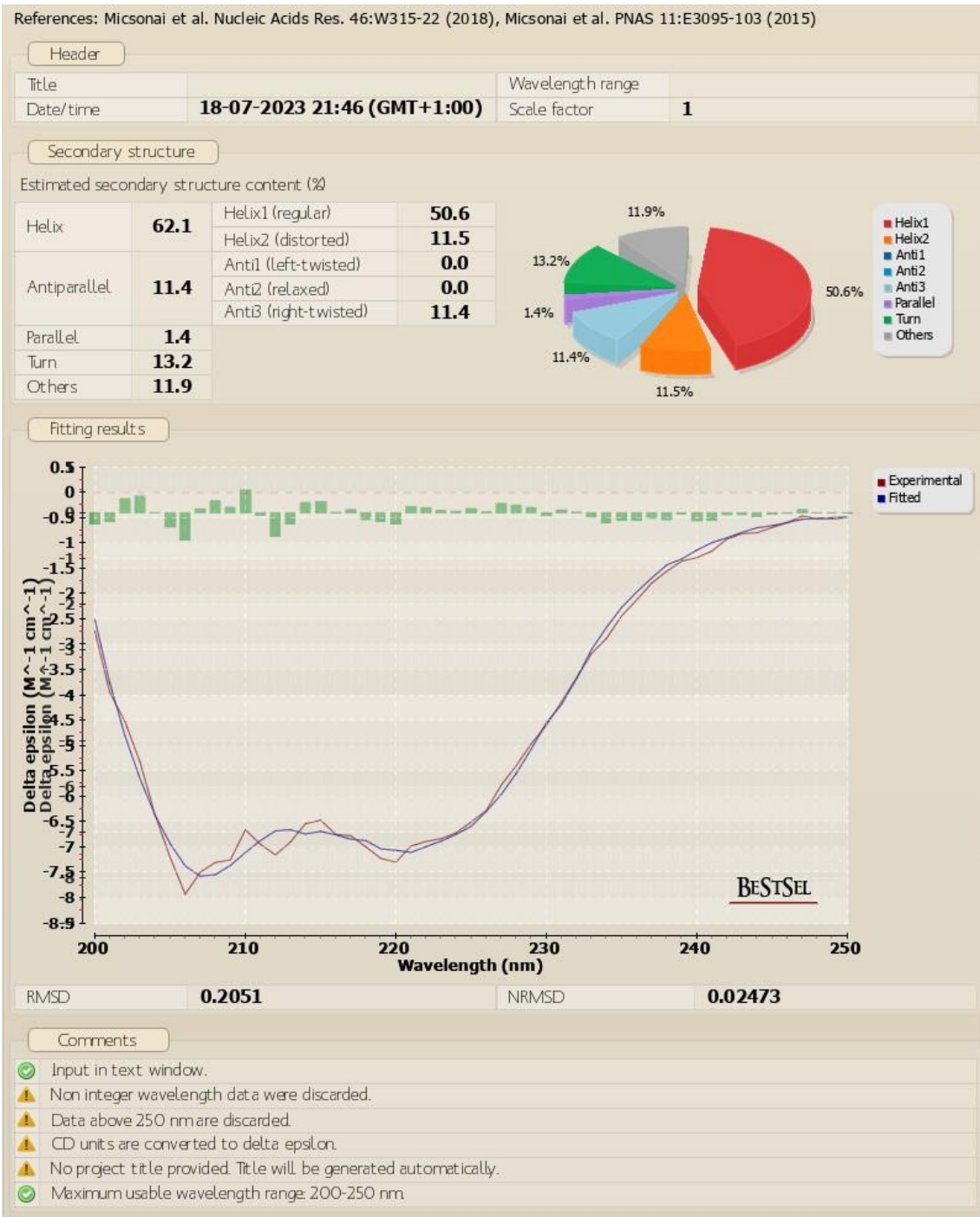


Figura B6: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 640 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

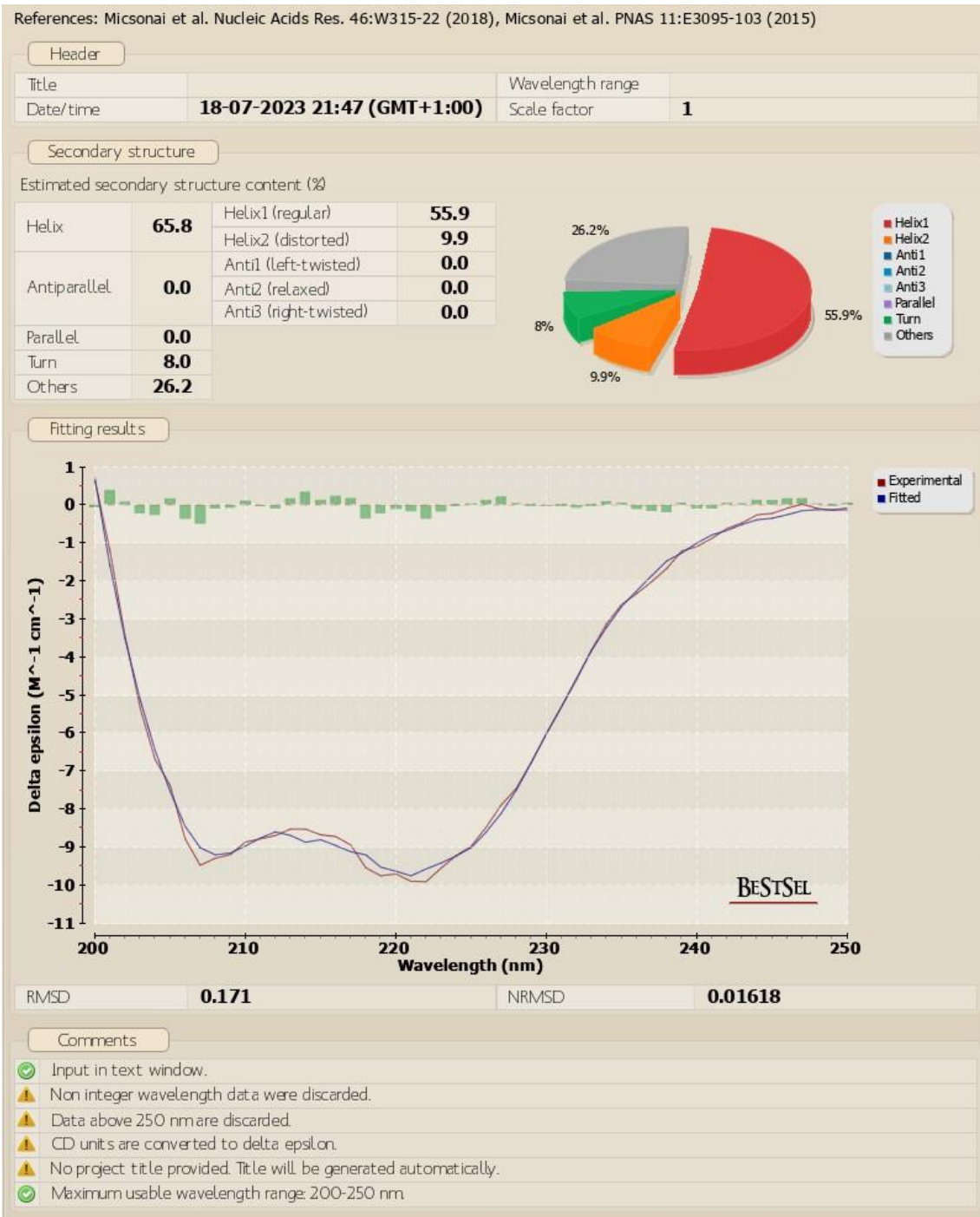


Figura B7: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 1280 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

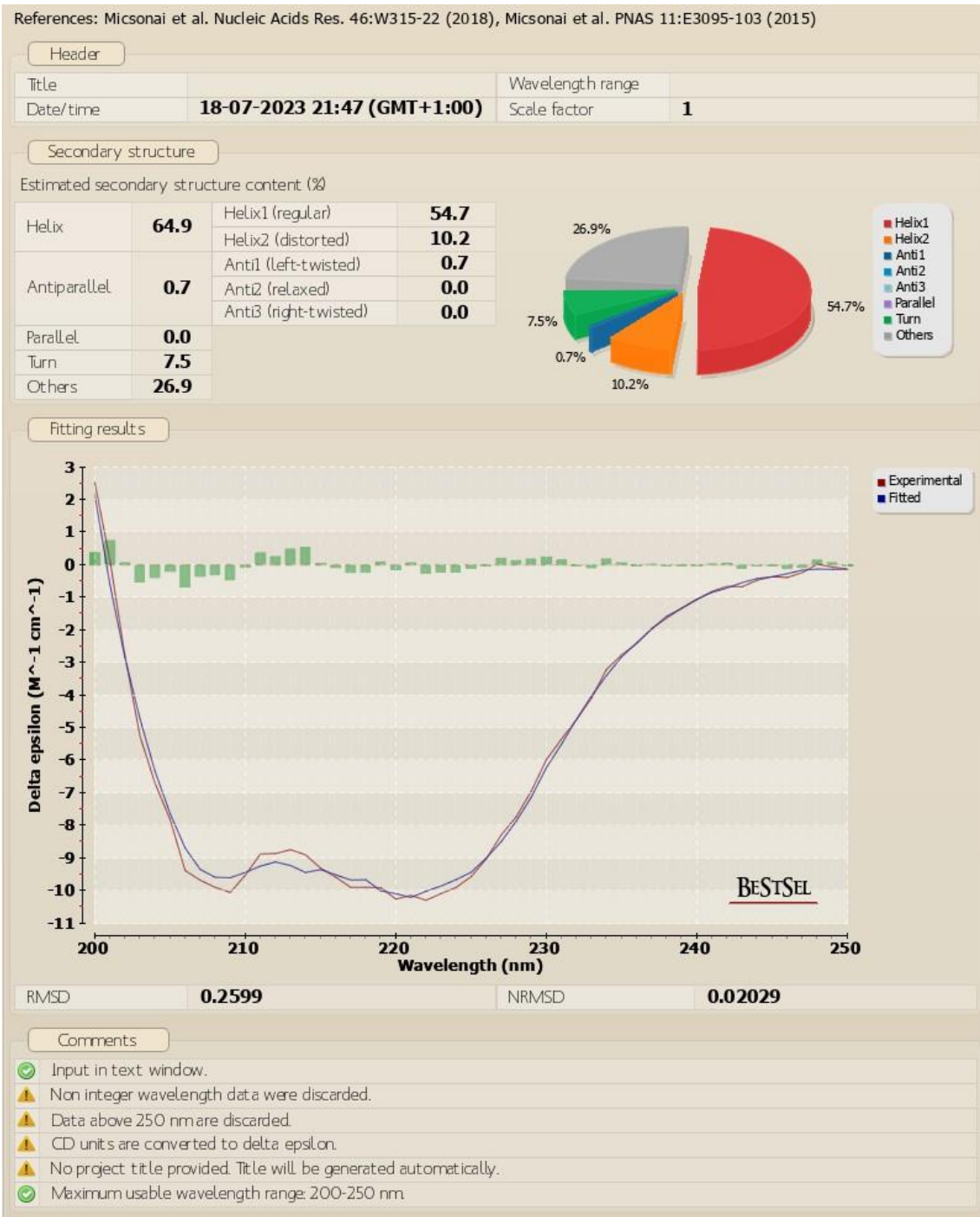


Figura B8: Deconvolução dos dados de elipicidade residual média de dicroísmo circular para a solução de peptídeo Hs17 com 2000 μM de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.

References: Micsonai et al. Nucleic Acids Res. 46:W315-22 (2018), Micsonai et al. PNAS 11:E3095-103 (2015)

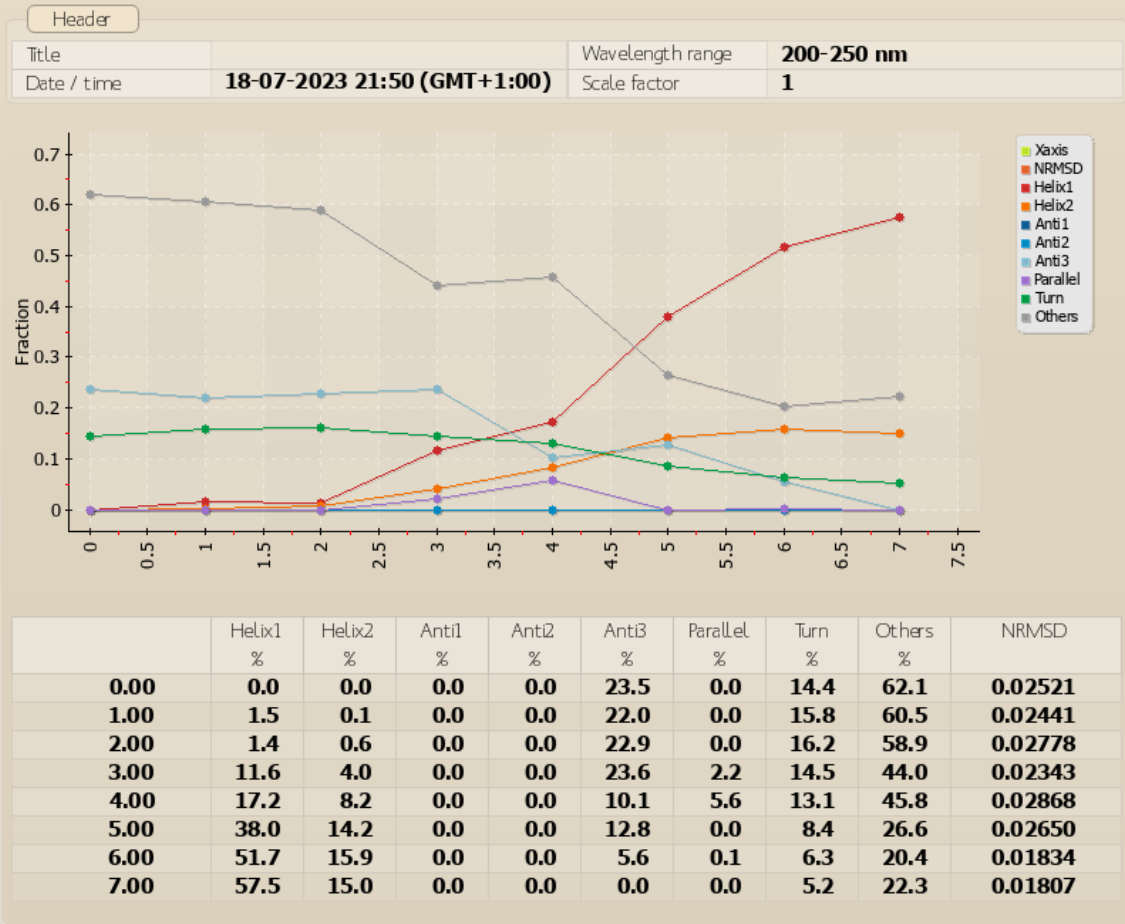


Figura B9: Multi-espectro para todas as soluções de 2:1 DMPC:DMPG. Imagem adquirida do site BeStSel. Acesso em: <https://bestsel.elte.hu/index.php>. Último acesso: 18 jul. 2023.