



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Rafael de Almeida Cordeiro

**Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade
de um peptídeo conjugado ao ácido gálico**

Trabalho de Conclusão de Curso

Brasília – DF

2024/1



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Rafael de Almeida Cordeiro

**Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade
de um peptídeo conjugado ao ácido gálico**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado
em Química apresentado ao Instituto de Química
da Universidade de Brasília.

Orientador(a): Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília – DF

2024/1

Rafael de Almeida Cordeiro

Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de um peptídeo conjugado ao ácido gálico

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Orientador(a): Dr. Guilherme Dotto Brand

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Orientador

Prof. Dra. Ericá Cristina Moreno Nascimento

Membro Titular

Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado

Membro Titular

Prof. Dr. Wender Alves da Silva

Membro Suplente

Agradecimentos

Uma etapa neste exato momento se encerra em minha vida. Em poucas páginas será impossível expressar a gratidão que tenho por todos os momentos e pessoas que passaram por minha vida durante todos esses anos na Universidade de Brasília. Senti raiva, alegria, frustração, mas, ao final, vi que a vida, durante todos esses anos, se mostrou bela. Ou melhor ainda, a vida é incrível, mas, aos olhos da química, ela se torna sublime nos mínimos detalhes.

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Vanicleidia e Edmar, por, em incontáveis momentos, terem lutado para que eu conseguisse a melhor educação possível, mesmo tendo sido privados da oportunidade de um ensino superior. Desde muito cedo, meus pais lutaram por uma bolsa em uma escola de qualidade, sacrificaram-se para me levar e buscar na escola, e lutaram para que eu não passasse por nenhuma privação pela qual, infelizmente, a maior parte dos brasileiros passa. Mãe e pai, muito obrigado pela paciência, apoio e por, em momento nenhum, terem desistido da minha educação. Espero estar me tornando alguém tão forte quanto vocês e ser motivo de orgulho.

Agradeço também ao amor da minha vida, Isabella Klaus, que encontrei durante minha graduação e nunca mais larguei. Obrigado, meu amor, minha melhor amiga, minha melhor química e companheira, por ter aparecido na minha vida. Você me mostrou que amar é a coisa mais bela do mundo, e que quando dois químicos se encontram, o céu se torna um ponto de vista.

Quero agradecer também aos meus mestres que tanto me ensinaram durante esses anos de curso, mas especialmente aos professores Guilherme Dotto, Érica Cristina, Ângelo Machado e Wender Silva.

Professor Guilherme Dotto, obrigado pela paciência e por ter aceitado ser meu orientador. Desde as aulas de química biológica, você me fascinou ao apresentar a harmonia e o caos dos sistemas biológicos por meio de elegantes mecanismos moleculares. Aprendi muito com o senhor e com os livros que me emprestou. Agradeço por ter confiado em mim e pelo espaço de aprendizado na bancada. O auxílio que o senhor me deu nos passos trilhados ao longo desta trajetória nunca será esquecido por mim.

Professora Érica, a senhora tem toda a minha admiração e respeito. Vejo-me muito na senhora. Obrigado por ter me acolhido em seu laboratório para entender um pouco a natureza a partir da físico-química. Em poucos meses, a senhora integrou-se à minha vida como químico e me ensinou muito sobre a vida, método científico e amendoins. Espero me tornar uma pessoa com um coração tão bom e um profissional de excelência como a senhora.

Professores Ângelo Machado e Wender Silva, meus mentores das disciplinas mais poéticas do curso de Química, Reações Orgânicas e seus Mecanismos. Agradeço aos senhores pelos momentos de descontração durante nossos encontros de laboratório. Sou grato por terem sido os responsáveis por fazerem meus olhos brilharem a cada novo mecanismo apresentado. Espero um dia ter o mesmo fascínio que os senhores têm ao ler a natureza de uma maneira tão formidável, a partir das ligações entre carbonos e dos processos catalíticos usando paládio.

Erick, meu irmão de outra mãe, agradeço sua companhia desde o momento em que resolvíamos equações diferenciais nas aulas de Física Zero. Um encontro que, por si só, valeu minha passagem pela UnB. Obrigado por estar presente em tantos eventos da minha vida, sejam eles momentos de tristeza ou alegria, e por todas as incontáveis horas falando sobre ciência, história, filosofia e bobagens.

Aos meus amigos e amigas, em especial Domenick, Yann e Bel, minha eterna gratidão pelos cafés, pelas risadas, pelo carinho e apoio durante minha jornada. Vocês me ajudaram nos momentos em que eu mais precisava. Vocês são os presentes da UnB que levarei para sempre.

Obrigado aos meus colegas do LQC e LSAB pelos momentos de alegria, papos aleatórios e cafezinhos. Vocês sempre foram pessoas solícitas e dedicadas a ajudar nos momentos mais necessários.

Dedico este trabalho ao meu amorzinho de quatro patas que virou uma estrela há pouco tempo. Obrigado à minha eterna Jadinha pelos momentos ao meu lado durante a escrita deste trabalho; a marca que você deixou em minha vida nunca será apagada.

“The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living.”

- Jules-Henri Poincaré

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURA	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. Introdução	16
2. Objetivos	19
2.1. Objetivos gerais	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Revisão biográfica.....	20
3.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs).....	20
3.2. Peptídeos curtos em folhas- β	23
3.3. Células procaríotas	24
3.4. Peptídeos anti-inflamatórios.....	25
3.5. Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos	28
3.6. Ácido Gálico	32
3.7. Conjugados Peptídeo-Droga.....	36
4. Metodologia.....	39
4.1. Síntese de peptídeo em fase sólida	39
4.1.1. Acoplamento do ácido gálico	41
4.1.2. Clivagem	41
4.2. Purificação do conjugado por cromatografia líquida de alta eficiência	42
4.3. Análise do conjugado peptídeo-GA por espectrometria de massa.....	43
4.3.1. Análise de MS e MS/MS	43
4.4. Quantificação do conjugado Hs11-AG	44
4.5. Determinação de MIC e MBC	45
4.6. Citotoxicidade do conjugado	45
5. Resultados e discussão	47
5.1. Síntese do conjugado Hs11-AG e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência	47
5.2. Confirmação da síntese do Hs11-AG por espectrometria de massa.....	48

5.3. Quantificação do conjugado Hs11-AG	52
5.4. Atividade antimicrobiana do conjugado Hs11-AG	53
5.5. Efeito do conjugado Hs11-AG na viabilidade de células de macrófagos murinos	
56	
6. Conclusão	59
7. Referências Bibliográfica.....	60
ANEXO 1	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação em cartoon das estruturas secundárias mais comuns em AMPs. (A) Conformação de α -hélice (representada na cor laranja), estrutura observada no AMP LL-37 ao estar em presença de micelas; (B) Conformação estendida, estrutura observada quando os AMPs não adotam conformação 3D definida, como a Indolicidina; (C) Conformação fita- β (representado na cor verde), normalmente favorecida pela presença de ligações de dissulfeto (representado na cor amarela), por exemplo, peptídeo da aranha gomesina derivado de um gancho-beta. (D) Conformação com junção das estruturas anteriores, por exemplo, o peptídeo de inseto CS α β defensina formicina que contém elementos de α -hélice e fita- β ; Imagem extraída de Koehbach & Craik, 2019.....	22
Figura 2- Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias (1) Gram-positivas e (2) Gram-negativas. Imagem retirada e adaptada de JIMÉNEZ-JIMÉNEZ; MORENO; VALLET-REGÍ, 2022.....	25
Figura 3 - Principais estágios na indução de sepse por bactérias e os pontos potenciais nos quais peptídeos catiônicos podem intervir. A administração de antibióticos pode desencadear a liberação de endotoxinas (LPS), que posteriormente se ligam à proteína ligadora de LPS (LBP) circulante no sangue. Esse complexo é então transferido para o receptor CD14 localizado na superfície das células imunes, iniciando cascatas de sinalização intracelular que levam à produção de citocinas inflamatórias. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) contrapõem esse processo por meio de vários mecanismos: (A) ligando-se diretamente ao LPS, impedindo sua interação com a LBP; (B) competindo com o LPS pela ligação ao complexo de sinalização TLR; (C) inibindo a translocação do NF- κ B para o núcleo; (D) modulando a expressão de genes inflamatórios por meio da ativação direta das vias MAPK; e (E) eliminando diretamente micróbios, seja por meio da desestruturação de suas membranas ou pela interação com moléculas internas(ADAPTADA)(ROSENFELD; SHAI, 2006).....	27
Figura 4 – Representação da estrutura do peptídeo Hs02 em alfa-hélice a partir da interação com micelas de DPC-d38. Onde é demonstrado em vermelho resíduos de carga positiva e em verde os resíduos hidrofóbicos (Guilherme D. Brand et al., 2019).....	29
Figura 5- Dois tipos de folhas- β . (A) Estrutura antiparalela de folha- β (B) Estrutura paralela de folha- β (Alberts et al., 2002).....	30
Figura 6 – Estrutura em 2D do ácido gálico.....	32
Figura 7 - Reação entre íons ferro e espécies reativas de oxigênio.....	34
Figura 8 - Modelo para criação de conjugado peptídeo-droga (ADAPTADA) (FU et al., 2023).....	36
Figura 9- Estrutura da resina Rink Amide (MDHA). Em vermelho está o grupo amino protegido pelo Fmoc e o P representa a cadeia polimérica atrelada a resina (PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014).	39
Figura 10- Fluxograma panorâmico da síntese de peptídeos em fase sólida.....	42

Figura 11 - Cromatograma correspondente a purificação do conjugado Hs11-AG com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha azul) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha cinza) e 280nm (representado pela linha vermelha), onde o Hs11-AG e o Hs11-AG-AG eluíram em tempos de retenção de 26,71 minutos e 27,29 minutos, respectivamente.....	47
Figura 12- A) Espectro de MS do conjugado Hs11-AG. B) Série isotópica do referente ao íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$	48.
Figura 13- Estrutura em modelo 2D do Hs11-AG desenhado no software ChemDraw Pro 8.0.....	49
Figura 14- A) Espectro de MS do conjugado Hs11-AG-AG. B) Série isotópica do referente ao íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$	49
Figura 15- Estrutura em modelo 2D do Hs11-AG-AG desenhado no software ChemDraw Pro 8.0...	50
Figura 16- Espectro de MS/MS do Hs11-AG destacando a estrutura do AG e a identificação do íon precursor $[M+3H]^{3+}$	51
Figura 17- Espectro de MS/MS do Hs11-AG-AG destacando a estrutura tanto monomérica quanto dímera do AG, com identificação do íon precursor $[M+3H]^{3+}$	51
Figura 18- Curva analítica AG de equação $y=7125,1x-0,0645$ ($R^2=0,9801$) construída a partir da regressão linear dos dados da tabela 4.....	53
Figura 19 - Ensaio de viabilidade celular MTT para verificar o efeito do conjugado Hs11-AG em BMDM após exposição de 24H.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em μM , para bactérias patogênicas humanas (SANTOS et al., 2023).....	31
Tabela 2 – Massas teóricas e experimentais de fragmentos detectados em EM do Hs-AG.....	52
Tabela 3 – Massas teóricas e experimentais de fragmentos detectados em EM do Hs-AG-AG.....	52
Tabela 4 -Valores de concentração e absorvância em 280 nm.....	52
Tabela 5 – Valor de MIC e MBC, dado em μM , para bactérias patogênicas humanas.....	54

LISTA DE ABREVIATURA

ACN: Acetonitrila

ARE: Antioxidant Response Element

AMP: Peptídeos antimicrobianos

CAT: Catalase

CAIQ: Central Analítica do Instituto de Química

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

DCM: Diclorometano

CD14: do inglês, Cluster of Differentiation 14

DIC: N, N'-diisopropilcarbodiimina

DIPEA: N-N'-diisopropiletilamina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMF: N, N-dimetilformamida

ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay

Esl: do inglês, Electrospray

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil

GSH: Glutaciona

GPx: Glutaciona Peroxidase

HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluroicohexafluorofosfato

HCCA: Ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico

HDP: Peptídeos de defesa de hospedeiro

IAP: Peptídeos antimicrobianos intragênico

IL: Interleucina

IR: Razão da infecção

KCN: Cianeto de potássio

LIMI: Laboratório de imunologia e inflamação

LPB: Proteína de ligação ao LPS

LPS: Lipopolissacarídeos

MICs: Concentração mínima inibitória

NF-kB: Fator nuclear kB

Oxyma: Acetato de etil 2-ciano-2- (hidroxiimino)

P: Fosfato

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Superóxido Dismutase

SPFS: Síntese de peptídeos em fase sólida

TFA: ácido trifluoroacético

TLR4: Receptor do tipo 4

TNF- α : Fator alfa de necrose de tumor

TLR-4: Receptor do tipo toll 4

UCB: Universidade Católica de Brasília

UnB: Universidade de Brasília

UV-Vis: Espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível

RESUMO

A resistência a antibióticos é um desafio global porque compromete a eficácia dos tratamentos tradicionais e impulsiona o desenvolvimento de novas estratégias para combater agentes patogênicos humanos. O ácido gálico (AG), um polifenol distribuído em uma variedade de plantas do reino vegetal, tem demonstrado atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. O presente projeto apresenta o desenho de um conjugado peptídeo-droga (PDC) formado pelo peptídeo intragênico antimicrobiano (IAP), Hs11, e AG, no qual o peptídeo em questão apresentou grande amplitude de alvos e boa seletividade, podendo ser comparável aos Peptídeos Antimicrobianos (AMPs). Considerando que tanto o IAP Hs11 quanto o AG exibem atividades antimicrobianas, embora por meio de mecanismos de ação potencialmente distintos, foram realizados ensaios de Concentração Inibitória Mínima (MIC) para comparar a atividade antimicrobiana das duas moléculas, tanto separadamente quanto após a sua conjugação. Além disso, buscou-se, por meio de ensaios de citotoxicidade, determinar como adições crescentes na concentração do conjugado Hs11-AG afetariam a viabilidade celular de macrófagos murinos (BMDM). A partir dos dados gerados no presente trabalho, foi possível determinar uma redução na potência do conjugado Hs11-AG como antimicrobiano em relação ao peptídeo, porém um aumento em relação ao produto natural. Por meio de ensaios de viabilidade em BMDM, demonstrou-se que o PDC reduziu a viabilidade das células em concentrações inferiores ao peptídeo e ao AG, tornando-se então mais citotóxico. Em suma, os resultados atingidos foram insatisfatórios nos modelos avaliados; todavia, o desenho da molécula apresentada demonstra potenciais atividades em outros modelos biológicos, como no controle de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e no controle de parasitas intracelulares, atividades estas que serão futuramente avaliadas.

Palavras-chave: Peptídeo intragênico antimicrobiano, ácido gálico, conjugado peptídeo droga.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a global challenge because it compromises the effectiveness of traditional treatments and pressures the development of new strategies to combat human pathogens. Gallic acid (GA), a polyphenol distributed in various plant species, has demonstrated antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant activities. This project presents the design of a peptide-drug conjugate (PDC) composed of the intragenic antimicrobial peptide (IAP), Hs11, and GA. The peptide in question showed a broad range of targets and good selectivity, comparable to Antimicrobial Peptides (AMPs). Considering that both IAP Hs11 and GA exhibit antimicrobial activities, albeit through potentially distinct mechanisms of action, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays were conducted to compare the antimicrobial activity of the two molecules, both separately and after their conjugation. Additionally, cytotoxicity assays were performed to determine how increasing concentrations of the Hs11-GA conjugate would affect the cell viability of murine macrophages (BMDM). From the data generated in this work, it was possible to determine a reduction in the potency of the Hs11-GA conjugate as an antimicrobial compared to the peptide, but an increase compared to the natural product. Viability assays in BMDM demonstrated that the PDC reduced cell viability at lower concentrations than the peptide and GA, thus becoming more cytotoxic. In summary, the results achieved were unsatisfactory in the evaluated models; however, the design of the presented molecule demonstrates potential activities in other biological models, such as in the control of Reactive Oxygen Species (ROS) and the control of intracellular parasites, activities that will be evaluated in future studies.

Keywords: Intragenic antimicrobial peptide, gallic acid, peptide-drug conjugate

1. Introdução

Nos últimos anos, o aumento no uso de antibióticos tem desafiado a comunidade científica a desenvolver novas drogas capazes de contornar a resistência por parte de bactérias patogênicas (BASSETTI et al., 2013). Devido o surgimento de organismos resistentes aos antibióticos que anteriormente eram eficazes, tornou-se essencial o desenvolvimento de novas drogas (BASSETTI et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), componentes do sistema imune presentes em organismos distribuídos pelos seis reinos, surgem como potenciais estratégias para o tratamento de organismos patogênicos (WANG et al., 2019a). Capazes de mitigar os efeitos da resistência bacteriana adquirida, os AMPs interagem com múltiplos alvos na bactéria, ao contrário de fármacos que possuem alvos específicos e são suscetíveis à indução de resistência bacteriana (ZHANG; XU; DONG, 2022).

Bactérias são classificadas quanto a composição de sua membrana celular. Bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta por fosfolipídios e lipopolíssacarídeo (LPS). O LPS é crucial para a integridade bacteriana e confere resistência a compostos antimicrobianos. Interage com cátions divalentes para manter sua estabilidade e, ao interagir com o Receptor do tipo 4 (TLR4) presentes em células do hospedeiro, induz resposta imunológica inflamatória, podendo levar à sepse (ZHANG; MEREDITH; KAHNE, 2013). Por outro lado, Bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa como as Gram-negativas, mas possuem um peptidoglicano espesso e glico-polímeros superficiais, como os ácidos teicóicos (RUHAL; KATARIA, 2021).

Tendo a célula procarionte como alvo biológico, os AMPs possuem propriedades físico-químicas comuns que são fundamentais para sua atividade. Um dos principais parâmetros é a carga líquida positiva, determinada pelo número de resíduos de aminoácidos positivamente carregados que compõem o peptídeo. Essa carga positiva é crucial para a interação eletrostática dos AMPs com componentes negativamente carregados da membrana das bactérias, mencionados anteriormente. Outra característica significativa é a anfifilicidade, que descreve a separação entre resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos em relação à membrana bacteriana e dita sua

conformação. A estruturação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) após a interação com membranas pode levar a conformações como α -hélices ou folhas- β . Essas conformações são influenciadas pela distribuição de resíduos hidrofóbicos ao longo do peptídeo. A presença desses resíduos hidrofóbicos está associada à ruptura da bicamada lipídica bacteriana, devido à sua capacidade de permeabilidade (TAN; FU; MA, 2021; ZHANG; XU; DONG, 2022).

Estudos conduzidos por Brand et al. buscaram, por meio do software Kamal, sequências de peptídeos dentro de proteínas que, uma vez sintetizados como entidades individuais, apresentam propriedades similares às dos AMPs. Esses peptídeos recebem o nome de Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs) e tiveram como parâmetro de busca propriedades físico-químicas semelhantes às encontradas nos AMPs, como carga líquida positiva, estrutura secundária e anfifilicidade (BRAND et al., 2012; RAMADA et al., 2017). Um dos IAPs que apresentou destaque foi o peptídeo Hs02, proveniente da miosina humana não-convencional-1h, que se estruturou em α -hélice frente a modelos de membranas lipídicas bacterianas. Demonstrando a capacidade de romper membranas bacterianas em concentrações baixas, o Hs02 apresentou potencial comparado a AMPs conhecidos. Apresentou capacidade de reduzir a proliferação de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), e de inibir a produção de citocinas em células imunes estimuladas por LPS, indicando seu potencial como um poderoso peptídeo anti-inflamatório (BRAND et al., 2019). IAPs em conformações de folhas- β foram também prospectadas usando o software Kamal. Identificaram-se cinco peptídeos curtos com perfil alternado de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, destacando-se o Hs10 pela eficácia contra bactérias Gram-negativas e baixa citotoxicidade, tanto quanto o peptídeo Hs11 que demonstrou considerável atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sem afetar a viabilidade celular em concentrações elevadas, além de reduzir a liberação de TNF- α induzida por LPS (SANTOS et al., 2023).

Porém não são só os peptídeos que figuram como alternativas aos antibióticos convencionais na luta contra os microrganismos resistentes. Os ácidos fenólicos são encontrados em uma variedade de chás, ervas e alimentos e dentre eles, destaca-se o ácido gálico (AG), também conhecido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. O AG apresenta uma ampla atividade antimicrobiana contra uma variedade de células

procarióticas causadoras de infecções. Apesar de os mecanismos desse composto polifenólico não terem sido completamente elucidados, observa-se que perturbações resultantes de interações com biomoléculas presentes na membrana bacteriana alteram sua permeabilidade, o que contribui para a entrada de agentes antimicrobianos, refletindo sua ação sinérgica com outros antibióticos (SAEEDEH KEYVANI-GHAMSARI; RAHIMI; KHORSANDI, 2023). KANG et al demonstraram a capacidade do AG em inibir a aderência entre células *Escherichia coli* (*E. coli*) por meio da hipótese da inibição de genes responsáveis pela síntese de componentes da parede celular (KANG et al., 2018). Além dos efeitos antimicrobianos intrínsecos do AG, a conjugação do composto fenólico com antibióticos tradicionais contra cepas bacterianas *E. coli* apresentou efeitos sinérgicos verificados pela redução dos valores da Concentração Inibitória Mínima (MIC) (HOSSAIN et al., 2020). Além disso, o AG pode ser antioxidante e anti-inflamatório. Estudos demonstram a capacidade do AG em reduzir fatores inflamatórios como TNF- α e IL-6 em resposta ao desequilíbrio oxidativo celular, que leva à oxidação de macromoléculas como lipídios de membrana. Além disso, o tratamento com AG foi capaz de aumentar a produção de enzimas antioxidantes, bem como reduzir a expressão genética do NF- κ B. (RADAN et al., 2019; SOHRABI et al., 2021).

Os conjugados peptídeo-droga (PDCs) representam uma estratégia promissora para potencializar a atividade biológica de moléculas, melhorar a distribuição de fármacos, reduzir sua citotoxicidade e aumentar a seletividade celular. Esses sistemas utilizam peptídeos como veículos específicos para direcionar fármacos a células-alvo. A escolha dos peptídeos, ligantes e locais de conjugação está relacionada à natureza do alvo a ser selecionado e ao ambiente químico em que se encontram, visando otimizar a eficácia terapêutica dos PDCs, garantindo melhor interação com os alvos desejados e minimizando efeitos adversos (FU et al., 2023; TAN; FU; MA, 2021).

O presente projeto tem como objetivo desenvolver e avaliar um PDC utilizando o Hs11 e o AG. Ambos possuem atividades antimicrobianas isoladamente, sugerindo potencial sinergia em seus conjugados. Serão determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) e a citotoxicidade do PDC, a fim para avaliar os efeitos da conjugação em comparação aos componentes individualmente.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o conjugado Hs11-AG em termos de atividade antimicrobiana e citotoxicidade em relação aos componentes separados.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar um PDC entre o polifenol ácido gálico e o IAP Hs11
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) do conjugado Hs11-AG em comparação às entidades individuais.
- Realizar ensaios de citotoxicidade em células de macrófagos murinos (bv) para verificar a toxicidade do conjugado.
- Verificar se o conjugado Hs11-AG exibe efeitos sinérgicos em termos de atividade antimicrobiana

3. Revisão biográfica

3.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

O uso de antibióticos tem sido crucial para salvar vidas. A capacidade de tratamento de doenças infecciosas por parte desses fármacos foi uma descoberta que levou ao seu uso em diversos setores da sociedade. No entanto, no atual cenário, a resistência das bactérias em função do abuso de antibióticos tem apresentado desafios à comunidade científica na busca por novas drogas que sejam eficientes e pouco tóxicas (Bassetti et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos integram parte do sistema imunológico inato dos organismos multicelulares contra uma gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas e vírus. Essa classe de peptídeos se distribui nos 6 reinos, desde bactérias e plantas até complexos sistemas imunológicos de animais, e são expressos para realizar um primeiro combate a microrganismos invasores e mediar as respostas inflamatórias dos hospedeiros. Estas moléculas apresentam as vantagens de possuir baixa toxicidade para células eucarióticas, uma alta estabilidade térmica, alta solubilidade e baixo peso molecular quando comparados à proteínas (LI et al., 2019). Sua atividade antimicrobiana decorre de interações com componentes intracelulares e da modulação da permeabilidade das membranas dos microrganismos, o que dificulta a aquisição de resistência por parte das bactérias. (WANG et al., 2019a).

Os AMPs compartilham entre si algumas propriedades físico-químicas que garantem sua ação antimicrobiana e seletividade, embora parcial, para células procarióticas em relação às eucarióticas. Eles são comumente catiônicos, ou seja, possuem uma carga líquida positiva. A carga positiva desses peptídeos é responsável pelas primeiras interações eletrostáticas com os componentes carregados negativamente das membranas bacterianas, como os LPSs presentes em bactérias Gram-negativas, ou os ácidos teicóicos ou teicurônicos encontrados nas membranas das bactérias Gram-positivas (MI et al., 2017). Um aumento na carga líquida total dos peptídeos promove uma melhor afinidade entre o AMP e a membrana bacteriana, resultando em uma ampliação de sua atividade antibacteriana (ZHOU et al., 2019). No entanto, o aumento de sua cationicidade pode também promover a atividade hemolítica. A hidrofobicidade, dentre as propriedades físico-químicas, desempenha o

papel de modulador na interação do peptídeo com a membrana bacteriana, sendo que valores baixos estão associados à perda da capacidade de romper a membrana celular. (J. Sun et al., 2014). A hidrofobicidade deve, assim como a carga, ser mantida dentro de limites, uma vez que um aumento excessivo nessa propriedade resulta em maior atividade hemolítica e perda de seletividade contra o agente patogênico alvo (WIEPRECHT et al., 1997). A anfifilicidade é um dos fatores mais relevantes para a atividade biológica dos AMPs catiônicos. Com a segregação de resíduos polares e hidrofóbicos em faces opostas da estrutura molecular, os AMPs se organizam diante de membranas fosfolipídicas, resultando em um vetor momento hidrofóbico significativo (EDWARDS et al., 2016). Na busca por melhorias nesse parâmetro, estudos demonstram que estruturas perfeitamente anfipáticas estão relacionadas ao aumento da atividade antimicrobiana, no entanto, a citotoxicidade para a célula do hospedeiro aumenta simultaneamente. Por outro lado, α -hélices com anfipatia imperfeita, resultantes da incorporação de resíduos hidrofóbicos em porções moleculares hidrofílicas, levaram a uma redução nos efeitos indesejados da atividade hemolítica (TAN; FU; MA, 2021).

Os AMPs são, frequentemente, desestruturados em solvente aquoso e subsequentemente a sua interação com a membrana, tendem a se organizar em um processo de minimização energética, fazendo com que essas moléculas apresentem estruturas secundárias variadas de acordo com sua composição e/ou suas interações intra e inter-residuais, onde há comumente 3 tipos de estruturas: α -hélice (Figura 1-A), fita- β (Figura 1-C), randômica (Figura 1-B), ou uma mistura delas (Figura 1-D).

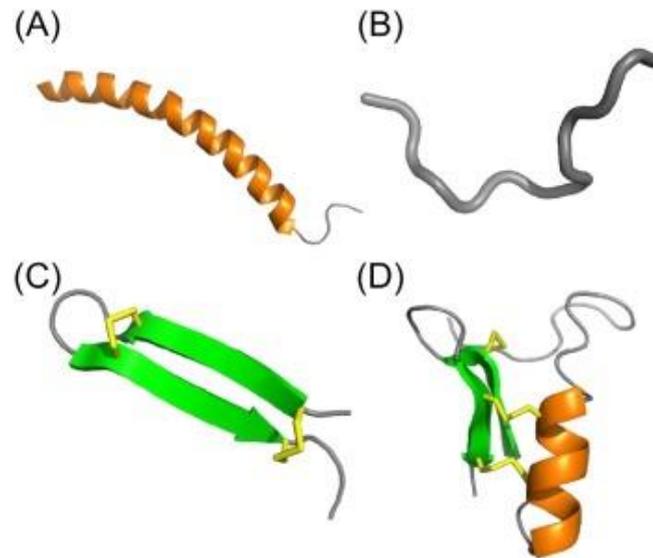


Figura 1 - Representação em cartoon das estruturas secundárias mais comuns em AMPs. (A) Conformação de α -hélice (representada na cor laranja), estrutura observada no AMP LL-37 ao estar em presença de micelas; (B) Conformação estendida, estrutura observada quando os AMPs não adotam conformação 3D definida, como a Indolicidina; (C) Conformação fita- β (representado na cor verde), normalmente favorecida pela presença de ligações de dissulfeto (representado na cor amarela), por exemplo, peptídeo da aranha gomesina derivado de um gancho-beta. (D) Conformação com junção das estruturas anteriores, por exemplo, o peptídeo de inseto CS $\alpha\beta$ defensina formicina que contém elementos de α -hélice e fita- β ; Imagem extraída de Koehbach & Craik, 2019.

A conformação dos peptídeos é definida, em sua maior parte, quando em contato com o patógeno, tal qual os peptídeos catiônicos anfifílicos que não apresentam estruturas definidas em soluções aquosas. As estruturas dos AMPs se relacionam a suas atividades e mecanismos de ação bactericida (Torres et al., 2019a).

Distribuídos entre insetos, peixes, anfíbios, mamíferos e plantas, os AMPs estruturados em α -hélice são os mais frequentes. Estes AMPs apresentam de 12 a 40 aminoácidos, e adotam estruturas helicoidais quando em contato com membranas ou solventes orgânicos que as mimetizam. Para além de estruturas alfa-helicoidais, os AMPs possuem também como estruturas secundárias as folhas- β que se estruturam em ambiente semelhantes aos AMPs de α -hélice. Resíduos de cisteína são encontrados nessa estrutura para formação de ligações dissulfeto, que proporcionam estabilização e atividade antimicrobiana (J. Wang et al., 2019b).

Folhas- β exibem características notáveis, destacando-se pela resistência significativa à hidrólise promovida por peptidases. A manutenção da integridade

estrutural dessas moléculas é alcançada por meio de ligações de hidrogênio, um elemento crucial que exerce impacto na conformação tridimensional e nas propriedades funcionais nos sistemas biológicos. A estabilidade de sua estrutura secundária é sustentada não apenas pelas ligações de hidrogênio, mas também por interações hidrofóbicas das cadeias laterais, em um mecanismo similarmente observado em peptídeos α -helicoidais.

3.2. Peptídeos curtos em folhas- β

O uso clínico de AMPs é limitado por fatores associados à sua seletividade, toxicidade sistêmica e custo de síntese. AMPs sintéticos curtos foram desenvolvidos com o intuito de otimizar sua seletividade e eficácia, ao mesmo tempo que minimizam a toxicidade sistêmica e custos de produção. Assim, acredita-se que peptídeos curtos sejam alternativas viáveis para o contorno de seus problemas inerentes (Zhong et al., 2017).

Ong et al. apresentaram uma estratégia de síntese para peptídeos curtos em folhas- β , com 8 a 12 resíduos de aminoácidos, com base em AMPs encontrados naturalmente. Para obtenção de sua estrutura anfifílica, propriedade necessária a ruptura da membrana de bactérias, resíduos de aminoácidos intercalados com características hidrofóbicas, representados por X (Val e Ile ou Phe ou Trp), e catiônicas representados por Y (Arg ou Lis), foram usados em busca da recorrência $(X1Y1X2Y2)_n-NH_2$, onde o número de repetições (n) variou entre 2 e 3. Esses peptídeos foram produzidos com o C-terminal amidado, uma vez que essa modificação fortalece o caráter catiônico da molécula, eliminando a carga negativa do carboxi-terminal. Isso resulta em um aumento da atividade antimicrobiana (ONG; GAO; YANG, 2013). Os peptídeos resultantes demonstraram atividade antimicrobiana de amplo espectro contra diferentes tipos de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como leveduras. Notavelmente, as sequências otimizadas exibiram alta seletividade e menor toxicidade in vivo em comparação com antibióticos clinicamente utilizados. Além disso, esses peptídeos mostraram eficácia na inibição do crescimento bacteriano em biofilmes e dispersão de biomassa. A capacidade de ligação e neutralização de endotoxinas, sem causar efeitos citotóxicos significativos nas concentrações necessárias para atividade

funcional, destaca a promissora aplicabilidade desses peptídeos em contextos clínicos (Ong et al., 2013).

3.3. Células procariotas

A parede celular é uma estrutura essencial encontrada em células procarióticas, desempenhando papéis fundamentais na manutenção da forma celular, proteção contra estresses osmóticos e interações com o ambiente externo (Nelson & Cox, 2017). Esses microrganismos são classificados quanto à composição de sua parede celular, sendo divididos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). As bactérias Gram-negativas possuem duas membranas, onde a membrana interna envolve seus componentes citoplasmáticos, e a membrana externa separa a célula de seu ambiente circundante. A composição da membrana externa dessas bactérias é constituída por uma bicamada, na qual a porção interna contém fosfolipídios e a externa apresenta, além de outras biomoléculas, um componente estrutural, um tipo de glicolípido, denominado lipopolissacarídeo (LPS) (ZHANG; MEREDITH; KAHNE, 2013). O LPS é um glicolípido grande composto por três domínios estruturais: o lipídio A, o oligossacarídeo do núcleo e o antígeno O, no qual desempenha funções estruturais para a manutenção da integridade das bactérias, atuando como uma barreira contra a entrada de moléculas pequenas e hidrofóbicas, o que confere resistência a compostos antimicrobianos.

Para garantir a estabilidade dessas estruturas, que contêm grupos fosfato com carga negativa, ocorre a formação de interações poliônicas com cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (HIROSHI, 2003). Além de exercer papel estrutural, os LPS desencadeiam respostas imunológicas por parte do hospedeiro induzindo citocinas inflamatórias em células imunocompetentes por meio do Receptor do tipo 4 (TLR4) (CAVAILLON, 2018). Uma resposta exacerbada dessa via pode levar o hospedeiro a sepse (Levin et al., 1970).

Por outro lado, as bactérias Gram-positivas não possuem uma camada lipídica externa além da membrana plasmática. Em vez disso, sua estrutura principal é composta predominantemente por peptideoglicanos. Além desses componentes, as bactérias Gram-positivas também podem apresentar ácidos teicóicos, polímeros de ribitol-fosfato ou glicerol-fosfato, que estão associados à parede celular e à membrana

plasmática(SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A figura 2 abaixo apresenta um esquema da estrutura de membrana de ambas as bactérias.

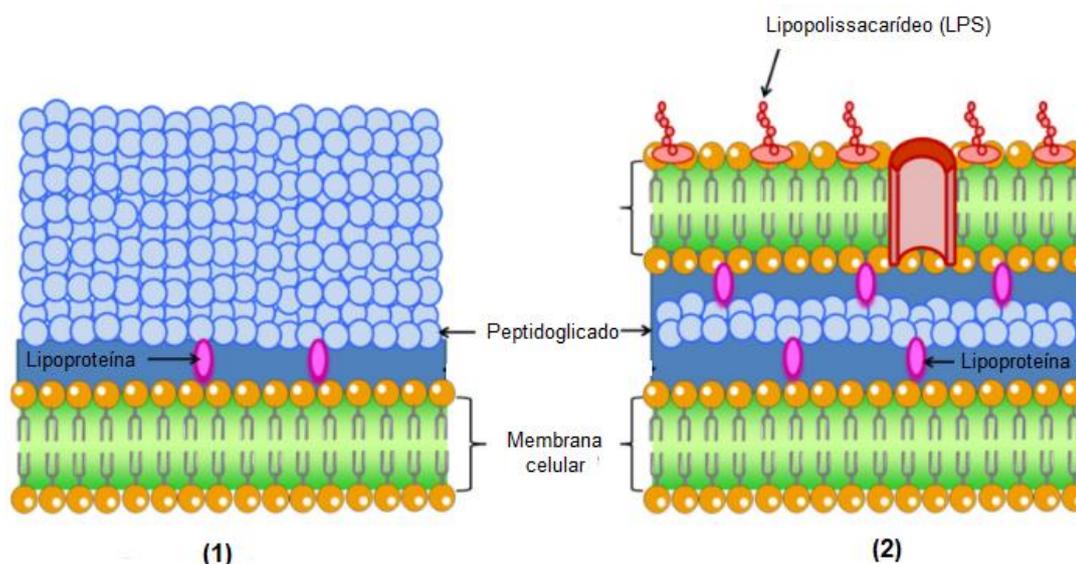


Figura 2- Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias (1) Gram-positivas e (2) Gram-negativas. Imagem retirada e adaptada de JIMÉNEZ-JIMÉNEZ; MORENO; VALLET-REGÍ, 2022

3.4. Peptídeos anti-inflamatórios

Os processos inflamatórios são mecanismos de defesa promovidos por danos celulares causados por fatores químicos ou físicos, bem como por patógenos que atuam como promotores de inflamação. Quando não tratada, uma resposta imunológica desregulada e prolongada leva à destruição de tecidos, o que, em caso de persistência, pode resultar em doenças crônicas no organismo (WEISS, 2008). A sepse está inserida em um tipo de inflamação prolongada, que pode ser causada por diferentes microrganismos, incluindo bactérias(LAKSHMIKANTH et al., 2016).

As bactérias do tipo Gram-negativa são conhecidas por promover inflamações crônicas. A detecção de endotoxinas em pacientes com septicemia causada por essas bactérias demonstrou a capacidade infecciosa desses organismos (Levin et al., 1970). A resposta imunológica a essas bactérias resulta da indução de citocinas pró-inflamatórias devido à presença de estruturas encontradas em sua camada externa, os LPSs (VENKATARANGANAYAKAABHILASHA; KEDIHITHLU MARATHE, 2021).

O processo inflamatório promovido por LPS é mediado pela liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina-6 (IL-6) e da interleucina-1 beta (IL-1 β), que desempenham um papel importante nos processos infecciosos mencionados (Wu et al., 2015). Os LPS, também conhecidos como endotoxinas, têm um papel essencial no processo inflamatório, pois são liberados em situações como morte celular, divisão celular e em resposta ao tratamento com antibióticos, frequentemente associado a infecções. Uma vez liberados, essas endotoxinas são identificadas pelos fagócitos mononucleares, que incluem monócitos e macrófagos e fazem parte do sistema imunológico do hospedeiro. O reconhecimento do LPS ocorre quando ele forma um complexo com uma proteína de ligação conhecida como LPB (LPS-binding protein). Essa formação do complexo acelera a ligação do LPS ao CD14, um receptor encontrado principalmente em fagócitos mononucleares. A interação entre essas duas entidades desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) como resultado da interação com o TLR-4 (Toll-like receptor). Tal fator de transcrição é vital na regulação da resposta imunológica (WRIGHT et al., 1990).

Os peptídeos antimicrobianos têm demonstrado atividade contra infecções devido à sua capacidade de suprimir citocinas em processos inflamatórios desencadeados por LPS, os quais induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (NAGAOKA et al., 2001; ROSENFELD; SHAI, 2006).

Yosef Rosenfeld e Yechiel Shai propuseram que as propriedades anti-endotoxina podem ser observadas tanto pela ligação direta dos peptídeos ao LPS, impedindo sua interação com o LBP, quanto pela ligação ao receptor CD14. (ROSENFELD; SHAI, 2006). A ligação entre o AMP e o LPS desempenha um papel crucial na atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. A carga líquida positiva e a hidrofobicidade são propriedades físico-químicas direcionadas à interação com o LPS da membrana fosfolipídica, desagregando sua estrutura e impedindo sua associação ao LBP. Uma vez inibida a formação do complexo LPS-LBP, a cascata inflamatória é suprimida (Y. Sun & Shang, 2015).

O LPS participa na formação de fatores pro-inflamatórios por meio do NF- κ B, que é uma proteína que atua como um fator de transcrição responsável pela produção de sinais inflamatórios em resposta a agentes patogênicos. Ele é composto por um grupo de cinco estruturas conhecidas como RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (e sua precursora p105) e p52 (e sua precursora p100). Esses grupos podem se associar

uns aos outros na forma homodimérica ou heterodimérica. A clássica forma encontrada de NF- κ B consiste em um heterodímero das subunidades p65/RelA e p50(BALDWIN JR., 2001).

Quando o NF- κ B não está estimulado, encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória chamada I κ B. No entanto, na ausência dessa ligação, o I κ B é fosforilado e degradado, o que resulta na translocação do NF- κ B para o núcleo, onde se liga a genes-alvo, que estão envolvidos na produção de mediadores em processos inflamatórios e oxidativos(GLEZER et al., 2000). A subunidade p50 do heterodímero p50-p65 foi relatada por seu papel no reconhecimento da sequência de DNA, onde se encontram os genes alvos que serão expressos (HISCOTT; KWON; GÉNIN, 2001).

Dada a importância da ativação da NF- κ B pelo seu reconhecimento e ligação aos elementos de κ B, com sua estrutura dimerizada p-50-p65 como forma prevalente, um peptídeo chamado AIP-6 (do inglês, *anti-inflammatory peptide 6*) foi avaliado na supressão da via inflamatória NF- κ B. A atividade anti-inflamatória desse peptídeo foi relatada pela sua inibição na formação da ligação entre a porção p65 e os elementos de κ B. O peptídeo demonstrou uma inibição seletiva na transcrição mediada por NF- κ B ao se ligar à subunidade p65, prejudicando consequentemente a ligação entre NF- κ B e a sequência de DNA responsável pela transcrição de genes inflamatórios (WANG et al., 2011). Os diferentes mecanismos mostrados ao longo da sessão podem ser observados esquematicamente na figura 3:

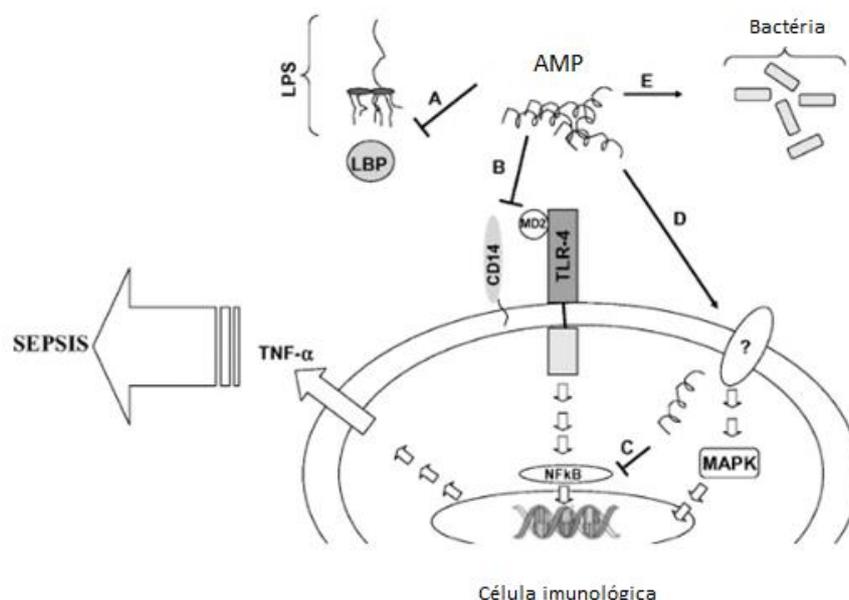


Figura 3 - Principais estágios na indução de sepse por bactérias e os pontos potenciais nos quais peptídeos catiônicos podem intervir. A administração de antibióticos pode desencadear a liberação de endotoxinas (LPS), que posteriormente se ligam à proteína ligadora de LPS (LBP) circulante no sangue. Esse complexo é então transferido para o receptor CD14 localizado na superfície das células imunes, iniciando cascatas de sinalização intracelular que levam à produção de citocinas inflamatórias. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) contrapõem esse processo por meio de vários mecanismos: (A) ligando-se diretamente ao LPS, impedindo sua interação com a LBP; (B) competindo com o LPS pela ligação ao complexo de sinalização TLR; (C) inibindo a translocação do NF- κ B para o núcleo; (D) modulando a expressão de genes inflamatórios por meio da ativação direta das vias MAPK; e (E) eliminando diretamente micróbios, seja por meio da desestruturação de suas membranas ou pela interação com moléculas internas(ADAPTADA)(ROSENFELD; SHAI, 2006).

3.5. Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos

A busca por peptídeos com atividades biológicas desejáveis dentro de sequências de proteínas tem sido uma estratégia para a prospecção de biomoléculas no combate contra microrganismos causadoras de infecções (Ramada et al., 2017). Essas sequências, quando sintetizadas como cadeias polipeptídicas individuais, apresentam atividade antimicrobiana, diferentemente de suas proteínas de origem, e são chamadas de peptídeos intragênicos antimicrobianos pelo nosso grupo. A presença desses IAPs dentro de sequências de proteínas foi avaliada usando o software Kamal, no qual, para sua identificação, os critérios físico-químicos comumente encontrados em AMPs, como estrutura secundária, carga líquida positiva e hidrofobicidade, foram considerados. (BRAND et al., 2012)

Um estudo conduzido por Brand et al. buscou, por meio do software Kamal, Hs IAPs com propriedades anfífilas e estruturas α -helicoidais no proteoma humano. As proteínas foram examinadas na busca de possíveis IAPs, que possuem entre 16 e 22 resíduos de aminoácidos e exibem uma repetição característica típica de segmentos anfífilos em forma de α -hélice. Para isso, foram considerados três ângulos polares possíveis: 192°, 160° e 128°. Foram estabelecidas diretrizes específicas para determinar quais aminoácidos poderiam compor as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dessas sequências, utilizando como referência uma escala de hidrofobicidade. Na porção hidrofóbica, foram permitidos aminoácidos como Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val e Trp, enquanto a porção hidrofílica tinha critérios menos restritivos, admitindo aminoácidos como Ala, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr e Tyr.

Sequências contendo Pro ou Cys foram excluídas. A escolha dos peptídeos teve por base critérios físico-químicos, como a presença de resíduos com hidrofobicidade média específica, uma carga líquida dentro de um intervalo de +2 a +6 e uma propensão à agregação de acordo com critérios predefinidos (BRAND et al., 2019).

Por meio de experimentos, esses peptídeos demonstraram a capacidade de estruturar em α -hélices em modelos miméticos da bicama lipídica de bactérias, apresentando-se desestruturados em tampão fosfato, tal qual AMPs normalmente são. O Hs02 (Figura 4), um IAP identificado como parte da proteína miosina humana não-convencional-1h, destacou-se em sua atividade biológica. Este peptídeo apresentou atividade antibacteriana direta, causando a ruptura da membrana citoplasmática de bactérias em concentrações micromolares baixas, sendo comparável aos AMPs mais potentes conhecidos. Efeitos positivos no retardamento da proliferação e na diminuição da viabilidade de biofilmes formados por dois patógenos, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, também foram relatados. O Hs02 também inibiu a produção de TNF- α em macrófagos de ratos estimulados por LPS em concentrações mais baixas que aquelas necessárias à manifestação de sua atividade antimicrobiana, indicando que essa molécula é ainda um potente peptídeo anti-inflamatório (BRAND et al., 2019).

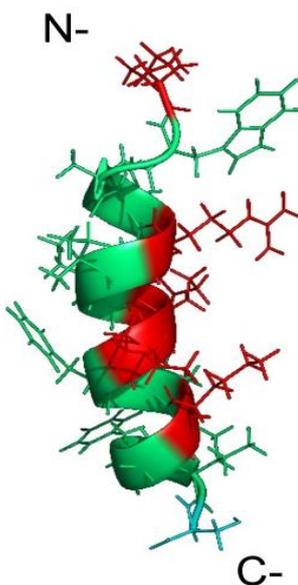


Figura 4 – Representação da estrutura do peptídeo Hs02 em alfa-hélice a partir da interação com micelas de DPC-d38. Onde é demonstrado em vermelho resíduos de carga positiva e em verde os resíduos hidrofóbicos (Guilherme D. Brand et al., 2019).

Outra estrutura secundária comum em segmentos de proteínas são as folhas- β . Essa configuração resulta da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e C=O na cadeia polipeptídica, sem envolver as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. As folhas- β podem adotar duas formas, uma com a cadeia polipeptídica orientada na mesma direção paralelamente (Figura 5-B) ou, de forma oposta, com orientação antiparalela (Figura 5-A) entre suas cadeias (ALBERTS et al., 2002). A presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos intercalados nesses segmentos são responsáveis pela natureza anfifílica dessa estrutura, uma vez que ocorre a separação entre as faces hidrofóbicas e hidrofílicas. Estruturações desse tipo são ideais para atividades antimicrobianas, como resultado de interações com membranas bacterianas.

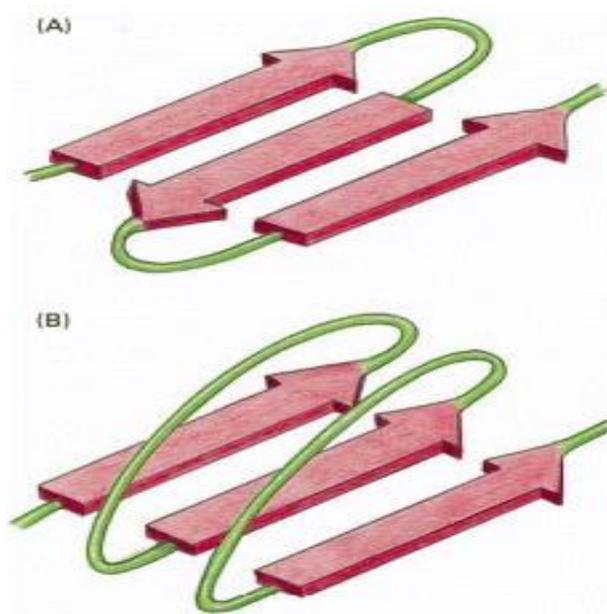


Figura 5- Dois tipos de folhas- β . (A) Estrutura antiparalela de folha- β (B) Estrutura paralela de folha- β (Alberts et al., 2002).

A atividade antimicrobiana depende fortemente da anfifilicidade das moléculas. A anfifilicidade não é observada somente em estruturas helicoidais, mas também em folhas- β (SANTOS et al., 2023). A busca por IAPs curtos derivados de fitas- β em segmentos internos de proteínas emerge como uma opção promissora para explorar moléculas capazes de controlar microrganismos invasores. Utilizando o software Kamal, a análise dos segmentos internos de proteínas foi conduzida considerando

resíduos de aminoácidos alternados entre hidrofóbicos e hidrofílicos, com extensão de 7 a 11 resíduos de aminoácidos. Além disso, apenas peptídeos com carga líquida $\geq +2$ foram selecionados (SANTOS et al., 2023).

Cinco Hs IAPs curtos em folha- β foram sintetizados e revelam descobertas notáveis, destacando que três deles demonstraram potente atividade antimicrobiana. O peptídeo Hs10, em particular, exibiu seletividade para bactérias Gram-negativas. Esse peptídeo mostrou-se promissor não apenas pela sua eficácia antimicrobiana, mas também pela baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Além disso, sua capacidade de perturbar a estrutura da membrana de *E. coli* ressalta seu potencial como um agente antimicrobiano seletivo. Esses resultados abrem caminho para futuras aplicações de peptídeos curtos estruturados em folhas- β (SANTOS et al., 2023).

Os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14, todos curtos e com perfil alternado de resíduos hidrofóbicos/hidrofílicos, foram testados como antimicrobianos em cepas de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella Pneumonia*) e Gram-positiva (*S. aureus*). Os peptídeos Hs11 e Hs12 demonstraram eficácia antibacteriana ao inibir todas as cepas testadas na faixa de concentração de 8 a 128 μM (SANTOS et al., 2023).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em μM , para bactérias patogênicas humanas (SANTOS et al., 2023)

Peptídeos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Hs10	N/A	32 \pm 0 / 32 \pm 0	64 \pm 0 / 64 \pm 0	43 \pm 18/ 53 \pm 18
Hs11	16 \pm 0 / >32	16 \pm 0 / >32	128 \pm 0 / > 128	8 \pm 0 / >16
Hs12	16 \pm 0 / 32 \pm 0	16 \pm 0 / >32	64 \pm 0 / > 128	8 \pm 0 / >16
Hs13	N/A	N/A	N/A	N/A
Hs14	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A significa que não apresentou atividade dentro da concentração testada

Já em ensaio de viabilidade de macrófagos murinos tratados com peptídeos, nenhuma das moléculas testadas afetou a viabilidade celular em 24 horas até a máxima concentração testada, de 100 μM . O peptídeo Hs11, apesar de sua eficácia como antimicrobiano, não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, sendo particularmente interessante pela baixa citotoxicidade em comparação com seus valores de MIC para *P. aeruginosa* (8 μM) e *S. aureus* (16 μM). Macrófagos de

murinos também foram expostos ao LPS, onde o peptídeo Hs11 reduziu a secreção de TNF- α , previamente incubado com LPS, para os níveis normais. Além disso, ocorreu a redução da liberação de citocinas mesmo em seu nível basal, em células não estimuladas por LPS, indicando ação anti-inflamatória mesmo sem indução de inflamação (SANTOS et al., 2023).

3.6. Ácido Gálico

Compostos antioxidantes são encontrados em uma variedade de plantas na natureza, fazendo parte da dieta humana. Um exemplo dessas substâncias são os polifenóis (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005). Os polifenóis representam uma classe importante de antioxidantes naturais que exibem uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antiúlcera e antiolesterol, entre outras. Dentre esses polifenóis, AG, também conhecido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, é um composto fenólico de baixo peso molecular encontrado em uma variedade de fontes, incluindo bebidas, nozes, repolho, folhas de chá, morangos, frutas vermelhas, chá verde e várias ervas medicinais (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

A estrutura 2D em modelo graveto do AG (Figura 6) é composta por um grupo carboxila ocupando a posição 1 e os grupos hidroxila ocupando as posições 3, 4 e 5, nos quais essas substituições estão associadas às suas propriedades antioxidantes e anti-radicalares. No entanto, essa natureza não é influenciada pelo ligante carboxilato (SROKA; CISOWSKI, 2003).

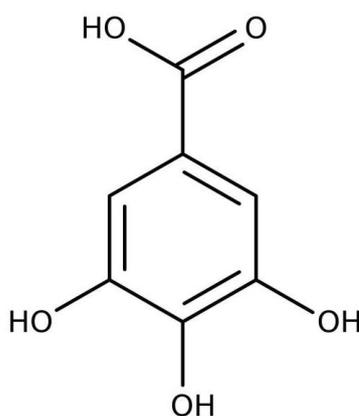


Figura 6 – Estrutura em 2D do ácido gálico.

O tratamento com ácido gálico foi avaliado em processos inflamatórios e em condições de estresse oxidativo. Um estudo foi conduzido para avaliar esses processos em ratos, que foram induzidos a doenças cardiovasculares causadas por partículas em suspensão no ar e, como resultado, apresentaram lesões no miocárdio. Este estudo demonstrou a capacidade do ácido gálico de restaurar os níveis de fatores inflamatórios, como IL-6 e TNF- α , aos valores normais. Dentro da atividade oxidativa o tratamento com AG causou um aumento evidente nos níveis e na síntese de enzimas antioxidantes, como GPx, GSH, CAT e SOD. A atividade em questão sugere a neutralização de espécies reativas de oxigênio geradas pelas lesões no miocárdio (RADAN et al., 2019).

O AG também possui propriedades protetoras contra o enfisema induzido em ratos. Este efeito parece ser atribuído à capacidade do ácido gálico de reduzir a inflamação pulmonar, preservar o tecido pulmonar e agir como antioxidante. A análise genética indica uma influência do ácido gálico na expressão de genes associados à inflamação, em decorrência da redução na expressão do gene NF-Kb (SOHRABI et al., 2021)

A mitocôndria é responsável pela produção de ATP na célula por meio de um fluxo de elétrons entre os complexos proteicos, gerando uma força prótomotriz entre membranas, onde o último aceptor de elétrons nessa cadeia respiratória é o oxigênio, O_2 . A formação de $O_2^{\cdot-}$ a partir da redução de um elétron de O_2 é uma das diversas reações que envolvem a produção de ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) dentro da mitocôndria. Esse superóxido também funciona como um precursor na formação de peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , pela ação da enzima superóxido dismutase (MURPHY, 2008). As moléculas são as chamadas espécies reativas de oxigênio, dentre as quais o radical hidroxila ($HO\cdot$) e oxigênio singlete (1O_2) fazem parte. Há também radicais livres biologicamente importantes como: hidroperóxido lipídico (ROOH), radical peroxila lipídico (ROO \cdot) e radical alcóxila lipídico (RO \cdot), que estão associados aos lipídios da membrana (KURUTAS, 2016).

Quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante celular endógena, ocorre o estabelecimento do estresse oxidativo. Esse cenário está associado à disfunção mitocondrial, a qual desempenha um papel crucial na origem

de diversas condições, tais como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos como obesidade, resistência à insulina e diabetes (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). Para o controle oxidativo celular em resposta a produção de ROS, a célula responde ao estresse oxidativo por meio da produção de enzimas antioxidantes, que são produzidas pela regulação de fatores de transcrição na determinação da expressão gênica. ARE (do inglês, *Antioxidant Response Element*) é a região promotora da expressão de enzimas responsáveis para o equilíbrio redox da célula tais como a hemo-oxigenase-1, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase e NAD(P)H quinona oxidoreductase (Jayasuriya & Ramkumar, 2021). Outra fonte de ROS é a via NF-κB, que desencadeia um aumento na atividade mitocondrial e na expressão da NADPH oxidase, as quais são as principais fontes de radicais livres endógenos. O NF-κB está associado ao fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que, em situações de estresse oxidativo, não ativa a via de produção de fatores antioxidantes. Portanto, a redução do Nrf2 leva a vias inflamatórias (WARDYN; PONSFORD; SANDERSON, 2015). A mitocôndria é a organela citoplasmática central no desenvolvimento de radicais livres. O oxigênio molecular, como último aceptor da cadeia respiratória mitocondrial, é em sua maior parte reduzido a água; no entanto, uma fração é reduzida parcialmente nesse processo, assim como em outros processos fisiológicos. Esses oxigênios parcialmente reduzidos, como já mencionado, são espécies reativas de oxigênio envolvidas em processos de estresse oxidativo celular. As espécies produzidas nesses processos, tais como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , são insuficientemente reativas para oxidar macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios de membrana. No entanto, uma vez na presença de ferro (Figura 7), esse metal de transição participa na catálise para a produção de radicais hidroxilas pela reação abaixo (GALARIS; BARBOUTI; PANTOPOULOS, 2019; KURUTAS, 2016):

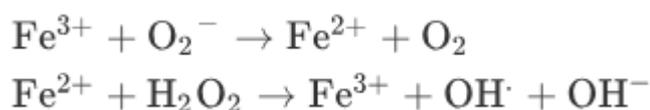


Figura 7 - Reação entre íons ferro e espécies reativas de oxigênio

Na proporção em que o ácido gálico está em excesso em relação ao Fe^{3+} , ocorre a neutralização de radicais livres, enquanto, quando essa proporção é inferior

a 2, observa-se a liberação de radicais livres. Devido à sua estrutura, o ácido gálico possui a propriedade de quelar o Fe^{3+} , minimizando assim as reações mencionadas anteriormente (KOSURU et al., 2018).

O AG é conhecido também por sua capacidade imunomoduladora. Em células infectadas pelo parasita do gênero *Leishmania*, o ácido gálico foi capaz de aumentar a atividade lisossômica em macrófagos em concentrações baixas, no valor de 15 $\mu\text{g/mL}$. A produção de óxido nítrico é uma via responsável pela resposta à infecção pelo parasita, sendo ativada pela ação sinérgica de citocinas. O AG demonstrou a capacidade de induzir um aumento na concentração de NO em macrófagos infectados, resultando em um eficiente mecanismo de defesa contra a *Leishmania*. Outro fator destacado no estudo foi um aumento significativo nos níveis de cálcio intracelular, desempenhando um papel como agente antimicrobiano e mediador da produção da proteína quinase C (PKC) (ALVES et al., 2017)

Os mecanismos de ação antibacteriana do AG são variáveis. A composição das células bacterianas, assim como as propriedades físico-químicas do ambiente em que se encontram, são fatores determinantes para seu modo de ação (SAEEDEH KEYVANI-GHAMSARI; RAHIMI; KHORSANDI, 2023). Borges et al. demonstraram a capacidade do AG em alterar a hidrofobicidade da membrana de bactérias Gram-negativas resultando em maior permeabilidade a substâncias antibacterianas hidrofóbicas, que normalmente são excluídas devido aos canais hidrofílicos encontrados na membrana externa das células procarióticas (Borges et al., 2013). Devido à sua parcial lipofilicidade, acredita-se que ácidos fenólicos exerçam seu efeito antimicrobiano por difusão passiva em sua forma ácida através da camada lipídica bacteriana, resultando na acidificação do ambiente intracelular e desnaturação de proteínas (CAMPOS et al., 2009). KANG et al observaram os efeitos do AG na síntese de biofilmes por *E. coli* dada a capacidade do ácido gálico de afetar a permeabilidade da membrana bacteriana (KANG et al., 2018). Em concentrações de 0,25 mg/mL, apesar do AG não conter o crescimento populacional bacteriano, foi capaz de regular a síntese de biomoléculas que promovem a aderência entre células *E. coli* (KANG et al., 2018). O AG para além de sua atividade antibacteriana inerente também apresentou por meio de sua conjugação com antibióticos tradicionais efeito sinérgico observado por meio da redução de valores MIC, evidenciando a potencialização dos efeitos antimicrobianos e a redução da resistência a antibióticos por células

bacterianas patogênicas (SAEEDAH KEYVANI-GHAMSARI; RAHIMI; KHORSANDI, 2023).

3.7. Conjugados Peptídeo-Droga

Em busca da melhoria da distribuição, redução da citotoxicidade e aumento da seletividade de fármacos, os conjugados peptídeo-droga apresentam-se como um sistema emergente no transporte de fármacos para células-alvo. Os PDCs demonstram a capacidade de reconhecer células específicas, e, com essa especificidade, a dose administrada pode ser reduzida. No caso de células cancerosas, por exemplo, a diferenciação entre células saudáveis ocorre devido à presença de diferentes enzimas, pH e equilíbrio redox (ZHU; TANG; LV, 2021).

PDCs são constituídos por três componentes (Figura 8): peptídeo, linkers e droga citotóxica. Até hoje, os PDCs são mais estudados no contexto do câncer, onde fármacos citotóxicos são conjugados a peptídeos visando o aumento de seletividade. Contudo, alguns trabalhos demonstram que o mesmo racional é também facilmente aplicável a novos antibióticos, tal foi demonstrado em resultados obtidos demonstrando a viabilidade dessa estratégia ao evidenciar a melhora significativa na atividade antimicrobiana contra cepas resistentes à ampicilina, sem induzir citotoxicidade em células humanas (YAMAUCHI et al., 2022). Destaca-se a importância de considerar fatores como a escolha do peptídeo, do ligante e do local de conjugação para otimizar a eficácia antibacteriana. Adicionalmente, observou-se que a modificação estratégica na estrutura do peptídeo e a introdução de um ligante suscetível à hidrólise no interior das células bacterianas contribuem para uma interação mais eficaz com os alvos, reforçando a utilidade dessa abordagem (FU et al., 2023; YAMAUCHI et al., 2022).

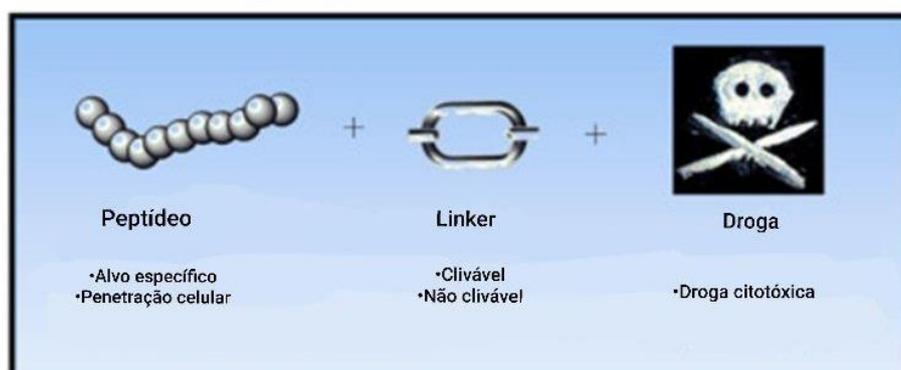


Figura 8- Modelo para criação de conjugado peptídeo-droga (ADAPTADA) (FU et al., 2023)

A escolha do peptídeo deve ser feita para assegurar uma melhor distribuição da droga conjugada a ele. Critérios como especificidade para células-alvo, baixa resposta imunológica, alta estabilidade e redução de sua degradação em meio celular são fatores determinantes na ação terapêutica (FU et al., 2023).

Peptídeos em PDC possuem normalmente baixa massa molecular, o que reduz a resposta imune do hospedeiro. Atuando como carreadores do fármaco no sistema devido à sua menor complexidade em comparação com as proteínas, os peptídeos apresentam vantagens sobre os conjugados droga-proteína. Isso ocorre tanto pela melhor estabilidade proporcionada pela sua menor complexidade estrutural em comparação com as estruturas quaternárias e terciárias de proteínas. A síntese do peptídeo é outro componente que atrai a atenção para os PDCs, devido à rapidez da síntese em fase sólida. Os peptídeos podem agir tanto conjugados diretamente à célula quanto por meio de um linker, cujo design é determinado pelo alvo biológico a ser atingido (ULAPANE et al., 2017). A síntese racional de carreadores é crucial, uma vez que seus resíduos de aminoácidos podem ser modificados para otimizar a seletividade em relação ao alvo biológico e às propriedades físico-químicas. Os mecanismos de ação desses peptídeos podem ser divididos com base em sua interação com a membrana do alvo biológico. Os peptídeos direcionadores de células (CTPs) são cadeias curtas de aminoácidos que exploram a superexpressão de receptores específicos na superfície de células cancerosas para realizar a entrega precisa de medicamentos. Dependendo do receptor-alvo, os CTPs podem levar a um acúmulo localizado de medicamentos ao redor do tumor ou induzir a endocitose após a ligação.

Os CTPs compartilham semelhanças com anticorpos monoclonais (mAbs) em sua ligação de alta afinidade a receptores específicos, mas seu tamanho menor permite uma melhor penetração nos tumores. Uma limitação dos CTPs está na dependência da expressão de receptores específicos para que sejam eficazes. Técnicas como o *phage display*, podem ser empregadas para identificar sequências de peptídeos que se ligam seletivamente a células cancerosas, superando essa limitação (Bolhassani, 2011).

O linker é responsável pela ligação entre o peptídeo e a droga citotóxica. Sua escolha é fundamentada no mecanismo que se busca com essa conexão, ou seja, pode ou não ser clivado quando em contato com o alvo biológico. Busca-se também a estabilidade durante a passagem por diferentes ambientes durante a circulação, prevenindo a liberação da droga fora da célula de interesse, o que preveniria a propriedade de interesse para a minimização do efeito citotóxicos (FU et al., 2023). Geralmente, os peptídeos transportadores são conectados aos fármacos por ligações não cliváveis, consistindo em ligações de amida ou éster, que são resistentes à clivagem extracelular. Como resultado, a droga permanece em seu estado ativo com o linker parcialmente ou integralmente ligado. Por outro lado, linkers sensíveis a enzimas têm ligações, como ésteres, que podem ser clivadas por enzimas, como esterases, levando à liberação da droga. Além disso, existem linkers que são clivados pelo ambiente intracelular, mais oxidante que o meio extracelular. Por exemplo, a glutathione, encontrada em maiores concentrações no interior das células cancerosas devido às condições de hipóxia locais, torna esses linkers suscetíveis à clivagem nesse meio devido às ligações de dissulfeto (Heh et al., 2023).

4. Metodologia

4.1. Síntese de peptídeo em fase sólida

O método usado para a obtenção do IAP Hs11 foi a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS, do inglês *solid phase peptide synthesis*). A síntese química em questão foi desenvolvida por Robert Bruce Merrifield, que simplificou o processo, uma vez que todas as reações ocorrem em um único ambiente químico, e a ausência de manipulações em fase líquida evita perdas por transferência de materiais (MERRIFIELD, 1985).

A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida segue um processo composto por características principais que incluem a fixação do primeiro bloco de construção a uma fase sólida, a resina de Rink (Figura 9) seguido da realização de ciclos repetidos de transformações químicas. Um resíduo de aminoácido com a função amina protegida é acoplado a um suporte sólido pelo resíduo de aminoácido C-terminal. Em seguida, o grupo amina pode ser desprotegido para o acoplamento dos próximos resíduos de aminoácidos, que possuem proteção em suas cadeias laterais, no sentido C-terminal a N-terminal. (JENSEN, 2013).

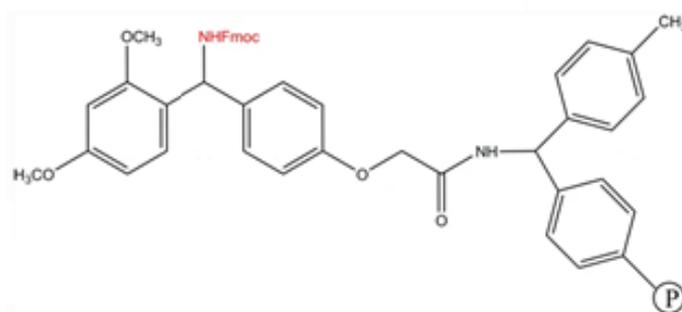


Figura 9- Estrutura da resina Rink Amide (MDHA). Em vermelho está o grupo amino protegido pelo Fmoc e o P representa a cadeia polimérica atrelada a resina (PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014).

Para a síntese de um peptídeo amidado, utilizou-se a resina Rink Amide (MBHA), que possui um grupo de proteção temporário Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) no N-terminal. Inicialmente, foram adicionados 0,15 mmol dessa resina (com grau de substituição de 0,45 mmol/g) a uma seringa de plástico, que foi impermeabilizada com um êmbolo na extremidade para evitar a passagem do

suporte sólido. A resina foi submersa em diclorometano (DCM) por 30 minutos para garantir o inchaço. Em seguida, os grupos protetores Fmoc foram removidos usando uma solução de 20% de 4-metilpiperidina em N,N-dimetilformamida (DMF), através de dois ciclos de 15 minutos cada, com agitação. A desproteção do N-terminal da resina por 4-metilpiperidina, promove a remoção do hidrogênio ácido do grupo Fmoc, resultando em uma estrutura aromática estável devido à ressonância. Após essa etapa, ocorre uma eliminação- β com liberação de dióxido de carbono, o que deixa a amina livre para o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido. (PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014).

Após este período, o conteúdo foi filtrado e lavado com três repetições de aproximadamente 2 mL de DMF e 2 mL de DCM. Em seguida foi realizado um teste de Kaiser para confirmar a desproteção. Para a verificação da desproteção da amina, realiza-se o teste de Kaiser, ou teste de ninidrina. A ninidrina realiza uma sequência de reações com aminas primárias, resultando, ao final, na formação de um composto de coloração azul escuro denominado "azul de Ruhemann". Este procedimento pode ser utilizado para verificar o sucesso da remoção do grupo protetor Fmoc, liberando assim uma amina primária (PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014).

Para realizar o teste, conforme descrito no método de Chan e White (2000), é necessário obter alguns grãos da resina sólida em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionam-se duas gotas de cada uma das seguintes soluções: ninidrina a 5% (m/v) em etanol, fenol a 80% em etanol e uma solução preparada com 2 mL de KCN (1mmol) em 98 mL de piperidina. Após as adições, o conteúdo do tubo de ensaio deve ser misturado e aquecido a 120°C por um período de 4 a 6 minutos. A presença da coloração azul escura indica a presença de aminas livres.

Com sólido constituído por resina devidamente desprotegido, o aminoácido foi acoplado seguindo a rota de DIC/Oxyma, que consistiu em adicionar 4 equivalentes (0,6 mmol) da quantidade de resina utilizada do aminoácido com o N-terminal protegido. Em seguida, foram acrescentados 4 equivalentes de acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (oxyma Pure) (85,3mg), 2 mL de DMF e 93 μ L de N,N'-diisopropilcarbodiimina (DIC) (que também correspondem a 4 equivalentes da quantidade de resina). Depois, esta suspensão foi colocada sob agitação a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos. Ao fim desse tempo, foi feita a lavagem, três vezes, do sólido

com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL DCM. Para a confirmação do acoplamento, foi também feito o teste de Kaiser de uma pequena alíquota do material.

4.1.1. Acoplamento do ácido gálico

Após a obtenção do Hs11 ainda acoplado à resina, mas anterior ao acoplamento do ácido gálico, foi feita a desproteção do último resíduo de aminoácido do peptídeo por 4-metil-piperidina. Em seguida, adicionou-se 0,1021 gramas (4 equivalentes da quantidade de resina) de ácido gálico, que teve sua porção ácida ligada ao N-terminal do resíduo de aminoácido. Em seguida, foram acrescentados 4 equivalentes de oxyma Pure (85,3mg), 2 mL de DMF e 93 µL de DIC. Depois, esta suspensão foi colocada sob agitação a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos. Ao fim desse tempo, realizou-se a lavagem, três vezes, do sólido com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL DCM. Para a confirmação do acoplamento, o teste de Kaiser foi novamente realizado para verificação da conclusão do processo.

4.1.2. Clivagem

Após acoplar o GA, foi necessário realizar o processo de clivagem para retirar o conjugado preso na resina. Em seguida, preparou-se o 'coquetel' de clivagem, composto por ácido trifluoroacético (TFA)/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:5:2,5 (v/v) (Chan W. C., et al 2000). Adicionou-se o sólido seco dentro do coquetel com a posterior agitação que teve duração de 1 hora e 30 minutos a 200 rpm. Após o tempo determinado, o TFA foi removido com o auxílio de um fluxo de argônio. Ao retirar o TFA, foi utilizado éter diisopropílico gelado para precipitar o peptídeo-GA e a resina, com posterior filtração e descarte da fase etérea, já que o peptídeo e a resina ficam retidos no filtro. Em seguida, o peptídeo-GA foi solubilizado com uma mistura de metanol/água ou acetonitrila/água 1:1 (v/v), ficando retido no filtro apenas a resina. Posteriormente, o Hs11-AG solubilizado foi liofilizado na UCB. A figura 10 abaixo apresenta um fluxograma das etapas apresentadas:

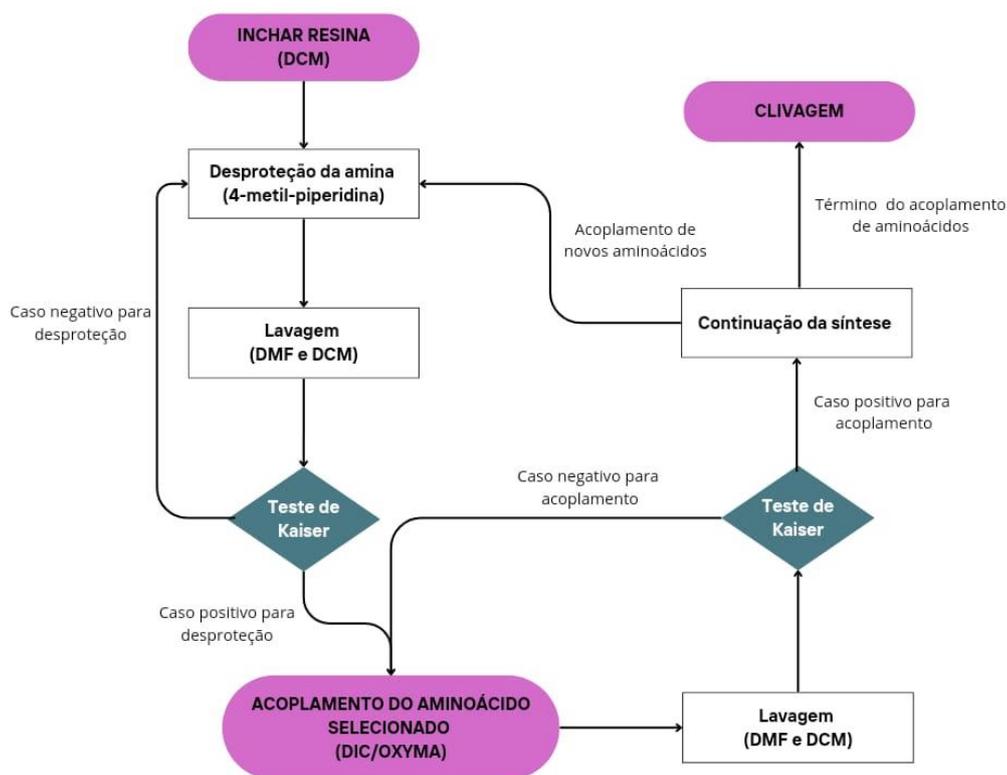


Figura 10- Fluxograma panorâmico da síntese de peptídeos em fase sólida

4.2. Purificação do conjugado por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a remoção de produtos indesejáveis e impurezas no processo de síntese, o conjugado peptídeo-GA foi submetido à purificação por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) no Laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina da UnB. O processo de purificação foi conduzido em um cromatógrafo Shimadzu (Japão), equipado com um sistema binário de bombeamento (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. A coluna empregada foi uma coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å) da Phenomenex. A fase móvel consistiu em acetonitrila (ACN) + 0,1% de TFA/água + 0,1% de TFA, a uma taxa de 10 mL/min. O gradiente utilizado teve o perfil a seguir:

- 0-5min: 5% de ACN+TFA;
- 5-40min: 5%-100% de ACN+TFA;
- 40-45min:100% de ACN+TFA;
- 45-46min:100%-5% de ACN+TFA;

- 46-55min:5% de ACN+TFA;

A solução que conteve 20 mg/mL do peptídeo sintetizado liofilizado solubilizado em água foi manualmente injetada no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a detecção, os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm foram monitorados, correspondendo à absorção da ligação peptídica e à absorção das cadeias laterais de moléculas aromáticas, respectivamente. Durante a análise contínua do cromatograma, foram manualmente coletadas frações contendo o conjugado puro. Essas frações foram subsequentemente liofilizadas na UCB.

4.3. Análise do conjugado peptídeo-GA por espectrometria de massa

Para a confirmação da estrutura do peptídeo sintetizado, o produto da purificação por CLAE já liofilizado teve sua submissão à análise por espectrometria de massas, em que foi analisado o produto com relação a sua massa/carga.

4.3.1. Análise de MS e MS/MS

Cerca de 1mg do conjugado sintetizado foi solubilizado em 500 μ L de água ultrapura. Em seguida, 3 μ L desta solução foi retirada e solubilizada em 997 μ L de água e ácido fórmico. Esta amostra solubilizada foi analisada em um espectrômetro de massa de alta resolução presente no instituto de química da Universidade de Brasília. Este espectrômetro de massas era do modelo Triple ToF 5600+ (Sciex, Ontario, Canadá) que estava acoplado a um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) que tinha a função de injetar a amostra em uma vazão de 0.3mL/min. A fonte de ionização era do tipo electrospray (Esl, do inglês *Electron Spray Ionization*) e os espectros de massa foram adquiridos em modo positivo com valores de massa entre 100 e 2000 Da, juntamente à utilização de uma calibração externa. Os parâmetros de aquisição foram: TEM 450 (Temperatura da fonte), GS1 45 (Gás de nebulização), CUR 25 (Gás de cortina, contracorrente), GS2 50 (Gás de dessolvatação), ISVF 5500 (voltagem aplicada a probe) e DP 140 (potencial de declusterização de íons). Os produtos de íons escaneados foram adquiridos com CE

45 e CES 20, parâmetros relacionados à extensão de fragmentação do precursor. Por fim, os dados obtidos foram analisados com a utilização do software PeakView v2.1.

4.4. Quantificação do conjugado Hs11-AG

A quantificação dos peptídeos sintetizados foi feita por espectrometria UV-Vis utilizando o espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU, localizado no Laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina da UnB. A quantificação do conjugado peptídeo foi realizada tomando a proporção de 1AG:1Hs11. A medida tradicional de quantificação de peptídeos, que relaciona os valores de absorvância nos comprimentos de onda de 205 nm, 215 nm, 225 nm e 280 nm às equações devido à presença de anéis aromáticos na cadeia lateral de resíduos de aminoácidos, não foi realizada devido à conjugação do AG ao peptídeo. Em vez disso, uma regressão linear foi feita a partir de concentrações variáveis de AG, indo de menos concentradas a mais concentradas. Para a realização da curva analítica, foram utilizadas quantidades crescentes do polifenol até uma concentração máxima de 0,1M. Após a preparação das amostras com concentrações variadas de AG, elas foram inseridas no espectrofotômetro para leitura do valor de absorvância a 280 nm (valor de absorção de moléculas com presença de anéis aromáticos). Com a curva analítica do AG determinada, uma alíquota do Hs11-AG foi diluída em uma cubeta de 1 mL. Diluições adicionais foram realizadas para que as intensidades de absorvância ficassem dentro do intervalo de valores gerados pela curva de calibração feita com amostras de AG. Para a determinação precisa da quantidade de material, a intensidade do sinal obtida do analito de interesse foi interpretada pela equação geral linear abaixo, onde os valores de x e y representam concentração e absorvância, respectivamente:

$$y = ax + b$$

Depois da determinação da quantificação, fatores de diluição foram empregados para obtenção do real valor da amostra.

4.5. Determinação de MIC e MBC

Com a finalidade de examinar as propriedades antimicrobianas do conjugado, procedemos ao teste de suscetibilidade de microrganismos em diluição em caldo, seguindo os protocolos M7-A10, M27-A3 e M38-A2 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Os microrganismos *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 90028, *A. baumannii* ATCC 13304 e *S. epidermidis* Statens Seruminstitut cepa 1 foram selecionados a partir da biblioteca da Universidade Católica de Brasília (UCB), conforme apresentado na Tabela 5. Esses testes foram executados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB, em colaboração com a equipe de pesquisa liderada pelo Dr. Marcelo H. S. Ramada e supervisionados pela Mrs. Bianca Oliveira.

O conjugado foi incubado em uma faixa de concentração de 128 μM a 0,25 μM , durante 24 horas a 37°C, em um meio de cultura líquido contendo bactérias, com concentrações finais de 5×10^5 células/mL. Esse procedimento ocorreu no meio Mueller-Hinton (Himedia). A gentamicina foi utilizada como controle positivo, variando de 20 μM a 0,039 μM . Para a avaliação da concentração microbicida mínima (MBC), 10 μL da concentração do MIC e mais uma concentração acima foram plaqueadas em placas contendo meio MH sólido e incubadas nas mesmas condições para o teste de CIM

4.6. Citotoxicidade do conjugado

A viabilidade celular em relação ao conjugado Hs11-AG foi testada em células de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM). Para este experimento, as células foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços, tratadas por 24 horas e 48 horas com o conjugado em diferentes concentrações (0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM). Após os tempos de estímulo, o sobrenadante foi substituído por uma solução de 10% de reagente MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) (Sigma-Aldrich, USA) 5mg/mL diluído no próprio meio de cultura celular. Em seguida, a placa

foi incubada por 4h protegida da luz na estufa com 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram diluídos em 100µL de DMSO. A absorbância lida foi de 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Para o cálculo da 42 viabilidade, as células não estimuladas foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculados proporcionalmente.

5. Resultados e discussão

5.1. Síntese do conjugado Hs11-AG e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a síntese em fase sólida do Hs11-AG, a principal rota empregada foi a DIC/Oxima devido à sua eficiência nos acoplamentos. Durante a síntese do conjugado, resíduos de aminoácidos contendo grupos protetores volumosos apresentaram dificuldades no acoplamento, necessitando repetição do processo. Na etapa final, o ácido gálico foi acoplado utilizando o mesmo procedimento dos resíduos de aminoácidos anteriores. Este último apresentou baixa eficiência de conjugação ao N-terminal do peptídeo, requerendo então um re-acoplamento. A confirmação da conjugação do ácido gálico foi inicialmente realizada de maneira qualitativa pelo Teste de Kaiser. Em seguida o material resultante foi clivado da resina e submetido a purificação.

O conjugado Hs11-AG foi purificado por cromatografia de alta eficiência. O tempo de retenção do conjugado foi de 26,71 minutos. O cromatograma de purificação pode ser visto na Figura 11:

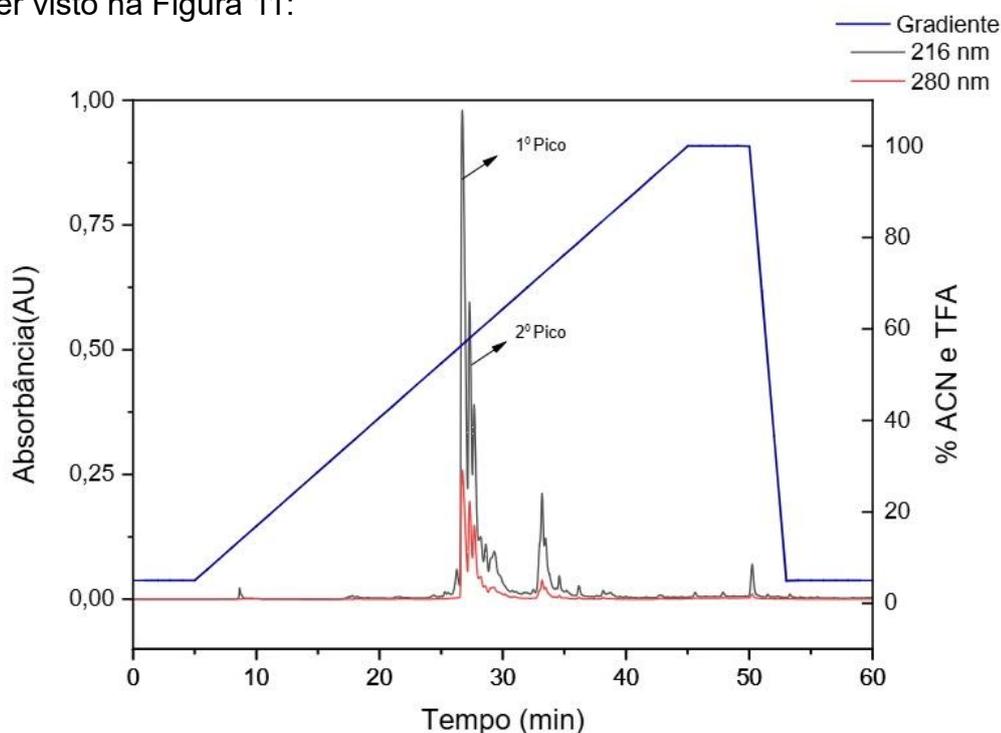


Figura 11 - Cromatograma correspondente a purificação do conjugado Hs11-AG com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha azul) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha cinza) e 280nm

(representado pela linha vermelha), onde o Hs11-AG e o Hs11-AG-AG eluíram em tempos de retenção de 26,71 minutos e 27,29 minutos, respectivamente.

A partir da purificação do material sintetizado, observou-se a presença do conjugado Hs11-AG como o pico majoritário no cromatograma apresentado. O segundo pico mais intenso, que eluiu aos 27,29 minutos, foi submetido à análise por MS, a qual revelou a adição de um segundo AG ao Hs11-AG. Acredita-se que, devido à ausência de grupos protetores no polifenol, ocorreu a adição de uma das hidroxilas do AG já acoplado ao Hs11 à outra molécula de AG ativado pela carbodiimida livre em solução. O terceiro pico foi coletado para análise; no entanto, sua baixa concentração inviabilizou sua caracterização. Infere-se do cromatograma apresentado na Figura 11 que a síntese do conjugado foi realizada de forma satisfatória, com poucos subprodutos reacionais, tendo como maior interferente o subproduto coletado no segundo pico. A escolha do gradiente é outro fator de papel principal para a resolução dos picos coletados, dada a similaridade da polaridade entre as moléculas caracterizadas.

5.2. Confirmação da síntese do Hs11-AG por espectrometria de massa

As frações cromatográficas obtidas foram submetidas à análise por espectrometria de massa em modo positivo através de infusão direta em um ESI Q-ToF. Após a purificação por CLAE, as frações 1 e 2 foram coletadas e analisadas por MS, verificados nas figuras 12 e 13. As relações carga/massa do pico 1 e do pico 2 estão apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

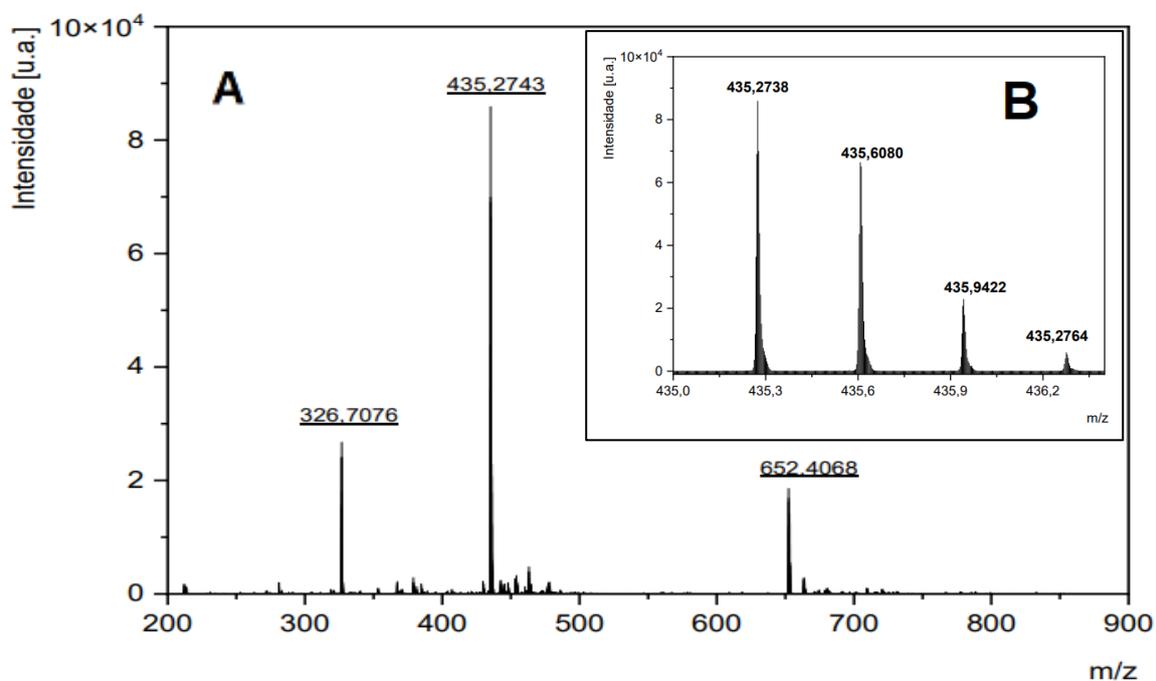


Figura 12- A) Espectro de MS do conjugado Hs11-AG. B) Série isotópica do referente ao íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$.

A partir do espectro de MS apresentado na figura 12-A, confirmou-se a presença da molécula de interesse (figura 13) pela presença de íons de múltiplas cargas com seus respectivos valores determinados. A massa obtida por MS apontou o sinal mais intenso para o íon $[M+3H]^{3+} = 435,2743$ Da, que está em concordância com a massa monoisotópica teórica calculada de $[M+3H]^{3+} = 435,2738$ Da (erro = 1,1 ppm) que pode ser observado pela série isotópicas na figura 12-B.

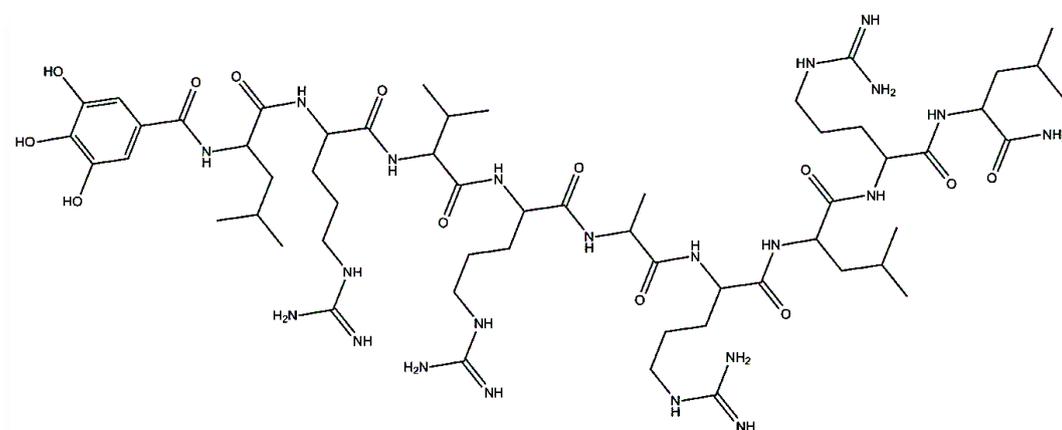


Figura 13- Estrutura em modelo 2D do Hs11-AG desenhado no software ChemDraw Pro 8.0.

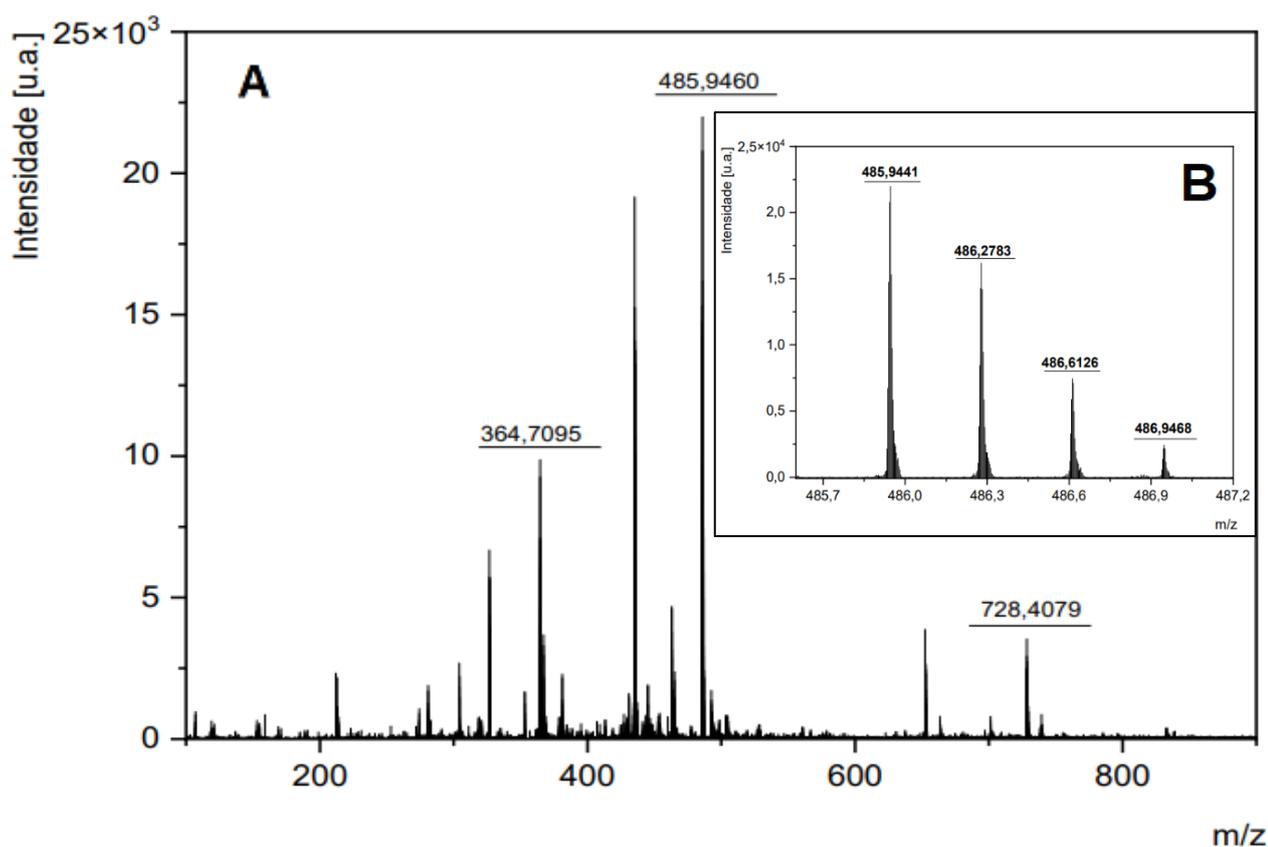


Figura 14- A) Espectro de MS do conjugado Hs11-AG-AG. B) Série isotópica do referente ao íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$.

Como resultado de reações secundárias na síntese do Hs11-AG, observou-se, através da caracterização da fração no pico 2, um acoplamento adicional de AG conforme evidenciado no espectro da figura 14-A. A massa obtida por MS apontou o sinal mais intenso para o íon $[M+3H]^{3+} = 485,9460$ Da, que está em concordância com a massa monoisotópica teórica calculada de $[M+3H]^{3+} = 485,9442$ Da (erro = 3,7 ppm) que pode ser observado pela série isotópicas na figura 14-B. A estrutura em modelo 2D do subproduto majoritário da síntese pode ser visto na figura 15 abaixo:

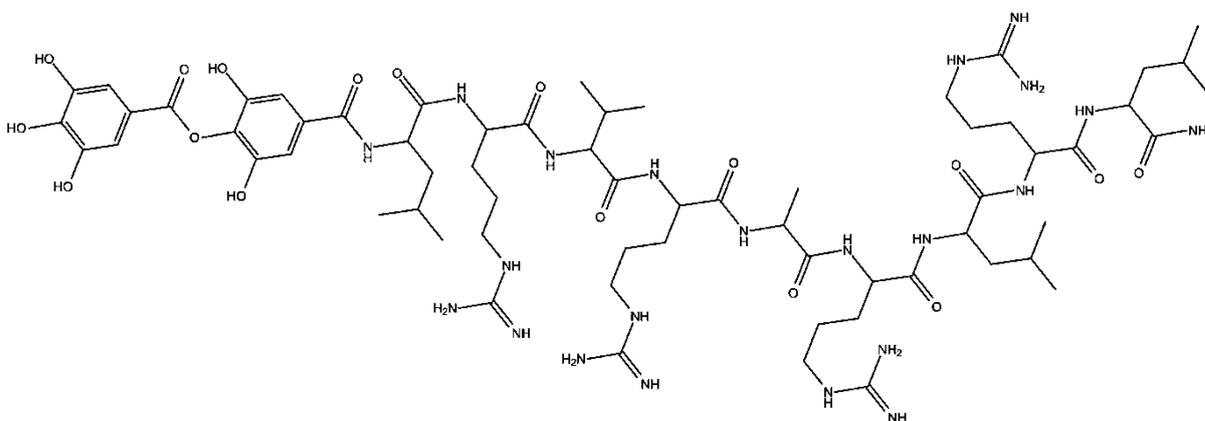


Figura 15- Estrutura em modelo 2D do Hs11-AG-AG desenhado no software ChemDraw Pro 8.0.

Para confirmar a presença de AG em ambas as frações coletadas, foram obtidos espectros de MS/MS, apresentados nas figuras 16 e 17. O espectro de MS/MS gerado pela fragmentação do íon precursor $[M+3H]^{3+}$ de ambas as moléculas permitiu confirmar a presença do ácido gálico como um íon acílio com intensidade elevada. Além disso, a quebra de ligações peptídicas produz fragmentos das séries y e b, na qual a primeira é formada quando a carga residual está presente na porção C-terminal, e a segunda consiste em íons que retêm a carga na região N-terminal da cadeia polipeptídica (CLEVELAND; ROSE, 2013). A partir da série b, confirmou-se a presença do Hs11, tal como visto na figura 16. O AG foi caracterizado e destacado em ambos os espectros; além disso, na figura 17, destaca-se a presença do dímero formado por dois AG.

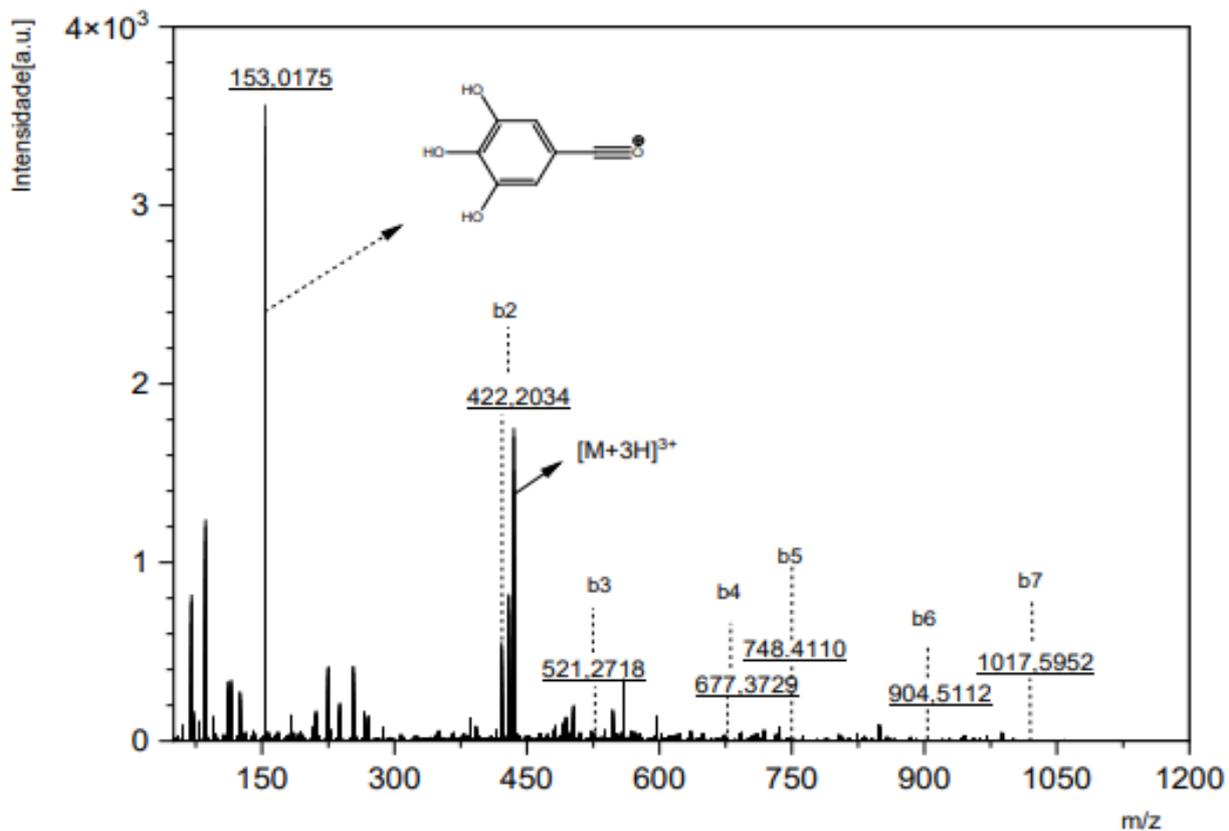


Figura 16- Espectro de MS/MS do Hs11-AG destacando a estrutura do AG e a identificação do íon precursor $[M+3H]^{3+}$.

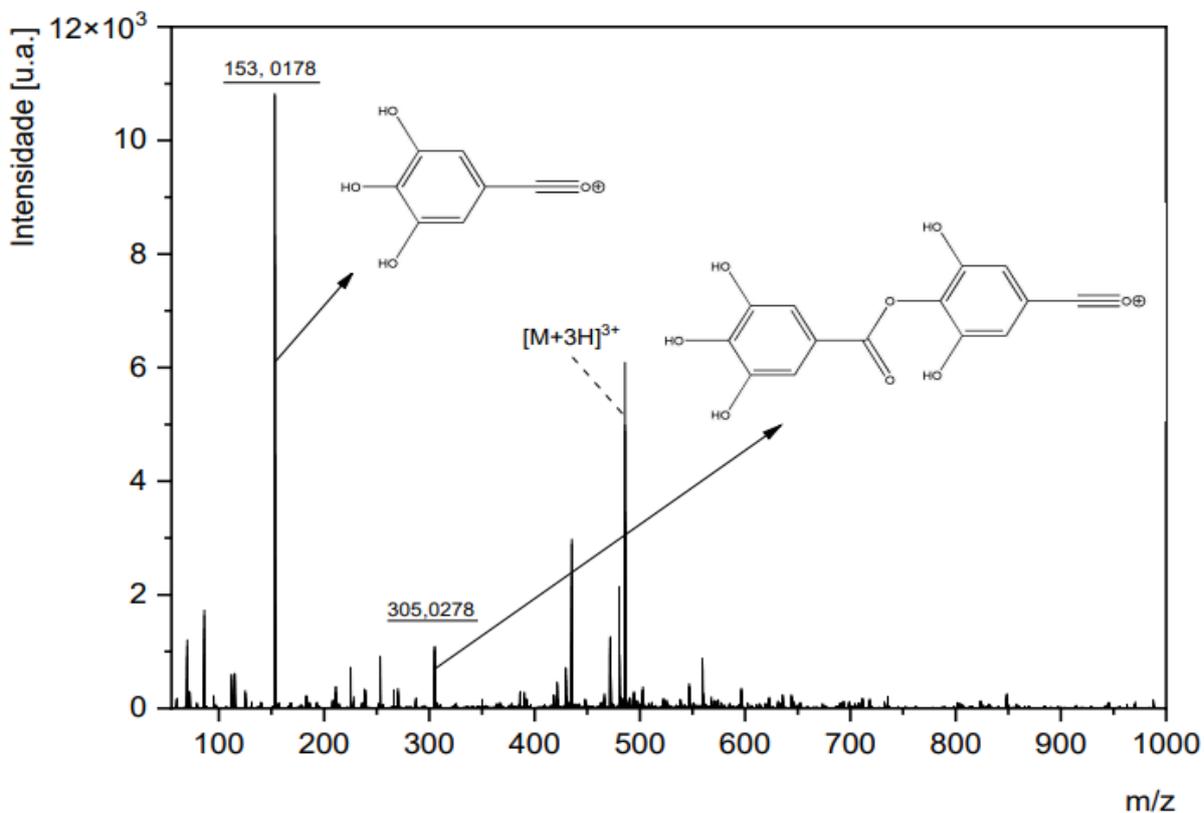


Figura 17- Espectro de MS/MS do Hs11-AG-AG destacando a estrutura tanto monomérica quanto dímica do AG, com identificação do íon precursor $[M+3H]^{3+}$.

Tabela 2 – Massas teóricas e experimentais de fragmentos detectados em EM do Hs-AG

Íons	Massa teórica (Da)	Massa detectada (Da)	Erro (ppm)
$[M+2H]^{2+}$	652,4071	652,4068	-0,5
$[M+3H]^{3+}$	435,2738	435,2743	1,1
$[M+4H]^{4+}$	326,7072	326,7076	1,4

Tabela 3 – Massas teóricas e experimentais de fragmentos detectados em EM do Hs-AG-AG

Íons	Massa teórica (Da)	Massa detectada (Da)	Erro (ppm)
$[M+2H]^{2+}$	728,4126	728,4097	-3,9
$[M+3H]^{3+}$	485,9442	485,9460	3,7
$[M+4H]^{4+}$	364,7099	364,7095	-1,3

Conclui-se, com base em todos os dados apresentados, que a síntese do Hs11-AG foi realizada de maneira satisfatória. Os fragmentos de múltiplas cargas apresentados nas tabelas acima são consequentes da presença de resíduos de aminoácidos básicos como arginina e lisina na cadeia peptídica, o que dificulta a detecção do fragmento com íon de carga $[M+H]^+$, que foi irrisório, e logo, não evidenciado.

5.3. Quantificação do conjugado Hs11-AG

A quantificação do conjugado Hs11-AG é desafiadora. Devido a presença do AG na molécula, métodos convencionais de quantificação de peptídeos com base na absorbância da ligação peptídica não podem ser usados. Para a quantificação do conjugado em questão, uma curva analítica foi construída a partir de concentrações crescentes de AG e a leitura das amostras a 280 nm com o auxílio de um espectrofotômetro. Os valores obtidos são apresentados abaixo:

Tabela 4-Valores de concentração e absorbância em 280 nm

Concentração(mM)	Absorbância
0,1	0,663
0,09	0,625
0,08	0,508
0,07	0,388
0,06	0,341
0,05	0,258
0,04	0,222
0,03	0,135
0,02	0,083
0,01	0,050

A partir dos valores obtidos, a curva analítica foi feita, tal como demonstrado na figura 18:

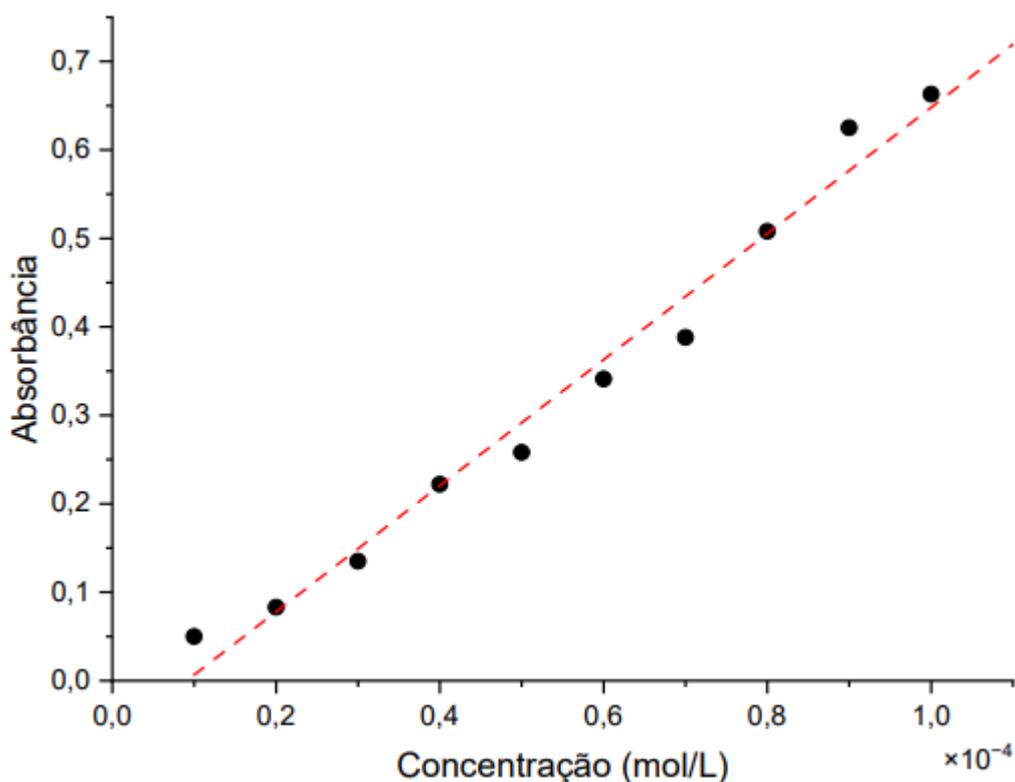


Figura 18-Curva analítica AG de equação $y=7125,1x-0,0645$ ($R^2=0,9801$) construída a partir da regressão linear dos dados da tabela 4.

A regressão linear dos dados gerou uma equação linear como apresentado abaixo com seu respectivo fator de correlação:

$$y=7125,1x-0,0645 \quad R^2=0,9801$$

De posse dos dados, uma alíquota do conjugado Hs11-AG foi solubilizada em água miliQ e a absorbância foi determinada em uma cubeta de quartzo com volume de 1 mL. Fatores de diluição foram empregados, uma vez que foi necessário diluir a amostra para que os valores de absorbância ficassem dentro das concentrações apresentadas na determinação da curva analítica, garantindo a obtenção precisa do valor da amostra inicial.

5.4. Atividade antimicrobiana do conjugado Hs11-AG

A avaliação da atividade antimicrobiana do conjugado sintetizado foi determinada por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e

concentração microbicida mínima (MBC) em relação a bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*), Gram-negativas (*E. coli*, *A. baumannii*) e a levedura *C. albicans*. Os resultados podem ser verificados na tabela 5 abaixo:

Tabela 5 – Valor de MIC e MBC, dado em μM , para bactérias patogênicas humanas

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>A. baumannii</i> ATCC 13304	<i>S. epidermidis</i> Statens Seruminstitu cepa 1
Hs11+AG (MIC \pm SD / MBC \pm SD)	58,67 \pm 7,54 / > 128	64 \pm 0 / > 64	64 \pm 0 / > N/A	64 \pm 0 / > 128	32 \pm 0 / > 64
Gentamicina (MIC \pm SD / MBC \pm SD)	N/R	0,52 \pm 0,15 / >0,625	0,625 \pm 0 / > 0,625	2,08 \pm 0,36 / > 2,5	0,039 \pm 0 / 0,156

N/A = Não detectada; N/R = Não realizada

O conjugado Hs11-AG demonstrou capacidade de inibir o crescimento de todos os microrganismos em concentrações próximas a 64 μM , com exceção da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis*, cuja inibição ocorreu a uma concentração de Hs11-GA de 32 μM . Ensaio de concentração inibitória mínima previamente realizados com ambas as moléculas isoladas (Hs11 e AG) revelaram respostas contrastantes em relação ao conjugado. O peptídeo Hs11, isoladamente, inibiu o crescimento de ambas as bactérias a uma concentração de 16 μM para *E. coli* e *S. aureus*, indicando então que o conjugado Hs11-AG foi menos potente para estas bactérias (SANTOS et al. 2023). Todavia, em relação ao AG, houve um ganho de potência como agente antimicrobiano. HOSSAIN et al apresentaram MIC para o AG de 1024 $\mu\text{g/mL}$ (6,02 mM) para *E. coli* (HOSSAIN et al., 2020). BORGES et al, no entanto, estimou um MIC de 1500 $\mu\text{g/mL}$ (8,82 mM) para esta mesma bactéria (BORGES et al., 2013). Para *S. aureus*, AG teve MIC de 1750 $\mu\text{g/mL}$ (10,3 mM) de acordo com BORGES et al, enquanto JIAMBOONSRI et al reportaram MIC de 190 $\mu\text{g/mL}$ (1,2 mM) (BORGES et al., 2013; JIAMBOONSRI et al., 2011). Ainda, os MICs de AG para as bactérias *S. epidermidis* e *A. baumannii* foram de 3,67 mM (0,625 mg/mL) e 9,7mM (1,65 mg/mL), respectivamente (PINHO et al., 2014; SHERIF et al., 2021). Sobre a ação antifúngica do AG, ALVES et al determinaram para a cepa *C. albicans* o MIC de 917 μM (0,156 mg/mL) (ALVES et al., 2014). Desta forma, quando se observa o MIC de AG, percebe-se atividade antimicrobiana em escala milimolar, em contraste com o Hs11, que é

antimicrobiano em escala micromolar. Desta forma, em relação ao AG, houve a potencialização dos efeitos antimicrobianos do produto natural por sua conjugação com o Hs11.

Os valores de MBC apresentados para as cepas, com exceção dos microorganismos *C. albicans* e *S. aureus*, foram divergentes daqueles do MIC. Esses resultados indicam que o valor de MIC não foi suficiente para exterminar a população bacteriana, demonstrando que o Hs11-AG possui uma ação bacteriostática para esses organismos, ou seja, inibe o crescimento bacteriano, porém, sem matar todas as bactérias. No entanto, no caso das células bacterianas *S. aureus*, o valor de MIC equivalente ao MBC demonstra uma atividade bactericida, indicando que o Hs11-AG aniquilou a população bacteriana na mesma concentração que a inibiu.

A combinação AG com antibióticos tradicionais tem mostrado efeitos promissores, evidenciados pela redução da concentração inibitória mínima (MIC) (HOSSAIN et al., 2020). A conjugação do AG aos antibióticos parece promover um sinergismo, embora os mecanismos exatos ainda não estejam completamente elucidados. Estudos indicam que o AG pode alterar propriedades morfológicas, permeabilidade celular e integridade das membranas bacterianas (SAEED KHORSANDI; RAHIMI; KHORSANDI, 2023). No entanto, os resultados quanto à ação antimicrobiana do conjugado Hs11-AG são ambíguos. Observou-se uma diminuição na atividade antimicrobiana quando o AG foi conjugado ao Hs11, em comparação com o peptídeo isolado, sugerindo que as propriedades físico-químicas restritas para a interação com membranas bacterianas são determinantes nessa ação (SANTOS et al., 2022). A introdução de um polifenol na cadeia peptídica pode ter desestabilizado a capacidade de estruturação do conjugado em folha- β frente à bicamada lipídica das bactérias, reduzindo sua atividade biológica. Outras cepas bacterianas não foram utilizadas para comparação com a atividade antimicrobiana do Hs11 isolado devido à ausência de dados. Em contraste com os resultados anteriores, após a conjugação do Hs11 ao AG, observou-se uma redução significativa no MIC inicialmente maior do AG. Estudos de Zhang et al. demonstraram que a conjugação entre AG e um AMP permitiu ao peptídeo atuar dentro da membrana citoplasmática bacteriana e em componentes intracelulares (ZHANG et al., 2023). Propõe-se a hipótese de que o Hs11 possa ter agido como um carreador do AG para o ambiente citoplasmático das bactérias, ou ainda, que a natureza inerente do Hs IAP de atuar

como uma molécula antimicrobiana, mesmo com sua atividade atenuada, possa explicar a redução do valor do MIC em comparação ao AG isolado.

Apesar da atividade do conjugado Hs11-AG ter sido menos promissora na inibição das cepas bacterianas testadas no presente trabalho, em comparação ao Hs11 isolado, estudos realizados por KANG et al. demonstraram que, embora o ácido gálico (AG) em determinada concentração não iniba o crescimento de certas populações de bactérias, o polifenol pode inibir a produção de biofilmes, um mecanismo de defesa das células procarióticas (KANG et al., 2018). Assim, para melhor compreender a ação do AG e reduzir os mecanismos de resistência antimicrobiana, prospecções futuras voltadas à capacidade da molécula do presente trabalho em inibir biofilmes mostram-se uma área promissora a ser explorada.

5.5. Efeito do conjugado Hs11-AG na viabilidade de células de macrófagos murinos

Avaliamos os efeitos da exposição do Hs11-AG em concentrações de 0,1µM, 1µM, 10µM e 100µM por 24 horas na viabilidade de macrófagos murinos (BMDM) através do ensaio de MTT. Os macrófagos murinos, células fagocíticas, foram avaliados devido ao seu papel na regulação do sistema imunológico e manutenção da homeostase em processos inflamatórios (GORDON, 2016).

O ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método colorimétrico quantitativo que se baseia na conversão do reagente MTT em cristais de formazan. Estes cristais exibem uma coloração azul e podem ser analisados por espectrofotometria após solubilização. A formação dos cristais está diretamente relacionada à viabilidade celular, sendo indicativos da atividade metabólica das células. A redução do MTT por células metabolicamente ativas resulta na geração desses cristais, o que possibilita a avaliação da porcentagem de células que permanecem metabolicamente ativas após o tratamento com uma substância específica (GRELA; KOZŁOWSKA; GRABOWIECKA, 2018). Como pode ser visto na Figura 19, avaliamos os efeitos da exposição do Hs11-AG em concentrações de 0,1uM, 1uM, 10uM e 100uM por 24 horas na viabilidade em BMDM através do ensaio de MTT.

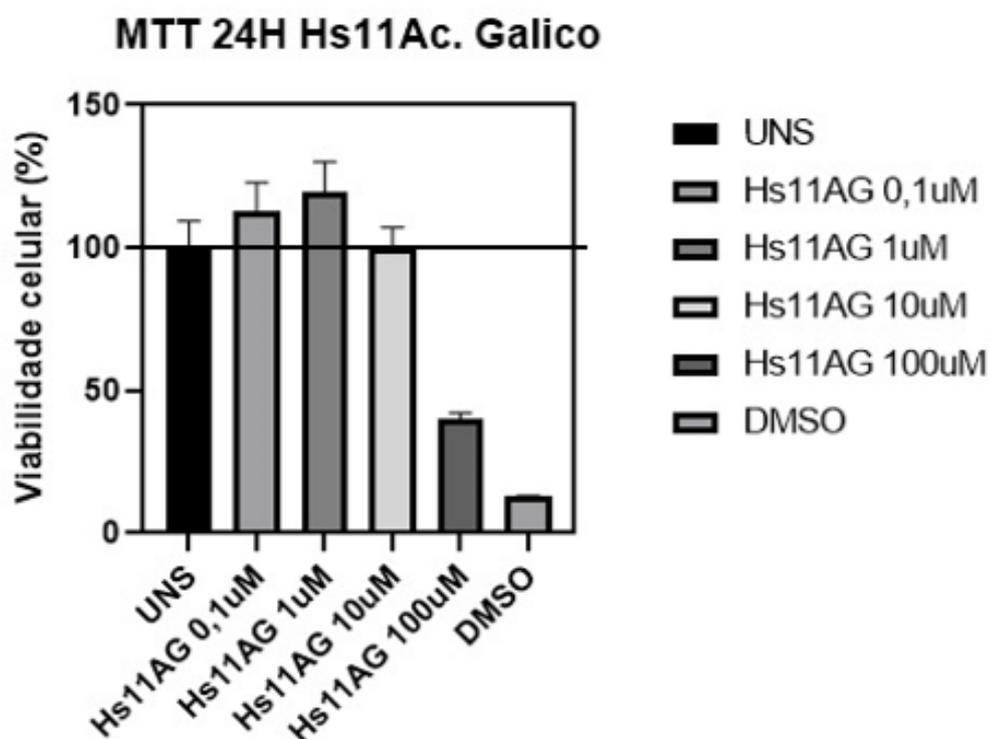


Figura 19 - Ensaio de viabilidade celular MTT para verificar o efeito do conjugado Hs11-AG em BMDM após exposição de 24H.

O conjugado Hs11-AG em concentrações entre 0,1 μM e 10 μM não reduziu a viabilidade dos BMDM. Para além disso, em concentrações baixas de 0,1 μM e 1 μM , tem-se um aumento na viabilidade celular (aumento da atividade metabólica), todavia para a maior concentração testada de 100 μM o conjugado Hs11-AG passou a ser tóxico, reduzindo a viabilidade para valores inferiores a 50%.

A compreensão dos efeitos do conjugado Hs11-AG na viabilidade dos BMDM requer a avaliação da literatura. Um estudo conduzido por Pinho et al. revelou um aumento na viabilidade de células do tipo Fibroblasto Humano 3T3 quando expostas a concentrações de AG, variando de aproximadamente 58,8 μM a 588 μM . Contudo, concentrações acima de 588 μM mostraram-se citotóxicas. Assim, pode-se dizer que o comportamento observado para Hs11-AG é devido, majoritariamente ao AG, já que a literatura aponta para fenômenos similares: aumento da viabilidade celular em concentrações baixas e citotoxicidade em concentrações mais altas. Tal observação é reforçada ao verificar que o Hs11 em concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100

μM , não apresentaram redução na viabilidade de macrófagos murinos (Dados não publicados).

HORTON et al. exploraram a interação entre peptídeos com capacidade de interação com a mitocôndria, baseando-se em propriedades físico-químicas como carga líquida positiva e momento hidrofóbico (HORTON et al., 2008). O potencial negativo gerado pelo transporte de elétrons na membrana mitocondrial torna-a um alvo para peptídeos com carga líquida positiva, enquanto propriedades anfifílicas desempenham um papel importante na permeabilidade da bicamada lipídica da organela (HORTON et al., 2008). Devido às suas propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade e carga líquida positiva, pode-se hipotetizar que o Hs11 atua como um transportador do AG para a mitocôndria. Essa hipótese é sustentada pelo aumento inicial da viabilidade celular em concentrações menores, conforme apresentado na figura 19, comparado aos ensaios realizados com AG isoladamente (PINHO et al., 2014). A partir do ensaio de MTT realizado no presente trabalho, acredita-se que o aumento da viabilidade celular seja um reflexo da capacidade moduladora do AG na respiração celular, gerada pelo fluxo de elétrons entre complexos mitocondriais para a geração de ATP (KOSURU et al., 2018). Acredita-se que o aumento da viabilidade celular seja um resultado indireto da atividade moduladora do conjugado Hs11-AG no metabolismo mitocondrial, visto que a redução do MTT pode ser mediada por enzimas envolvidas no transporte de elétrons (GHASEMI et al., 2021; KOSURU et al., 2018). Por meio da figura 19, conclui-se que a conjugação do fenol aumentou a viabilidade celular, mas também reduziu a viabilidade em concentrações menores. Isso está de acordo com a natureza ambígua do AG, que pode ser antioxidante ou pró-oxidante dependendo da concentração administrada (KOSURU et al., 2018). Esse comportamento é observado com o aumento progressivo da concentração do conjugado, que atinge um valor máximo seguido pela redução da viabilidade celular para valores inferiores a 50%. Tendo em vista as potenciais ações do conjugado Hs11-AG e as hipóteses apresentadas, a molécula sintetizada emerge como um potencial agente antioxidante, quando avaliado em concentrações mais baixas. Assim, são necessários ensaios biológicos futuros para viabilizar seu uso na manutenção do controle homeostático oxidativo promovido pela mitocôndria.

6. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do conjugado Hs11-AG. Para isso, realizamos ensaios de MIC e MBC para avaliar sua ação antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas, além do ensaio de MTT para determinar sua citotoxicidade.

A atividade antimicrobiana do conjugado Hs11-AG apresentou resultados ambíguos quando com o peptídeo Hs11 e o AG isoladamente. Quando comparado ao AG, o conjugado apresentou melhorias na inibição de bactérias patogênicas e na eficácia contra fungos. Em contraste, a conjugação do Hs11 com AG resultou em uma significativa redução na atividade antimicrobiana para o Hs11 isolado, quando comparado a estudos anteriores. Isso indica que a conjugação de AG ao Hs11 não é vantajosa quando o foco é a capacidade de inibição do crescimento bacteriano. No entanto, a capacidade do AG em penetrar biofilmes reportada na literatura abre novas possibilidades de aplicação biotecnológica deste conjugado.

Os testes de MTT revelaram que o conjugado Hs11-AG apresentou citotoxicidade em células testadas em concentrações inferiores às observadas para ambos os componentes isolados. Além disso, observou-se um aumento na viabilidade celular em concentrações menores do que as reportadas para o AG isoladamente, sugerindo que a conjugação não apenas intensifica a citotoxicidade da molécula, mas também pode modificar seu impacto no metabolismo celular em concentrações reduzidas.

Verifica-se nesse trabalho que o desenho do Hs11-AG é voltado preferencialmente a atividade antioxidante por evidências indiretas da atividade mitocondrial por ensaios MTT, o que abre espaço para futuras investigações e potenciais usos desta molécula para homeostase dos processos oxidativos celulares.

7. Referências Bibliográfica

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the Cell (4th Ed). **Journal of Biological Education**, v. 37, p. 45–47, 2002.

ALVES, C. T. et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against Candida species. *Future Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 139–146, fev. 2014.

ALVES, M. M. DE M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 9, p. 893–903, 2017.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BALDWIN JR., A. S. Series Introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 3–6, 1 jan. 2001.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 22, 2013.

BOLHASSANI, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1816, n. 2, p. 232–246, 2011.

BORGES, A. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, v. 19, n. 4, p. 256–265, ago. 2013.

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45848-, 28 set. 2012.

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. e0220656-, 6 ago. 2019.

CAVAILLON, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 149, p. 45–53, 2018.

CLEVELAND, J. P.; ROSE, J. R. Identification of b-/y-ions in MS/MS spectra using a two stage neural network. **Proteome Science**, v. 11, n. 1, p. S4, 2013.

EDWARDS, I. A. et al. Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 442–450, 10 jun. 2016.

FU, C. et al. Peptide–drug conjugates (PDCs): a novel trend of research and development on targeted therapy, hype or hope? **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 2, p. 498–516, 2023.

GALARIS, D.; BARBOUTI, A.; PANTOPOULOS, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 12, p. 118535, 2019.

GHASEMI, M. et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kappaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, 2000.

GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1493–1505, 2006.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, 2018.

HEH, E. et al. Peptide Drug Conjugates and Their Role in Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 2023.

HIROSHI, N. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, 1 dez. 2003.

HISCOTT, J.; KWON, H.; GÉNIN, P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 2, p. 143–151, 15 jan. 2001.

HOSSAIN, MD. A. et al. Synergism of the Combination of Traditional Antibiotics and Novel Phenolic Compounds against Escherichia coli. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 811, 3 out. 2020.

JAYASURIYA, R.; RAMKUMAR, K. M. Role of long non-coding RNAs on the regulation of Nrf2 in chronic diseases. **Life Sciences**, v. 270, p. 119025, 2021.

JENSEN, K. J. Solid-Phase Peptide Synthesis: An Introduction. Em: JENSEN, K. J.; TOFTENG SHELTON, P.; PEDERSEN, S. L. (Eds.). **Peptide Synthesis and Applications**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 1–21.

JIAMBOONSRI, P. et al. The Inhibitory Potential of Thai Mango Seed Kernel Extract against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6255–6270, 25 jul. 2011.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, C.; MORENO, V.; VALLET-REGÍ, M. Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy. **Nanomaterials**, v. 12, p. 288, 17 jan. 2022.

KOSURU, R. Y. et al. Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 1, p. 1700699, 1 jan. 2018.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2016.

LAKSHMIKANTH, C. L. et al. Sepsis: in search of cure. **Inflammation Research**, v. 65, n. 8, p. 587–602, 2016.

LEVIN, J. et al. Detection of Endotoxin in the Blood of Patients with Sepsis Due to Gram-Negative Bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 283, n. 24, p. 1313–1316, 10 dez. 1970.

LI, T. et al. Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, p. 881–888, 2019.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, n. 10, p. 799–810, 1 out. 1985.

MI, G. et al. Self-assembled arginine-rich peptides as effective antimicrobial agents. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 4, p. 1046–1054, 1 abr. 2017.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 12 dez. 2008.

NAGAOKA, I. et al. Cathelicidin Family of Antibacterial Peptides CAP18 and CAP11 Inhibit the Expression of TNF- α by Blocking the Binding of LPS to CD14+ Cells¹. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3329–3338, 15 set. 2001.

ONG, Z. Y.; GAO, S. J.; YANG, Y. Y. Short Synthetic β -Sheet Forming Peptide Amphiphiles as Broad Spectrum Antimicrobials with Antibiofilm and Endotoxin Neutralizing Capabilities. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 29, p. 3682–3692, 7 ago. 2013.

PINHO, E. et al. Antibacterial Potential of Northeastern Portugal Wild Plant Extracts and Respective Phenolic Compounds. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 814590, 2014.

PIRES, D. A. T.; BEMQUERER, M. P.; DO NASCIMENTO, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 53–69, 2014.

RADAN, M. et al. Gallic acid protects particulate matter (PM₁₀) triggers cardiac oxidative stress and inflammation causing heart adverse events in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18200–18207, 2019.

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

ROSENFELD, Y.; SHAI, Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1513–1522, 2006.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 251, p. 126829, 2021.

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, 2023.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 215S-217S, 2005.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 1 maio 2010.

SOHRABI, F. et al. Gallic acid suppresses inflammation and oxidative stress through modulating Nrf2-HO-1-NF- κ B signaling pathways in elastase-induced emphysema in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 40, p. 56822–56834, 1 out. 2021.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753–758, 2003.

SUN, J. et al. Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 12, p. 2985–2993, 2014.

SUN, Y.; SHANG, D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 167572, 2015.

SHERIF, M. M. et al. Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Biofilms: Evaluation of Phenotypic–Genotypic Association and Susceptibility to Cinnamic and Gallic Acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 17 set. 2021.

TAN, P.; FU, H.; MA, X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, v. 39, p. 101229, 2021.

TORRES, M. D. T. et al. **Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications**. **Journal of Molecular Biology** Academic Press, , 23 ago. 2019.

ULAPANE, K. R. et al. Peptides and Drug Delivery. Em: SUNNA, A.; CARE, A.; BERGQUIST, P. L. (Eds.). **Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 167–184.

VENKATARANGANAYAKA ABHILASHA, K.; KEDIHITHLU MARATHE, G. Bacterial lipoproteins in sepsis. **Immunobiology**, v. 226, n. 5, p. 152128, 2021.

WANG, J. et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 831–859, 1 maio 2019a.

WANG, J. et al. **Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era**. **Medicinal Research Reviews** John Wiley and Sons Inc., , 1 maio 2019b.

WANG, Y. F. et al. A Cell-penetrating Peptide Suppresses Inflammation by Inhibiting NF- κ B Signaling. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 10, p. 1849–1857, 2011.

WARDYN, J. D.; PONSFORD, A. H.; SANDERSON, C. M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 4, p. 621–626, 3 ago. 2015.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 427, 2008.

WIEPRECHT, T. et al. Peptide Hydrophobicity Controls the Activity and Selectivity of Magainin 2 Amide in Interaction with Membranes. **Biochemistry**, v. 36, n. 20, p. 6124–6132, 1 maio 1997.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431–1433, 21 set. 1990.

WU, X. et al. TNF- α mediated inflammatory macrophage polarization contributes to the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis in mice. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 351–361, 21 jul. 2015.

YAMAUCHI, R. et al. Development of Antimicrobial Peptide–Antibiotic Conjugates to Improve the Outer Membrane Permeability of Antibiotics Against Gram-Negative Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 2339–2347, 11 nov. 2022.

ZHANG, O. L. et al. Antibacterial Properties of the Antimicrobial Peptide Gallic Acid-Polyphemusin I (GAPI). *Antibiotics*, v. 12, n. 9, p. 1350, 1 set. 2023.

HORTON, K. L. et al. Mitochondria-Penetrating Peptides. *Chemistry & Biology*, v. 15, n. 4, p. 375–382, abr. 2008.

ZHANG, G.; MEREDITH, T. C.; KAHNE, D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 779–785, 2013.

ZHANG, R.; XU, L.; DONG, C. Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. **Protein & Peptide Letters**, v. 29, n. 8, p. 641–650, 15 jun. 2022.

ZHONG, G. et al. Short Synthetic β -Sheet Antimicrobial Peptides for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Burn Wound Infections. *Advanced Healthcare Materials*, v. 6, n. 7, p. 1601134, 1 abr. 2017.

ZHOU, J. et al. Antimicrobial peptide PMAP-37 analogs: Increasing the positive charge to enhance the antibacterial activity of PMAP-37. *Journal of Peptide Science*, v. 25, n. 12, p. e3220, 1 dez. 2019.

ZHU, Y.-S.; TANG, K.; LV, J. Peptide–drug conjugate-based novel molecular drug delivery system in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 42, n. 10, p. 857–869, 1 out. 2021.

ANEXO 1

Tabela de aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma Letra	Símbolo de três letras
Ácido aspártico	D	Asp
Ácido glutâmico	E	Glu
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Valina	V	Val