UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**PEGUILAÇÃO DO PEPTÍDEO LUNATINA-1 VISANDO NOVO
CANDIDATO À FÁRMACO ANTIMICROBIANO**

Amanda Roberta Pereira da Silva

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**PEGUILAÇÃO DO PEPTÍDEO LUNATINA-1 VISANDO NOVO
CANDIDATO À FÁRMACO ANTIMICROBIANO**

Amanda Roberta Pereira da Silva

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2020

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586p Silva, Amanda Roberta Pereira
PEGuilação do peptídeo lunatina-1 visando novo
candidato à fármaco antimicrobiano / Amanda Roberta
Pereira Silva. - São Paulo, 2020.
74 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira

1. Biotecnologia Farmacêutica. 2. Peptídeo
Antimicrobiano. 3. PEGuilação. 4. Biobetter. I. T.
II. Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira, orientador.

AMANDA ROBERTA PEREIRA DA SILVA

**PEGuilação do peptídeo Lunatina-1 visando novo
candidato à fármaco antimicrobiano**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”*
(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e à Maria que sempre abriu caminhos em minha vida.

Aos meus pais, por todo o amor, paciência e dedicação que me foram dados, o apoio de vocês foi essencial nessa caminhada. Minha amada mãe, obrigada por ser minha melhor amiga e maior fonte de inspiração, a sra sempre será meu maior modelo de mulher. Meu amado pai, obrigada por todo o suporte que o sr me deu, por sempre estimular o meu melhor e acreditar no meu potencial. E a toda a minha família que sempre acreditou em minha capacidade, não acharia nesse mundo melhor fonte de amor que vocês. Eu os amo, muito obrigada.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela maravilhosa oportunidade que me deu em ser sua aluna, por todos os ensinamentos e conselhos, e por ser um modelo de professora e pesquisadora. Obrigada por acreditar em mim.

Aos professores do semi industrial, que me ajudaram durante a realização de alguns experimentos e por toda a dedicação nos conhecimentos que me foram dados.

Aos meus colegas de laboratório, por todas as risadas e ensinamentos trocados, em especial, meu querido amigo João, por sempre me apoiar e me ajudar a ver o melhor lado de cada resultado.

Ao Prof. Dr. Leandro Barbosa e seus alunos, por todo o companheirismo e ajuda em parte dos experimentos aqui apresentados. Sou muita grata por todos os ensinamentos e acolhimento que vocês me deram, e por ser “adotada” nesse laboratório do coração.

Aos meus amigos, que por tantas vezes me deram forças para continuar e estiveram comigo em todos os momentos. Eu sou muito feliz por ter vocês em minha vida. Em especial, minha amada irmã do coração Jéssica Scarlet e minha querida “friend” Natália Fernandes, manas eu só tenho a te agradecer por ter vocês duas ao meu lado.

Obrigada a todos que cruzaram a minha caminhada e de alguma forma me inspiraram a ser sempre uma pessoa melhor, me dando a oportunidade de crescer e me transformar na pessoa que sou hoje, extremamente orgulhosa por ser mestre.

À CAPES e CNPq por todo o apoio financeiro que me foi concedida para a realização desse projeto.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).....	17
2.1.1 IRAS bacterianas.....	19
2.1.2 Resistência bacteriana.....	20
2.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	21
2.2.1 Classificação dos peptídeos antimicrobianos.....	22
2.2.2 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	23
2.3 Peptídeos antimicrobianos de peçonhas.....	27
2.3.1 Lunatina-1.....	29
2.4 PEGuilação.....	31
3. OBJETIVOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Material.....	36
4.2. Purificação da lunatina-1 sintetizada.....	36
4.3. Estudo <i>in silico</i>	37

4.4. Ensaio de supressão de fluorescência da lunatina-1.....	37
4.5. Efeito da lunatina-1 em modelos de membrana.....	38
4.6. PEGuilação N-terminal da lunatina-1.....	39
4.7. Purificação lunatina-1 monoPEGuilada.....	39
4.8. Espectrometria de Massa – MALDI/TOF.....	40
4.9. Determinação da atividade antimicrobiana.....	40
4.10. Determinação do potencial hemolítico da lunatina-1 livre e PEGuilada	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Purificação do Peptídeo sintetizado.....	42
5.2. Estudo <i>in silico</i>	43
5.3 Supressão da fluorescência da lunatina-1 pelo PEG.....	46
5.4 Ensaio da integridade de vesículas.....	49
5.5 Estudo da PEGuilação N-terminal da lunatina-1.....	50
5.6 Caracterização da lunatina-1 peguilada por espectrometria de Massas...	52
5.7 Determinação da atividade antimicrobiana.....	55
5.8 Determinação do potencial hemolítico da lunatina-1 livre e PEGuilada...	56
6. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A.....	73

Lista de figuras

Figura 1. Classificação de peptídeos antimicrobianos pela distinção de estruturas secundárias: α -hélice, folha- β , PAMs mistos e PAMs estendidos.

.....

Figura 2. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas bacterianas.

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos.....

Figura 4. Fontes de peptídeos antimicrobianos (total de 3197).

Figura 5. Representação das vantagens de um peptídeo ou proteína peguila.

Figura 6. Possíveis sítios para a PEGuilação proteica.

Figura 7. Diagrama de Jablosky com níveis de energia.

Figura 8. Cromatograma do peptídeo lunatina-1 bruto (1,0 mg/mL) por RP-HPLC, empregando-se gradiente linear.

Figura 9. Cromatograma (RP-HPLC, gradiente linear) do peptídeo lunatina-1 purificado (1,0 mg/mL).

Figura 10. Representação da molécula da de lunatina-1.

Figura 11. Representação da estrutura α -hélice da lunatina-1.

Figura 12. Ilustração dos efeitos das supressões dinâmica e estática.

Figura 13. Espectro de absorbância (A) e fluorescência (F) dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa de pH 7.

Figura 14. Espectro de fluorescência da lunatina-1 pura em tampão fosfato e dos meios reacionais F1 e F2, correspondendo à reações de PEGuilação do peptídeo em proporções molares 1:10 e 1:5 de lunatina-1:PEG 2000, respectivamente. A concentração de lunatina-1 foi fixa nos três sistemas.

Figura 15. Comprometimento da integridade de vesículas lipídicas em função da razão [PEP]:[LIP].

Figura 16. Cromatograma (RP-HPLC) do meio reacional de PEGuilação da lunatina-1 empregando-se PEG de 2 kDa – **R1 com proporção de lunatina-1:PEG de 1:10, pH= 8,5, 60 min.** Com o índice de pureza de pico de 0,9999.

Figura 17. Cromatograma (RP-HPLC) do meio reacional de PEGuilação da lunatina-1 empregando-se PEG de 2 kDa – **R2 com proporção de PEG:Proteína (15:1) , pH = 8,5, 60 min.** Com o índice de pureza de pico de 0,9999.

.

Figura 18. Esquema da digestão por tripsina (A) e a porção peguilada (B).

Figura 19. MALDI-TOF da lunatina-1 livre e PEGuilada. (A) Digestão da lunatina-1 pela tripsina. (B) Digestão da lunatina-1 monopeguilada. (C) Espectro da PEGuilação da lunatina-1.

Figura 20. Efeito hemolítico da lunatina-1 nas concentrações de 3 μ molar até 600 μ molar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Figura 21. Efeito hemolítico da lunatina-1 PEGuilada nas concentrações de 20 μ molar até 600 μ molar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Figura A1. Criomicroscopia das vesículas composta por 40% POPC, 40% colesterol e 20% esfingomielina na concentração de 14 mM, extrusadas em filtro de 100 nm. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LLNano/CNPEN).

Lista de tabelas

Tabela 1. Relação observada entre o parâmetro crítico de agregação CPP, o formato do monômero e o formato do agregado resultante. v é o volume ocupado pela cauda apolar, a_0 é a área da seção transversal da cabeça polar e lc o comprimento do grupamento hidrofóbico (Adaptado de Israelachvili, 2011).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana da lunatina-1 livre e PEGuilada.

Tabela 3. Peptídeos antimicrobianos e seus HC₅₀ correspondentes. Os PAMs estão em ordem decrescente de acordo com seus valores de HC₅₀.

Tabela A1. Absorbâncias obtidas nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para a lunatina-1 livre, utilizando as cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* e CECT 239 de *Staphylococcus aureus*.

Tabela A2. Absorbâncias obtidas nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para a lunatina-1 PEGuilada, utilizando as cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* e CECT 239 de *Staphylococcus aureus*.

Lista de abreviaturas

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPP	Parâmetro Crítico de Empacotamento (CPP, do inglês <i>Critical Packing Parameter</i>)
HC	Concentração Hemolítica (HC, do inglês <i>Hemolysis Concentration</i>)
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
Leu	Leucina
MDR	Multirresistência (MDR, do inglês <i>Multidrug-resistant</i>)
MH	Müeller Hinton
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
PCIRAS	Plano de Controle para IRAS
PDR	Pan-resistência (PDR, do inglês <i>Pandrug-resistant</i>)
PEG	Polietilenoglicol
Phe	Fenilalanina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
PPD	Peptídeos com Pontes de Dissulfeto
PSPD	Peptídeos Sem Ponte de Dissulfeto
PTS	1,3,6,8-Pyrenetetrasulfonictetrasodium
SM	Esfingomielina
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivamente resistente (XDR, do inglês <i>Extensively drug-resistant</i>)

Lista de símbolos

Å	Angström
°C	Graus Celsius
g	Grama
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µm	Micrometro
µM	Micromolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem

RESUMO

SILVA, A.R.P. **PEGuilação do peptídeo Lunatina-1 visando novo candidato à fármaco antimicrobiano**. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) podem ser causadas por bactérias, vírus e fungos, sendo de extrema importância para o sistema de tratamento e pacientes. Com o alarmante avanço no surgimento de bactérias resistentes, tem havido uma preocupação crescente com as IRAS de origem bacteriana. Nesse sentido, várias pesquisas buscam alternativas para os fármacos antimicrobianos convencionais, sendo que os peptídeos antimicrobianos (AMPs), como a lunatina-1, aparecem como moléculas promissoras. No entanto, os AMPs geralmente apresentam rápida degradação proteolítica no trato gastrointestinal e meia-vida curta na corrente sanguínea, principais fatores limitantes para sua aplicação no tratamento de IRAS. Entre as estratégias empregadas para superar esses inconvenientes, a PEGuilação apresenta-se como alternativa eficaz que aumenta o tempo de circulação *in vivo* dos AMPs, resultando na melhora farmacocinética e, em alguns casos, também farmacodinâmica. A PEGuilação consiste na ligação covalente de cadeias de polietileno glicol (PEG) ao peptídeo, que pode ser efetuada por meio de uma reação aleatória ou sítio-específica. Neste trabalho, desenvolveu-se uma PEGuilação sítio-específica no *N*-terminal da lunatina-1 empregando-se mPEG-NHS de 2 kDa em tampão fosfato 100 mM, visando o aumento da solubilidade deste peptídeo, bem como para avaliar sua ação antimicrobiana. Com relação à reação de PEGuilação, avaliou-se a influência da razão molar PEG:peptídeo (10:1 ou 15:1) a pH 8,5. Foi obtido um rendimento de PEGuilação de 92%, através da análise por RP-HPLC quantitativo. Quanto à purificação da lunatina-1 PEGuilada, foi empregada a técnica semi-preparativa de RP-HPLC utilizando a coluna C₁₈. A caracterização da lunatina-1 PEGuilada, incluindo determinação do grau de PEGuilação, foi realizada por MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker), mostrando que a molécula foi monoPEGuilada na região *N*-terminal. A atividade antimicrobiana de lunatina-1 livre e bioconjugada frente a diferentes cepas bacterianas, sendo duas Gram-negativas (ATCC 25922 de *Escherichia coli* e ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa*) e uma Gram-positiva (CECT 239 de *Staphylococcus aureus*), foi estudada por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em microplaca, sendo que foram obtidos valores de CIM de 86 e 140 µM para o peptídeo livre e PEGuilado, respectivamente. O potencial hemolítico também foi estudado, sendo que a forma PEGuilada mostrou significativa redução da atividade hemolítica em comparação à forma livre. Em suma, a PEGuilação da lunatina-1, aumenta a sua solubilidade e reduz a atividade hemolítica. Porém, para viabilizar esta estratégia a PEGuilação deve ser reversível, pois a conjugação ao polímero reduz atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Lunatina-1, PEGuilação, infecções relacionadas à assistência à saúde, peptídeos antimicrobianos, bioconjugação.

ABSTRACT

SILVA, A.R.P. **PEGylation of the peptide Lunatin-1 aiming at novel candidate for antimicrobial drug.** 2020. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

Health care-related infections (HAIs) caused by bacteria, viruses and fungi are extremely important for patients and health systems. With the alarming advance in the emergence of resistant bacteria, a growing concern with HAIs of bacterial origin is observed. In this sense, several studies investigate alternatives to conventional antimicrobial drugs and antimicrobial peptides (AMPs), such as lunatin-1, appear as promising molecules. However, AMPs generally show rapid proteolytic degradation in the gastrointestinal tract and short half-life in the bloodstream, the main limiting factors for their therapeutic application to treat HAIs. Among the strategies used to overcome these drawbacks, PEGylation presents itself as an effective alternative that increases the *in vivo* circulation time of AMPs, resulting in improved pharmacokinetics and, in some cases, also pharmacodynamics. PEGylation consists on the covalent attachment of polyethylene glycol (PEG) chains to the peptide, which can be carried out by means of a random or site-specific reaction. In this work, a site-specific PEGylation was developed at the *N*-terminus of lunatin-1 using 2 kDa mPEG-NHS to increase the solubility of this peptide, as well as to evaluate its antimicrobial activity. Regarding the PEGylation reaction, the influence of the molar ratio PEG: peptide (10: 1 or 15: 1) at pH 8.5 was evaluated and a PEGylation yield of 92% was obtained, based on quantitative RP-HPLC analysis. As for the purification of PEGylated lunatin-1, semi-preparative RP-HPLC was used. The characterization of PEGylated lunatin-1, including determination of the degree of PEGylation, was performed by MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker), showing that the peptide was monoPEGylated in the *N*-terminal region. The antimicrobial activity of free and bioconjugated lunatin-1 against different bacterial strains, two Gram-negative (ATCC 25922 from *Escherichia coli* and ATCC 9027 from *Pseudomonas aeruginosa*), and one Gram positive (CECT 239 from *Staphylococcus aureus*), was studied by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) in a microplate, resulting in MIC values of 86 and 140 μ M for the free and PEGylated peptide, respectively. The hemolytic potential was also studied and the PEGylated form showed a significant reduction in hemolytic activity compared to the free form. In short, the PEGylation of lunatin-1 increases its solubility and reduces hemolytic activity. However, to make this strategy feasible, PEGylation must be reversible, since the conjugation to the polymer reduces antimicrobial activity.

Keywords: Lunatin-1, PEGylation, healthcare-related infections, antimicrobial peptides, bioconjugation.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) ou infecções hospitalares são infecções adquiridas por pacientes durante a internação para tratamentos médicos ou cirúrgicos, e são associadas a várias causas, tais como: complicações pós-cirúrgicas, transmissão entre pacientes ou profissionais da saúde, ou até como resultado do consumo frequente de antibióticos (Matos et al., 2018; Alvim & Santos, 2017). As IRAS prolongam as hospitalizações, causam maior resistência de microrganismos aos antimicrobianos e elevados custos para o sistema de saúde, assim, essas infecções podem ser consideradas como um dos principais eventos adversos na assistência médica (Padilha *et al.*, 2017).

Devido ao aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais, há um crescente interesse nos estudos de peptídeos naturais com atividade antimicrobiana. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem uma importante parte do sistema imune inato e sua produção ocorre a partir dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante as etapas iniciais do processo de infecção (Hancock e Scott, 2000; Zasloff, 2002). Esses peptídeos apresentam amplo espectro de ação contra bactérias e fungos patogênicos, vírus, células cancerígenas e parasitas (Li *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2014).

Tendo em vista o preocupante aumento da resistência bacteriana, a pesquisa sobre PAMs se faz necessária. A lunatina-1 é um peptídeo antimicrobiano com potencial bactericida, porém sua elevada hidrofobicidade prejudica a solubilização e ação biológica. Neste sentido, a peguilação, ou seja ligação covalente de cadeia de poli(etilenoglicol), consiste em alternativa para melhorar a lunatina-1. Entre os benefícios que o PEG pode proporcionar, destacam-se o aumento da hidrofiliabilidade e meia vida de fármacos. Neste trabalho, abordamos o uso da PEGuilação *N*-terminal como estratégia para diminuir a hidrofobicidade e, possivelmente, melhorar a ação antimicrobiana da lunatina-1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

Em meados do século XIX, Ignaz Semmelweis, Florence Nightingale e Joseph Lister, constituíram a chamada “revolução pausteriana”, que traz à tona os danos infecciosos associados à prestação de serviços à saúde (Larson, 1989). Porém, no século XX, medidas de controle nos hospitais são empregadas e as infecções hospitalares passam a ser combatidas de forma sistemática em países desenvolvidos (Nogueira *et al.*, 2014; Selwys 1991).

Já no Brasil, durante 1980, dá-se início à publicação de guias técnicos nacionais, que tratavam as infecções no âmbito da avaliação sanitária de estrutura. Assim, o combate às infecções hospitalares passa a ser pauta de autoridades sanitárias e do Ministério da Saúde, colocando em prática um programa de treinamento de capacitação para 14 mil profissionais (Lacerda, 2003). Em todo o mundo houve a necessidade de um Plano de Controle para IRAS (PCIRAS) com ações governamentais, no Brasil criou-se a Lei 9431/37, que estabelece a existência obrigatória de PCIRAS em todos os hospitais, e a Portaria 2016/98, que delibera a implementação e organização dos PCIRAS (Oliveira *et al.*, 2016).

O entendimento sobre as IRAS teve conceitos em estados evolutivos com o passar dos anos; primeiramente foram consideradas somente ocorrências de caráter sanitário, em seguida o ambiente hospitalar foi inserido em estudos epidemiológicos de fatores de risco e, atualmente, é entendida como um problema de saúde pública (Padoveze *et al.*, 2019). Em 1990, há a substituição do termo “infecções hospitalares” para “infecções relacionadas à assistência à saúde”, IRAS, incorporando infecções adquiridas e relacionadas à assistência em qualquer ambiente (Horan *et al.*, 2008).

As infecções relacionadas à assistência à saúde representam um dos maiores problemas de saúde pública que afeta pacientes internados e causam um aumento expressivo no tempo de internação hospitalar, mortalidade e morbidade (Sax *et al.*, 2013). Além disso, ainda há muita dificuldade em definir a real magnitude do problema no país, havendo necessidade de um sistema de vigilância epidemiológica em âmbito nacional.

As IRAS consistem no evento adverso mais frequente em instituições hospitalares, colocando em risco a segurança do paciente (ANVISA, 2017). A maior

incidência ocorre nas unidades de terapia intensiva (UTIs), em que as infecções são associadas aos cateteres urinários, cateteres venosos centrais e à ventilação mecânica, assim como, o uso de antimicrobianos de largo espectro e período de internação prolongado (ANVISA, 2017). Segundo Osman & Askari (2014), as IRAS representam 20% de todas as infecções diagnosticadas nos pacientes hospitalizados. No entanto, dados levantados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 1995 e 2010 mostraram que, para países em desenvolvimento, 11% dos pacientes internados desenvolvem IRAS; já para países desenvolvidos, a média é de 7% dos pacientes. No Brasil, essa média alcança os 14% (WHO, 2011). De cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma IRAS (WHO, 2014).

Países desenvolvidos são mais estruturados na criação de programas governamentais para a prevenção de IRAS, os quais são reconhecidos como prioridade nesses países devido a trágicas experiências com o vírus Ebola na África e com pandemias como a influenza e coronavírus (MERS-CoV) (Allegranzi *et al.*, 2017). No Brasil, houve avanços quanto à prevenção nos serviços de saúde e sistemas de vigilância epidemiológica, mas ainda há muitas ocorrências e fragilidades no sistema, aproximadamente 1 em cada 10 hospitalizados irão adquirir IRAS (Fotaeza *et al.*, 2017).

Foi observado que no Brasil as IRAS representam 60% dos casos de sepse e mais de 55% da taxa de mortalidade relacionadas à sepse em UTIs (Machado *et al.*, 2017). Além disso, o uso exacerbado de antimicrobianos no ambiente hospitalar favorece a seleção de cepas resistentes, em que há também a disseminação facilitada nesses ambientes. Assim, a crescente ineficácia dos antibióticos atuais em uso clínico, juntamente com a diminuição de novos fármacos inseridos no mercado, tem gerado aumento na demanda por novos antimicrobianos.

As IRAS podem ser ocasionadas por fungos, vírus e bactérias e na maioria das vezes estão associadas a ambientes hospitalares, podendo se manifestar durante a internação, procedimentos hospitalares ou após a alta. Podem ser adquiridas durante a prestação dos serviços de saúde e geralmente são diagnosticadas a partir de 48 horas após a internação (Padoveze & Fortaleza, 2014).

2.1.1 IRAS bacterianas

As bactérias são os principais agentes causadores de IRAS, sendo que tipos selecionados de bactérias provocam processos infecciosos em pacientes debilitados. As bactérias patogênicas que apresentam maior virulência representam o maior risco de infecções, podendo estas, serem endêmicas ou localizadas (ANVISA, 2004). Em especial, os patógenos membros do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*) apresentam cepas associadas a IRAS e resistentes a múltiplos antibióticos (Boucher, 2009).

Rice, em 2008, mencionou o termo ESKAPE pela primeira vez, o acrônimo é composto pela letra inicial das seis bactérias que o compõe, sendo estas resistentes a múltiplas drogas e de alta virulência. O acrônimo ESKAPE, variou da palavra “escape” que traduzida significa escapar, pois essas bactérias “escapam” de tratamentos bacterianos convencionais e causam maior mortalidade em hospitais (Rice, 2008).

A multirresistência bacteriana é dividida em três categorias: (i) bactérias resistentes a múltiplos fármacos (“*multidrug-resistant*” – MDR), (ii) bactérias extensivamente resistente (“*extensively drug-resistant*” – XDR), quando há resistência a um ou mais antimicrobianos em quase todas as categorias, e (iii) bactérias que são resistentes a todos os agentes antimicrobianos ou bactérias pan-resistentes (“*pan-resistant*” – PDR) (Mulani *et al.*, 2019).

A OMS estabelece três categorias de patógenos prioritários para a necessidade de novos antibióticos: crítica, alta e média. Os patógenos ESKAPE estão na lista de 12 bactérias com urgência na necessidade de novos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018). As bactérias ESKAPE subdividem-se em três categorias de acordo com os mecanismos de resistência a fármacos: (i) redução do acúmulo do fármaco pelo aumento de efluxo, (ii) inativação do fármaco por clivagem catalisada por enzima, e (iii) modificação no sítio alvo onde o antibiótico se ligaria. Outra forma de resistência é a formação de biofilmes, em que há o impedimento físico da resposta imune e da ação de antibióticos (Lewis, 2007; Santajit & Indrawattana, 2016).

Com o avanço no surgimento de bactérias resistentes, tem aumentado a preocupação em torno das IRAS associadas a bactérias. O aumento do uso de antibióticos gera maior pressão seletiva de microrganismos resistentes, elevando as taxas de morbidade e mortalidade ocasionadas por essas infecções (Spellberg *et al.*, 2011). Como

agravante, houve um aumento globalizado nas taxas de organismos resistentes aos antimicrobianos empregados em IRAS (WHO, 2016).

Por conta de eventos epidêmicos, o Brasil vem sofrendo no controle de IRAS. Procedimentos invasivos geraram surtos de micobactérias de rápido crescimento, agravados pela resistência das mesmas ao glutaraldeído, um dos principais agentes de desinfecção de superfícies em ambiente hospitalar (Lorena *et al.*, 2010). O mesmo aconteceu para as enterobactérias: *Enterococcus spp* resistente à vancomicina e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (Padoveze & Fortaleza, 2014). O surgimento de bactérias resistentes a múltiplos fármacos em hospitais tem dificultado o tratamento de infecções hospitalares (Gomes; Moraes, 2017).

2.1.2 Resistência bacteriana

A resistência antimicrobiana é uma adaptação dos microrganismos ao meio ambiente. Algumas bactérias podem ser naturalmente resistentes a certos tipos de antibióticos, porém, tem se notado um avanço no surgimento de bactérias resistentes por meio de mudanças genéticas (ECDC, 2008).

A resistência antimicrobiana adquirida pode ser genética ou bioquímica. Quanto à resistência genética, determinadas espécies de bactérias podem ser intrinsicamente resistentes, podendo estar relacionada a genes cromossômicos (Blair *et al.*, 2015; Cox; Wright, 2013). Em outros casos, a resistência pode ocorrer devido à mutações adquiridas durante o processo de replicação ou ser induzida por agentes mutagênicos (Acosta & Vargas, 2018), ou por transferência horizontal de genes, que se dá pela aquisição de genes exógenos de outras espécies por meio de três mecanismos: (i) conjugação bacteriana por meio de plasmídeos ou transposons; (ii) transdução por via de bacteriófagos; ou (iii) transformação pela agregação de fragmentos cromossômicos (Dzidic, Suskovic & Kos, 2008; Aleskshun & Levy, 2007).

Já os mecanismos de resistência bioquímicos são: (i) inativação enzimática do antibiótico, que se dá pela produção bacteriana de enzimas que degradam ou modificam a estrutura do fármaco (Dzidic, Suskovic & Kos, 2008); (ii) modificação do sítio de ação do antibiótico, faz com que o mesmo não se ligue de forma correta ao alvo bacteriano (Blair *et al.*, 2015; Dzidic, Suskovic & Kos, 2008); (iii) bombas de efluxo, essas proteínas membranares tem a capacidade de externar os antibióticos para o meio extracelular (Dzidic, Suskovic & Kos, 2008); (iv) alteração da permeabilidade da membrana, tornando os fármacos impenetráveis (Dzidic, Suskovic & Kos, 2008; Cox; Wright, 2013); e (v)

formação de biofilmes (Kumar & Varela, 2013). Com relação à alteração de permeabilidade da membrana, há três formas de penetrar na membrana: por porinas que são proteínas membranares, difusão simples pela bicamada lipídica e penetração dependente de características físico-química do antibiótico.

Diversas bactérias têm apresentado resistência tornando-se um problema para o tratamento de infecções, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* e *Treponema pallidum*. Segundo a OMS, outro patógeno que tem gerado muita preocupação é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que foi responsável por 480.000 novos casos de tuberculose multirresistente no ano de 2014 (WHO, 2016).

Um dos fatores mais preocupantes no aumento da resistência bacteriana é que o seu desenvolvimento em bactérias acontece em 2 ou 3 anos após a introdução de um novo antibiótico. Já o desenvolvimento, aprovação e produção de um novo antibiótico pode levar mais de 10 anos (Demain & Spizek, 2012). Assim, o desenvolvimento de novas terapias é urgente.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas em busca de alternativas eficazes de antimicrobianos. Dentre tais alternativas, podemos citar as enzimas para a edição de genes, bacteriófagos, vacinas, probióticos e os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Reardon, 2015). Esses últimos, devido ao amplo espectro de atividade, destacam-se como promissores candidatos e modelos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos.

2.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Michael Zasloff, no final dos anos 80, intrigado com a capacidade que a rã *Xenopus* tinha em sobreviver a procedimentos cirúrgicos não estéreis, começou a estudar a pele desses anfíbios e descobriu pequenos peptídeos secretados após sofrerem danos teciduais. Tais peptídeos tinham a capacidade de matar bactérias e receberam o nome de magaininas (Berkowitz, Bevins & Zasloff, 1990). Assim, foi descrita a primeira classe de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Esses peptídeos são formados por até 100 aminoácidos (Brown & Hancock, 2006), em geral apresentando tamanho reduzido (10 a 50 aa) (Kamysz *et al.*, 2003). Possuem também caráter anfipático e, em geral, carga global positiva (Zhang & Gallo, 2016). Por serem utilizados na defesa imune e na eliminação de

outros organismos competidores, todos os seres vivos são capazes de produzir PAMs (Nawrocki; Crispell; McBride, 2014).

Os peptídeos podem desempenhar diferentes funções, tais quais: antibióticas, neurotransmissoras, neuropeptídicas, toxinas, substratos de proteases, hormonais ou liberadoras destes (Machado *et al*, 2004). Há também diversos antibióticos de uso clínico produzidos a partir de peptídeos antimicrobianos, como bacitracina, colistina, polimixina B, daptomicina, vancomicina, gramicidina. Dentre as diversas características favoráveis para o emprego de PAMs, pode-se citar a maior dificuldade para o desenvolvimento de resistência microbiana, neutralização de endotoxinas e sinergismo com antibióticos convencionais (Giuliani *et al*, 2007; Pushpanathan *et al*, 2013).

Peptídeos antimicrobianos têm diferentes vias de síntese, podendo apresentar síntese induzida por infecções ou estímulo inflamatório ou síntese por expressão gênica constitutiva (Jenssen *et al.*, 2006). A síntese pode ser por via ribossômica, que ocorre em todas as espécies; esses peptídeos são precursores inativos e precisam de clivagem proteolítica para se tornarem ativos. Já os peptídeos resultantes de vias metabólicas especializadas apresentam modificações como glicosilação, adição de ácidos graxos e presença de aminoácidos não usuais (Hancock & Chapple, 1999).

2.2.1 Classificação dos peptídeos antimicrobianos

Os PAMs, além de diferentes rotas de síntese, possuem diferentes classificações baseadas no tamanho, composição de aminoácidos e estruturas conformacionais (Fosgerau, 2015).

Peptídeos aniônicos: fazem parte de diferentes órgãos vitais do corpo (cérebro, trato respiratório, sangue e trato gastrointestinal), também apresentam uma ampla gama de mecanismos antimicrobianos (Narayana & Chen, 2015). Correspondem a sequências curtas de aminoácidos, são negativamente carregados e geralmente necessitam de zinco como cofator (Brogden, 2005).

Peptídeos que formam α -hélice: apresentam até 40 resíduos de aminoácidos e em pH fisiológico são carregados positivamente; correspondem à categoria com o maior número de peptídeos descritos (Brogden, 2005). Em solução aquosa adotam um caráter anfipático. Porém, em ambiente não polar, como solventes ou membrana bacteriana,

formam uma estrutura α -helicoidal (Figura 1). A magainina é um representante desse grupo (Zhang; Gallo, 2016).

Peptídeos com resíduos de cisteína, formam ligações dissulfeto e folhas- β estáveis: em pH fisiológico podem ser carregados positivamente e negativamente, adquirem uma conformação anfipática em folha- β (Brogden, 2005).

Peptídeos ricos em aminoácidos específicos: não possuem resíduos de cisteína e são ricos em certos aminoácidos. São lineares e carregados positivamente em pH fisiológico. Tem caráter anfipático mantido, ainda que difiram nas conformações em α -hélice e folha- β (Brogden, 2005).

Figura 1. Exemplos de peptídeos antimicrobianos com distinção de estruturas secundárias: α -hélice, folha- β , PAMs mistos e PAMs estendidos.

Fonte: Autoria própria.

2.2.2 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

Mesmo com o grande volume de publicações nos últimos anos, PAM's ainda não tem seus mecanismos de ação completamente elucidados e, desde o final dos anos 80, foi sugerido que a atividade microbiana estaria associada à permeabilização da membrana plasmática (Lehrer *et al.*, 1989), sendo que diversos estudos foram publicados discutindo esta hipótese (Huang *et al.*, 2004; Brogde, 2005; Teixeira *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2019).

Sendo composta por fosfolipídeos, proteínas, lipídeos e esteróis, as membranas celulares definem os limites externos e controlam o transporte molecular entre os meios interno e externo. Por terem composições lipídicas diferentes, a interação entre PAMs e membranas depende principalmente do tipo de célula. Membranas bacterianas são compostas prevalentemente por fosfolipídeos aniônicos, enquanto que as membranas dos eucariotos são compostas por lipídeos zwitteriônicos como a fosfatidilcolina e seus análogos esfingomielina e fosfatidiletanolamina (Nelson & Cox, 2011). Presente na membrana dos eucariotos e ausente nos procariotos, o colesterol dificulta a interação dos PAM's com essas membranas, pois reduz a permeabilidade da membrana, aumentando o empacotamento lipídico (Benachir, et al., 1997; Allende & McIntosh, 2003).

Em contrapartida, estudos sugeriram que alguns PAMs podem inibir a síntese da parede celular, por interagir com proteínas e ácidos nucleicos, assim, os PAM's também podem agir sobre alvos intracelulares (brogden, 2005; Bozelli *et al.* 2012). Em 2005, Izadphanah e Gallo, propuseram um mecanismo de ação em que os peptídeos interagem com a carga aniônica das membranas dos microrganismos, sendo que a atração eletrostática seria responsável pela interação do peptídeo com a membrana bacteriana.

As propriedades físico-químicas que auxiliam na interação do peptídeo com as membranas celulares são (Jessen *et al.*, 2006):

- Hidrofobicidade – cadeias acilas presentes nos lipídios, podem interagir com resíduos hidrofóbicos dos peptídeos;
- Flexibilidade – o PAM muda sua conformidade de peptídeo livre em solução para peptídeo ligado na membrana;
- Interação eletrostática – peptídeos podem interagir electrostaticamente com lipídeos de carga oposta.

Diversos estudos têm sido feitos para elucidar os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos e alguns modelos foram propostos para entender como eles permeabilizam a membrana (Teixeira *et al.*, 2012). Esses modelos sugerem diferentes alterações na membrana, seja por afinamento, curvatura alterada ou formação de poros (Mojososka & Jenssen, 2015). A relação peptídeo:lipídeo é um fator que condiciona a interação e os mecanismo de ação dos peptídeos nas membranas. Se essa relação é baixa, frequentemente o PAM encontra-se paralelo à superfície da membrana, já o aumento dessa relação pode culminar na formação de poros e/ou canais na membrana, ou na sua desintegração (Yang *et al.*, 2001). Os modelos mais aceitos são:

- Modelo poro em barril (Figura 2b) – frequentemente, são peptídeos anfipáticos com estrutura em α -hélice que formam poros/canais aquosos transmembranares (Ehrenstein & Lecar, 1977). Nesse modelo, os peptídeos são inseridos de forma perpendicular e alinham-se lateralmente como tiras em um barril, no qual as regiões hidrofóbicas do peptídeo interagem com a membrana e as regiões hidrofílicas encontram-se voltadas para o interior dos poros (Mojsoska & Jenssen, 2015).
- Modelo poro toroidal (Figura 2c) – os peptídeos levam a uma indução da curvatura positiva da membrana, gerando energia de deformação desfavorável (Ludtke *et al.*, 1996). Dessa forma, os PAM's inserem-se perpendicularmente na membrana, sendo que regiões hidrofóbicas se ligam às porções hidrofóbicas dos fosfolipídeos e as regiões hidrofílicas se associam às cabeças dos fosfolipídeos e pela curvatura formam o poro (Mojsoska & Jenssen, 2015).
- Modelo carpete (Figura 2d) – os peptídeos têm atividade semelhante a detergentes, causando a formação de micelas e poros na membrana (Mojsoska & Jenssen, 2015). Isso acontece, porque os peptídeos recobrem a superfície como um carpete, e quando há uma concentração crítica de peptídeos na membrana ela se desestabiliza e leva à formação de micelas mistas (peptídeo+lipídeo) (Pouny *et al.*, 1992).

Figura 2. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas bacterianas. Interação inicial dos PAM's, modelo carpete, modelo em barril, modelo poro toroidal.

Fonte: Adaptado de Huang, Huang & Chen, 2009.

Peptídeos antimicrobianos, além de mecanismos de ação por formação de poros, podem agir em alvos intracelulares (Figura 3). Nesse caso, os PAM's exercem sua atividade antimicrobiana, depois que atravessam a membrana citoplasmática, seja por endocitose ou por meio de transportadores. Quando inseridos, os peptídeos prejudicam o funcionamento celular de diversas formas, podendo alterar a formação de septo na membrana citoplasmática, de ácidos nucleicos e de proteínas, inibindo as sínteses da parede celular, assim como podem reduzir também a atividade de enzimas (Brodgen, 2005). Nesse sentido, há PAMs que agem como inibidores de enzimas produzidas por alguns organismos patogênicos, e podem servir como pseudo-substratos ou ligação ao sítio ativo que impede o acesso ao substrato. As sequências de histidinas, por exemplo, são capazes de inibir uma proteinase semelhante à tripsina das bactérias *Bacteroides gingivalis* (Audreu & Rivas, 1998)

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos.

Fonte: Adaptado de Brodgen, 2005.

2.3 Peptídeos antimicrobianos de peçonhas

Atualmente, estão descritos no *The Antimicrobial Peptide Database* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) mais de 3000 diferentes PAMs, que podem ser encontrados em todos os reinos de seres vivos (Figura 4). Além disso, há também PAMs descritos por ferramentas de bioinformática (Wang *et al.*, 2016). Dentre esses, destacam-se os peptídeos contidos nas peçonhas de diversos animais, que podem ser empregados como protótipos no desenvolvimento de agentes terapêuticos contra bactérias patogênicas (Gomes *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013).

Figura 4. Fontes de peptídeos antimicrobianos (total de 3197).

Fonte: The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/>, acesso em 8 de julho de 2020.

A partir dos venenos, vê-se a possibilidade do desenvolvimento de novos fármacos para diversas condições patológicas. O captopril, por exemplo, é um dos fármacos mais vendidos em todo o mundo, sendo originado a partir de alterações estruturais em molécula peptídica extraída da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* (Ji & De Lima, 2012). Com os lucros elevados que esse medicamento rendeu à indústria farmacêutica, pesquisadores do mundo todo voltaram a atenção para pesquisas com peçonhas (Ireno, 2009). Ainda nesse contexto, há nos venenos mais de 40 milhões de toxinas peptídicas, que podem ter diferentes atividades biológicas em diversos organismos (Venomics, 2012).

Nos últimos anos, os venenos de escorpiões têm sido reconhecidos por apresentarem uma grande oferta de PAM's. Esses venenos consistem em misturas complexas de moléculas bioativas (Zhao, Ma et al., 2009). Hernandez-Aponte et al. (2011), apontam que a presença de PAM's poderia proteger as glândulas de veneno contra infecções microbianas e potencializar a ação de outras neurotoxinas.

Peptídeos presentes nos venenos escorpiônicos podem ser divididos em dois grupos, os peptídeos sem pontes dissulfeto (PSPDs) e os peptídeos com pontes de dissulfeto (PPDs) (Zeng; Corzo; Hahin, 2005). PSPDs normalmente são curtos (13-56 resíduos de aminoácidos), apresentam estrutura helicoidal e são relativamente hidrofóbicos. Já os PPDs, estão relacionados à atividade neurotóxica da peçonha e atuam

bloqueando ou reduzindo o potencial de ação de canais iônicos (Almaaytah & Albalas, 2014).

2.3.1 Lunatina-1

Entre os diversos PAMs estudados a partir de peçonhas, dá-se destaque à lunatina-1, identificada a partir do veneno do escorpião *Hadruroides lunatus* (Santana, 2012). A lunatina-1 é um peptídeo de 13 resíduos de aminoácidos, massa molecular 1441 Da. A mesma ainda é pouco estudada e por isso seu estudo científico é tão importante. Apresenta sequência de aminoácidos Phe-Ile-Gly-Gly-Leu-Leu-Lys-Thr-Leu-Thr-Ser-Phe-Phe-NH₂ sendo, dessa forma, um peptídeo relativamente hidrofóbico.

Em testes *in vitro*, esse peptídeo inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp coagulase-negativo*. A concentração inibitória mínima variou de 1,49 a 5,95 µM. Já para as bactérias Gram-negativas a menor concentração inibitória da lunatina-1 para a *Escherichia coli* foi de 23,80 µM e para a *Pseudomona fluorescens* foi de 47,80 µmol/L (Santana, 2012). Neste mesmo estudo, o pexiganan (primeiro PAM submetido ao desenvolvimento comercial), por sua vez, apresentou valores de CIM de 11,76 µM para *E. coli* e 5,88 µM para *S. aureus* valores estes que estão bem próximos aos apresentados pela lunatina-1.

Em um estudo mais recente do grupo do Professor Adriano Pimenta, da Universidade Federal de Minas Gerais, o efeito da lunatina-1 foi investigado frente a amostras de referência de micro-organismos associados às IRAS como *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida lusitanae*, e cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ao final dos testes foi possível confirmar as características antimicrobianas da lunatina-1 e concentrações de 4 a 8 µg.mL⁻¹ (2,7 e 5,5 µM, respectivamente) do peptídeo foram capazes de inibir o crescimento de células planctônicas (Santana, 2012). A partir desses resultados, pode-se corroborar a capacidade da lunatina-1 como um eficaz PAM.

Tendo uma estrutura α -helicoidal (Figura 11) e com poucos resíduos de aminoácidos, a lunatina-1 pode ser comparada a outros peptídeos curtos como a temporina-SHF, um PAM isolado da pele do sapo *Pelophylax saharica* e até o momento o menor peptídeo antimicrobiano com apenas oito resíduos de aminoácidos. A temporina-SHF também possui estrutura α -helicoidal altamente hidrofóbica (FFFLSRIFa), apresentando maior porcentagem de fenilalanina que qualquer outro peptídeo conhecido.

A temporina-SHF possui forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, com um CIM de 12,5 μM para *S. aureus* ATCC 25923, 50 μM para *E. faecalis* ATCC 29212 e 3 μM para *Bacillus megaterium*, e não se apresenta citotóxica contra eritrócitos humanos ($\text{HC}_{50} = 200 \mu\text{M}$), (Abbassi et al., 2010).

Uma estratégia que vem sendo constantemente empregada é a substituição de resíduos para melhorar a atividade antimicrobiana ou diminuir a citotoxicidade. A modificação de aminoácidos nas sequências de PAMs por seus enantiômeros ou β -aminoácidos resulta em redução da hidrólise e aumento da estabilidade, levando à melhor incorporação na membrana e assim influenciando na atividade biológica (Castro *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). A substituição de resíduos neutros (Ala e Ile) por resíduos carregados positivamente (Arg e Lys) também foi estudada para o PAM AR-23, sendo que essa substituição na face não polar do peptídeo diminuiu sua hidrofobicidade e penetração em eritrócitos, assim diminuindo a atividade hemolítica sem afetar de forma drástica a atividade antimicrobiana (Zhang et al., 2016).

A mesma estratégia foi aplicada para estudar o papel de aminoácidos hidrofóbicos no peptídeo C18G. A estrutura secundária não sofreu grandes alterações apesar as substituições, mas foi possível correlacionar a atividade bacteriana a modelos de membranas lipídicas e as variantes que continham Leu e Phe tiveram maior afinidade em se ligar na camada e assim tiveram maior atividade antimicrobiana. O estudo conclui que ter porções hidrofóbicas nas sequências de PAMs tem papel fundamental na capacidade do peptídeo se ligar à membrana e manifestar atividade bactericida (Saint Jean et al., 2018).

PAMs em geral, incluindo a lunatina-1, apresentam rápida degradação proteolítica no trato gastrointestinal e na corrente sanguínea, tornando o tempo de meia-vida e a administração (por via oral ou parenteral) fatores limitantes. Dentre as estratégias para evitar a degradação de estruturas peptídicas, podemos citar as nanoestruturas como lipossomos, hidrogéis, nanocápsulas etc. (Roy, Franco, Mandal, 2013), bom como a PEGuilação ou conjugação ao poli(etilenoglicol) (Hans & Lowman, 2002). Portanto, a PEGuilação da lunatina-1 traria significativo aumento de estabilidade e, adicionalmente, solubilidade, o que também facilitaria sua avaliação antimicrobiana.

2.4 PEGuilação

Tendo sido relatada pela primeira vez em 1977, por Abuchowski, a PEGuilação (Figura 5) consiste na ligação covalente de cadeias de poli(etilenoglicol) (PEG) a proteínas e, mais recentemente, outras moléculas (Abuchowski *et al.*, 1977). As proteínas e peptídeos PEGuilados, em linhas gerais, são caracterizados por: (i) maior tamanho e volume hidrodinâmico, o que desacelera o rápido *clearance* renal e, consequentemente, prolonga a meia-vida *in vivo*; (ii) prevenção da imunogenicidade da molécula à qual o PEG está conjugado tanto por diminuição da frequência de dosagem (maior meia-vida) quanto por menor exposição de epítomos imunogênicos; (iii) proteção contra a degradação *in vivo* (proteases e endocitose) que tem como consequência também o aumento de sua meia-vida, (iv) aumento da solubilidade em água e redução da formação de agregados devido à repulsão estérica entre as superfícies peguiladas e (v) aumento da estabilidade térmica e mecânica (Zhang et al., 2012; Veronese, Pasut, 2012; Pfister, Morbidelli, 2014; Roque et al., 2015).

O polímero polietilenoglicol tem seu uso muito difundido no campo farmacêutico devido às características únicas em relação a polímeros semelhantes (Veronese, Pasut, 2012). É um polímero solúvel em água e em alguns solventes orgânicos, a sua excreção e de seus conjugados é feita majoritariamente por *clearance* renal e a toxicidade observada em estudos com coelhos (vacuolização nas células epiteliais do túbulo renal proximal) foi obtida apenas com dosagens muito elevadas em relação ao empregado em formulações comerciais, além de parecer ter mais relação com a administração de conjugados proteína-PEG do que com a própria molécula de PEG (Veronese, Pasut, 2012).

Figura 5. Representação das vantagens de um peptídeo ou proteína peguilada.

Fonte: Adaptado de Kang *et al*, 2009.

Um derivado de PEG ativado usado para a reação de PEGuilação tem duas extremidades com características únicas. Uma delas atua como ligante seletivo a resíduos específicos na superfície de peptídeos e proteínas, enquanto a outra é livre e permanece exposta à solução. Esta última apresenta nenhuma ou diferente reatividade em relação à extremidade “conectora” (Zhang *et al.*, 2012). Essa estrutura de PEG monofuncionalizada é normalmente preferida por não ligar duas moléculas de proteína/peptídeo a uma mesma cadeia de polímero. A extremidade conectora, também chamada de porção ativa, é escolhida dependendo da disponibilidade dos grupamentos reativos presentes na proteína (Pfister, Morbidelli, 2014). O metóxiPEG (ou monometóxi-PEG) (Ginn *et al.*, 2014) contendo um grupo reativo na outra extremidade é o derivado de PEG empregado em todos os produtos PEGuilados aprovados atualmente, seja na sua forma linear ou ramificada, devido à baixa toxicidade metabólica *in vivo* e à facilidade de ativação (Santos *et al.*, 2018).

Como já mencionado, a PEGuilação de PAMs pode prolongar a meia-vida no plasma, proteger de proteólise, melhorar a estabilidade, solubilidade, biocompatibilidade e resistência, além de diminuir a imunogenicidade. Contudo, PAMs PEGuilados podem ter sua conformação modificada e o local de ligação ativo do PAM mascarado, levando à perda de atividade antimicrobiana. A escolha tamanho da cadeia de PEG (massa molecular) também é importante, pois cadeias muito curtas podem levar à perda de especificidade, e cadeias muito longas podem levar à perda de atividade biológica por encobrirem o domínio bioativo do PAM (Hamley, 2014; Christian *et al.*, 2004; Turecek *et al.*, 2016).

As condições reacionais de PEGuilação também consistem em fator importante, sendo essencial definir um protocolo de pH, tempo de reação e proporção molar (entre PEG e peptídeo) para cada PAM (González-Valdez, Rito-Palomares & Benavides, 2012). Assim, diversas pesquisas vêm sendo feitas para superar as limitações de PAMs peguilados, como mudanças nas estratégias de PEGuilação por: diferentes tipos de PEG (ramificado ou linear), massa molecular do PEG e estudo de diferentes sítios de PEGuilação (Zhang *et al.*, 2014; Obuobi *et al.*, 2018).

As reações de PEGuilação evoluíram do acoplamento aleatório, que resultava em misturas de conjugados com dificuldade de reprodução e compostos com propriedades diferentes entre si, para as reações sítio-dirigidas, que têm o objetivo de fornecer produtos mais homogêneos e potencialmente mais eficazes (Veronese, Pasut, 2012; Ginn *et al.*, 2014). A PEGuilação pode ser direcionada para diferentes sítios proteicos (Figura 6) (Santos *et al.*, 2018), tais como:

- PEGuilação de grupos ϵ -aminos – estão presentes na superfície da maioria das proteínas terapêuticas, como resíduos de lisinas, sendo este o tipo de PEGuilação mais estudado.
- PEGuilação de grupos tiol – PEGuilação sítio-específica, desde que a conjugação covalente seja possível; geralmente tem uma baixa redução da atividade proteica.
- PEGuilação de ponte dissulfeto –sítio de PEGuilação atraente, principalmente, para suprir a falta de cisteínas livres nas proteínas. A ligação dissulfeto é clivada, e duas cadeias de PEG são adicionadas.

- PEGuilação enzimática – essa PEGuilação sítio-específica é baseada na reação de transferência da acila catalisada por transglutaminase entre resíduos de glutamina e o grupo amina de PEGs reativos
- PEGuilação *N*-terminal – é baseada na diferença de pK_a entre os grupamentos aminícos dos resíduos de lisina e o grupamento aminíco *N*-terminal das proteínas.

Figura 6. Possíveis sítios para a PEGuilação proteica.

Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2018.

A estratégia de PEGuilação *N*-terminal apresenta-se como uma alternativa mais específica e envolve a conjugação de uma molécula de PEG à cada terminação amínica do peptídeo/proteína, baseando-se nas diferenças entre os pK_a s dos diferentes grupamentos amínicos (Veronese, Pasut, 2005). A PEGuilação sítio específica *N*-terminal ocorre por reação de substituição nucleofílica acídica, produzindo ligações amida estáveis em pH de 7 a 9. Os resíduos de aminas primárias em sequências peptídicas em geral apresentam valores de pK_a de aproximadamente 10,5, enquanto que o *N*-terminal apresenta valores de pK_a de aproximadamente 7,6 (Roberts et al., 2002).

Sabe-se que o valor de pH determina a nucleofilicidade dos nucleófilos (por exemplo, os grupamentos ϵ -amino). O ataque nucleofílico tem lugar quando o pH de operação é próximo ou superior ao valor de pK_a do grupo amínico do aminoácido em questão. Dado que o carbono carbonílico do grupo éster do PEG reativo deve reagir

preferencialmente com grupamentos amínicos desprotonados, a reação realizada em valores de pH entre 7,6 e 9,5 deve favorecer a PEGuilação sítio-específica *N*-terminal, uma vez que nesse intervalo de pH os resíduos de lisinas encontram-se prevalentemente protonados. Tendo isso em vista e o fato de a lunatina-1 apresentar somente uma lisina ($pK_a = 10,54$) em sua sequência, a PEGuilação *N*-terminal apresenta-se como estratégia interessante para o aumento da meia-vida desse peptídeo, assim como sua solubilidade ao torná-lo mais hidrofílico, com a possibilidade de preservar a atividade antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a PEGuilação do peptídeo lunatina-1 empregando-se PEG de 2 kDa, visando melhorar as propriedades farmacocinéticas do peptídeo, assim como avaliar o potencial do peptídeo PEGuilado como agente antimicrobiano. Para alcançar esse objetivo, as seguintes etapas foram propostas:

- 1- Estudos iniciais com a lunatina 1, para compreensão de suas características estruturais e interação com membranas.
- 2- Estudos da interação do peptídeo com membranas.
- 3- Estudo da reação de peguilação: determinar a proporção adequada de PEG:lunatina-1 para a reação de PEGuilação *N*-terminal empregando-se PEG reativo de 2 kDa.
- 4- Estabelecimento de protocolo de purificação do peptídeo PEGuilado.
- 5- Estudos de estabilidade e caracterização estrutural do peptídeo PEGuilado por espectrometria de massas.
- 6- Determinação do potencial hemolítico da lunatina-1 livre e PEGuilada.
- 7- Determinação da atividade antimicrobiana da lunatina-1 em sua forma livre e conjugada ao PEG frente às cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* e CECT 239 de *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Para o desenvolvimento do projeto, a lunatina-1 utilizada teve sua sequência de aminoácidos cedida pelo Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta da Universidade Federal de Minas Gerais, colaborador do projeto. A lunatina-1 foi sintetizada pelo pesquisador da EMBRAPA/DF Dr. Marcelo Porto Bemquerer e purificada no Instituto Biológico (IB/SP) pela pesquisadora Dra. Sumika Kiyota e Dr. Marcos Alejandro Sulca López. O polímero metoxi-poli(etilenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil (mPEG-NHS) de 2 kDa foi adquirido da Nanocs (New York, NY). O sangue de carneiro desfibrinado foi obtido da empresa CECON (São Paulo, SP). Todas as soluções foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau HPLC, quando necessário.

4.2. Purificação da lunatina-1 sintetizada

A purificação do peptídeo foi realizada no Instituto Biológico (IB/SP) por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) em cromatógrafo Shimadzu, que consiste de um Sistema Controlador SCL-10A VP, duas bombas LC-10AD VP, um detector UV-Vis SPD-10A VP, um injetor de amostras manual, e uma coluna C₁₈ Shimadzu semi-preparativa (20x250 mm, 5 µm de diâmetro de partícula, 100 Å de diâmetro de poro) equilibrada com o Solvente A (ácido trifluoracético - TFA 0,1% em água). O registro dos perfis cromatográficos foi feito usando o software LabSolutions (Shimadzu). A purificação foi feita usando o solvente A e o solvente B (0,09% TFA/ACN) em gradiente linear de 5-95% do solvente B por 30 min com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção foi a 254 e 280 nm. Previamente, foi feita uma cromatografia sem injeção de peptídeo nas mesmas condições experimentais (branco). Para confirmação da estrutura do peptídeo purificado empregou-se espectrometria de massa no Espectrômetro Bruker UltraFlex III no IB.

4.3. Estudo *in silico*

O software PepCalc.com (Peptide Property Calculator) © 2017 Sam Lear foi empregado para estimar algumas propriedades da lunatina-1, tais como: massa molecular, solubilidade, ponto isoelétrico e volume molecular. Para a representação da estrutura helicoidal da lunatina-1, os softwares Pymol (Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC) e I-TASSER 5.1 foram empregados.

4.4. Ensaios de supressão de fluorescência da lunatina-1

A luminescência é a emissão de fótons com energia na região do UV, visível ou infravermelho, esse fenômeno acontece quando a absorção de uma onda eletromagnética promove transições eletrônicas, e leva os elétrons a um estado de maior energia ou excitado, assim, o retorno do elétron ao estado fundamental pode ser radioativo com a emissão de fótons. A fosforescência e fluorescência são casos particulares da luminescência, o modo de excitação é a absorção de um fóton, que absorve para um estado eletrônico excitado (Valeur, 2001). A fluorescência ocorre quando o estado excitado é singlete (S_1) e o decaimento e emissão do fóton ocorrem em alta taxa, na ordem de $10^9 s^{-1}$. Já se o estado excitado é o tripleto (T_1) e o decaimento e emissão de fóton ocorrem em uma taxa menor, na ordem de $10^3 s^{-1}$, tem-se a fosforescência (Figura 7) (Lakowicz, 1999).

Figura 7. Diagrama de Jablosky com níveis de energia.

Fonte: Adaptado de <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>

As medidas de fluorescência foram realizadas em colaboração com o Prof. Leandro Ramos Souza Barbosa e a MSc. Juliana Raw utilizando o fluorímetro, marca Varian modelo Cary Eclipse, presente no laboratório de Biofísica no Instituto de Física da USP, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Lamy. Para isso, foram realizadas duas reações de PEGuilação: (F1) correspondendo à proporção molar de 1:10 de lunatina-1:PEG 2 kDa, e (F2) correspondendo à proporção molar de 1:5 de lunatina-1:PEG 2 kDa, para assim conseguir visualizar a interação PEG:Peptídeo. Foi analisada também uma solução de 1 mg/mL de lunatina-1 em tampão fosfato pH 8,5 (mesmo tampão usado nas reações e mesma massa de peptídeo) para comparar com as reações e assim estudar o efeito de supressão do PEG. As amostras foram excitadas em 250 nm e com tensão de 800 v, a cubeta de quartzo usada tinha 10mm x 2 mm. A massa da lunatina-1 (1 mg/mL) foi a mesma na reação e nas amostras purificadas. As reações de PEGuilação não estavam purificadas, porém componentes como o PEG e a hidroxilamina não emitem fluorescência.

4.5. Efeito da lunatina-1 em modelos de membrana

A fim de compreender melhor a interação da lunatina-1 com modelos de membrana, foi estudado o efeito do peptídeo na integridade de vesículas lipídicas. Por meio de medidas de fluorescência, determinou-se o vazamento de sondas fluorescentes incorporadas em lipossomos, que acontece com a permeabilização destes. Um dos sistemas modelos mais estudados é a mistura ternária de esfingolipídios, fosfatidilcolinas e colesterol, o estudo de membranas contendo esses três componentes foi amplamente estudado experimentalmente e teoricamente, pois estão em grande quantidade nas membranas de células eucarióticas (Van Meer, Voelker & Feigenson, 2008; Frazier *et al.*, 2007). Para o ensaio, foram empregados lipossomos de 40% POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina), 40% colesterol e 20% esfingomielina.

Os lipossomos foram preparados pela metodologia de hidratação do filme lipídico. Resumidamente, os lipídeos foram solubilizados em clorofórmio e a solução resultante submetida à evaporação por fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente e sob rotação, para que o filme lipídico não ficasse concentrado no fundo do tubo de ensaio mas sim devidamente disperso. Em seguida, o filme de lipídeos formado foi hidratado com tampão fosfato pH 8,5 (concentração final de lipídeos 100 µM) contendo 1 mM do fluoróforo PTS (1,3,6,8-pyrenetetrasulfonictetrasodium). As vesículas foram extrusadas cerca de 31 vezes em filtro de 100 nm no Instituto da Física.

A supressão da fluorescência foi determinada pelo metil viologênio adicionado aos sistemas (2mM), o qual leva à supressão da fluorescência do PTS liberado (extravasado) das vesículas caso a lunatina-1 comprometa a integridade da membrana dos lipossomos seguindo o protocolo de Mattei *et al.*, 2017.. A concentração de lunatina-1 variou de 0 a 690 µM (0; 0,2; 0,5; 1; 10; 20; 40; 90; 170; 340; 690 µM).

Para calcular a porcentagem de vazamento utilizamos a equação (Mattei *et al.*, 2017):

$$Integridade (\%) = 100 \frac{(F)}{(F_0)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que F₀ corresponde aos valores de fluorescência medidos sem a lunatina-1 (0% de vazamento) e F é a intensidade medida com adição de lunatina-1.

4.6. PEGuilação N-terminal da lunatina-1

A reação de PEGuilação da lunatina-1 foi efetuada utilizando o PEG reativo (mPEG-NHS 2kDa), por meio de uma reação de substituição nucleofílica acíclica em que a amina primária N-terminal do peptídeo realiza um ataque ao carbono carbonílico do PEG reativo. Foram preparadas soluções de 1 mg/mL de lunatina-1 em tampão PBS 100 mM (pH = 8,5), às quais foram adicionadas quantidades de mPEG-NHS de 2 kDa, na proporção PEG:peptídeo de 10:1 (R1) e 15:1 (R2). A reação é conduzida sob agitação magnética a 22 °C, durante 1 hora. Em seguida, adiciona-se 10% (v/v) hidroxilamina 0,2 M à mistura reacional de modo a clivar qualquer sítio instável de PEGuilação que tenha sido formado no peptídeo. O sistema é mantido sob agitação por mais 2 minutos. O rendimento de PEGuilação foi estimado por HPLC usando a coluna analítica (C 18 Shimadzu, dimensões: 4.6x150 mm, diâmetro das partículas 5 µm, diâmetro dos poros: 100 Å)

4.7. Purificação lunatina-1 monoPEGuilada

A purificação da lunatina-1 peguilada foi realizada por cromatografia em fase reversa em cromatógrafo HPLC da marca Shimadzu que consistem de um Sistema Controlador SCL-10A VP, duas bombas LC-10AD VP, um detector UV-Vis SPD-10A VP, um injetor de amostras manual, e uma coluna analítica (C 18 Shimadzu, dimensões: 4.6x150 mm, diâmetro das partículas 5 µm, diâmetro dos poros: 100 Å) que foi

equilibrada com o Solvente A (TFA 0,1 %). O perfil de eluição dos peptídeos foi monitorado por absorvância no UV a 254 nm, com coleta de frações de 1 mL e quantificação da concentração de peptídeo nas frações. Para todas as reações, a purificação foi realizada usando o solvente A (TFA 0,1 %) e o solvente B (0,09% TFA/ACN) em gradiente linear de 5-95 % do solvente B por 15 min com fluxo de 3 mL.min⁻¹. A detecção foi a 220 e 254 nm. Foi também feita uma cromatografia sem injeção das amostras nas mesmas condições experimentais (branco). O rendimento das reações A caracterização dos peptídeos purificados foi determinado por espectrometria de massa (MALDI/TOF).

4.8. Espectrometria de Massa – MALDI/TOF

A dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) acoplada ao tempo de voo (TOF) foi usada para determinar a posição da PEGuilação. As amostras de peptídeos com e sem PEG foram tratadas inicialmente com ditioneitol (DTT) 10 mM para reduzir as ligações dissulfeto e alquiladas com iodoacetamida 55 mM para bloquear os tióis redutores. Posteriormente, a tripsina foi adicionada a cada amostra de proteína na proporção 1:50 de enzima: proteína. A reação enzimática foi bloqueada com 1% de TFA e os peptídeos tripticos foram dessalinizados usando micro-colunas R3 como relatado anteriormente (Fernandes *et al.*, 2017). Os digestos tripticos foram co-cristalizados com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 30:70 [v / v] (acetonitrila: TFA a 0,1% em água) a uma concentração de 10 mg / mL. Os espectros de MS foram adquiridos no modo de íon positivo de refletor em uma faixa de 300 a 4000 m / z. A calibração externa foi realizada para todos os espectros. Os arquivos mzXML foram processados usando o software Mass-Up (Lopez-Fernandez *et al.*, 2015). Os espectros MALDI-TOF MS foram processados usando subtração da linha de base e suavização. Posteriormente, os espectros de MS foram sobrepostos para avaliar a intensidade do sinal dos peptídeos tripticos obtidos da lunatina-1 nativa e PEGuilada com PEG 2 kDa.

4.9. Determinação da atividade antimicrobiana

Neste ensaio foram utilizadas três cepas, duas Gram-negativas (ATCC 25922 de *Escherichia coli* e ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa*), e uma Gram-positiva (CECT 239 de *Staphylococcus aureus*). O meio de cultivo sintético Müller Hinton (MH) foi preparado de acordo com a recomendação do fabricante para cultivo das cepas bioindicadoras. Tais meios de cultura foram hidratados com água destilada,

homogeneizados com auxílio de agitador magnético e posteriormente autoclavados a 121°C por 15 minutos. As cepas armazenadas em glicerol a -80 °C foram reativadas em meio de cultivo MH. No início de cada experimento, cada cultura foi reativada em meio MH por 12 h a 37 °C. Após a ativação, uma alíquota da cepa foi transferida para 5 mL do meio de cultura MH. Este meio foi incubado a 37 °C, após o crescimento foi preparado um inóculo padronizado em 10^5 UFC.mL⁻¹ baseando-se na leitura da densidade óptica a 600 nm. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em placa de ELISA (96 poços) conforme as normas estabelecidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2003). Para isso, o inóculo foi padronizado para atingir uma população final de 10^5 UFC.mL⁻¹. Em seguida, 50 µL deste inóculo foram adicionados a 100 µL de meio Müeller-Hinton, por fim, adicionou-se 50 µL de amostra (lunatina-1 livre ou peguilada, em diferentes concentrações). A lunatina-1 livre foi dissolvida em 5% DMSO e testada nas concentrações de 173,5 µmol.L⁻¹ a 0,084 µmol.L⁻¹. Já para a lunatina-1 peguilada as concentrações testadas foram de 140,3 µmol.L⁻¹ a 0,06 µmol.L⁻¹. Como controle negativo de atividade, empregou-se somente a cepa em estudo (inóculo + meio), o meio reacional da PEGuilada (inóculo + meio + meio reacional sem lunatina-1), e o controle de DMSO (inóculo + meio + tampão + DMSO 5%). Como controle positivo, empregou-se o antibiótico ampicilina a 1mg/mL (inóculo + meio + antibiótico). O teste foi realizado em triplicata e as microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Antes de incubar e após o período de incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro visível em 600 nm. O CIM é determinado como o valor da menor concentração que inibiu por completo o crescimento bacteriano a 37° C por 24 h.

4.10. Determinação do potencial hemolítico da lunatina-1 livre e PEGuilada

O efeito da lunatina-1 livre e PEGuilada na integridade das membranas dos eritrócitos foi investigado pelo ensaio de hemólise *in vitro*, no qual a toxicidade da lunatina-1 foi medida pela liberação de hemoglobina dos eritrócitos (Rangel-Yagui *et al.*, 2007). Os sistemas foram preparados com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado e concentrações crescentes da lunatina-1 ou lunatina-1 PEGuilada (5 µg/mL – 1000 µg/mL) a partir de solução estoque. Para a lunatina-1 livre, adicionou-se 5% de DMSO. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho termostático a 37°C durante uma hora, com agitação suave a cada 10 minutos. Passado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 905.58xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. A hemoglobina liberada no sobrenadante foi medida por análise espectrofotométrica a 540 nm ($A_{amostra}$). As

absorbâncias das amostras foram comparadas com os controles, como controle negativo foi empregada solução salina (A_{salina}), que representa 0% de hemólise, e como controle positivo água destilada ($A_{\text{água}}$), que representa 100% de hemólise. Os dados da hemólise foram apresentados como a porcentagem da hemólise segundo a equação 2. Os valores são relatados como média $\pm$ desvio padrão, sendo os ensaios realizados em triplicata.

$$\% \text{ Hemólise} = 100 \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{salina}}}{A_{\text{água}} - A_{\text{salina}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação do Peptídeo sintetizado

A lunatina-1 foi sintetizada empregando-se metodologia de síntese em fase sólida, sendo necessário realizar a purificação por cromatografia de fase reversa e caracterizar o peptídeo. Como pode ser observado na Figura 8, o tempo de retenção da lunatina-1 foi 20,426 min, enquanto que impurezas encontradas em menor quantidade apresentaram tempos de retenção de 17,975, 18,888 e 27,250 min.

Figura 8. Cromatograma do peptídeo lunatina-1 bruto (1,0 mg/mL) por RP-HPLC, empregando-se gradiente linear.

Após a coleta das frações correspondentes à lunatina-1, a detecção foi a 220 e 254 nm, sendo que o peptídeo purificado apresentou o tempo de retenção de 7,505 min com um grau de pureza de 99,9% (Figura 9). O método cromatográfico é o mesmo assim como a fase móvel usada, mas o gradiente do solvente foi modificado, sendo o fluxo aumentado a fim de diminuir o tempo corrida, pois a amostra encontrava-se pura.

Figura 9. Cromatograma (RP-HPLC, gradiente linear) do peptídeo lunatina-1 purificado (1,0 mg/mL).

5.2. Estudo *in silico*

Tendo em vista que a lunatina-1 é pouco estudada, um estudo computacional foi realizado para determinação das propriedades físico-químicas do peptídeo. Empregando-se o software PepCalc.com (Peptide Property Calculator), obtivemos o pI = 9,9, assim como carga global +1 em pH 7. Também foi calculado o volume molecular (V), que pode ser estimado a partir da massa molecular (MM) do peptídeo e um volume específico parcial que corresponde à relação entre o volume e a massa molecular (Equação 3). A média dos volumes específicos parciais é determinada experimentalmente para proteínas globulares, e é de aproximadamente 0,73 cm³/g (média dos valores de 13 proteínas solúveis). Este valor varia de proteína para proteína, mas a faixa é bastante estreita, entre 0,70 e 0,75 cm³/g (Harpaz, Gerstein & Chothia, 1994). Dessa maneira, obtivemos um volume molar de 1747 Å³ para a lunatina-1.

$$V = \frac{0,73 \times 10^{-24} \times MM}{6,02 \times 10^{23}} \quad (\text{Eq. 3})$$

A partir do desenho da molécula de lunatina-1 no software Pymol, o comprimento da cadeia hidrofóbica estendida do peptídeo peguillado (l_c) foi estimado em 47,7 Å (Figura 10).

Figura 10. Representação da molécula da de lunatina-1.

Como mencionado anteriormente, a lunatina-1 é um peptídeo predominantemente hidrofóbico e, portanto, a ligação covalente do PEG de 2000 Da resulta em uma molécula anfifílica. Para averiguar a possibilidade da lunatina-1 peguillada formar micelas poliméricas em meio aquoso, o parâmetro crítico de agregação (CPP) foi estimado. O padrão de agregação de moléculas anfifílicas pode ser estimado com base no parâmetro crítico de agregação ou *critical packing parameter* (CPP), de acordo com a equação a seguir (Israelachvili, 1976):

$$CPP = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (\text{Eq. 4})$$

em que v é o volume ocupado pela cauda apolar (nesse caso equivalente ao volume V da molécula de lunatina-1), a_0 corresponde à área da seção transversal da cabeça polar e l_c ao comprimento do grupamento hidrofóbico (ou seja, da lunatina-1). A Tabela 1 apresenta a relação observada entre CPP e o formato do agregado resultante.

Tabela 1 – Relação observada entre o parâmetro crítico de agregação CPP, o formato do monômero e o formato do agregado resultante. v é o volume ocupado pela cauda apolar, a_0 é a área da seção transversal da cabeça polar e l_c o comprimento do grupamento hidrofóbico.

Parâmetro crítico de agregação (v/a_0l_c)	Formato da molécula	Estruturas formadas
$< 1/3$	Cone	Micelas esféricas
$1/3 - 1/2$	Cone truncado	Micelas cilíndricas
$1/2 - 1$	Cone truncado	Bicamadas flexíveis/vesículas
~ 1	Cilindro	Bicamadas planas
> 1	Cone truncado invertido	Micelas reversas

Fonte: Adaptado de Israelachvili, 2011.

Para calcular o valor de a_0 , nos baseamos no volume do PEG de 2000 Da hidratado (Ling; Jiang & Zhang, 2013) e estimamos o raio da esfera correspondente ao PEG hidratado (que forma a cabeça polar da molécula anfifílica de lunatina-1 peguilada), empregado a equação que define o volume de uma esfera. Desta maneira, empregando-se o valor do raio na equação do círculo que corresponde à área da seção transversal da cabeça polar de PEG (com área de $16,02 \text{ \AA}^2$), obtivemos uma área de $3223 \text{ \AA}^2$. Por fim o CPP calculado foi 0,011, podendo afirmar que as moléculas de lunatina-1 peguilada poderiam apresentar formato de cone e, caso ocorra auto-agregação, as estruturas

formadas serão preferencialmente micelas esféricas. A seguir é apresentada a estrutura da lunatina-1 em alfa-hélice, obtida no programa I-TASSER (Figura 11).

Figura 11. Representação da estrutura α -hélice da lunatina-1.

5.3 Supressão da fluorescência da lunatina-1 pelo PEG

Características da fluorescência de uma molécula (espectro, tempo de vida do estado excitado, comprimento de onda de máxima emissão e rendimento quântico) são dependentes de sua estrutura química e podem ser afetados por qualquer processo do estado excitado. Portanto, a influência do microambiente na fluorescência confere a possibilidade de moléculas fluorescentes serem usadas como sondas em estudos de sistemas biológicos. Sondas fluorescentes podem ser divididas em 3 tipos (Valeur, 2001):

- Sondas intrínsecas, são as ideias, mas não há muitas. Um exemplo é a sonda de triptofano.
- Sondas extrínsecas associadas
- Sondas extrínsecas covalentemente ligadas.

Podendo ocorrer por uma grande variedade de processos, a diminuição da intensidade de fluorescência é chamada de supressão da fluorescência, e se refere a qualquer processo que diminua a intensidade da fluorescência em uma molécula (Lakowicz, 2006). A supressão da fluorescência pode trazer diversas informações sobre a interação do fluoróforo com seu supressor e assim poder investigar interações de diferentes moléculas. Dois tipos de supressão amplamente estudadas são a supressão dinâmica e a supressão estática.

Nas duas supressões é necessário o contato da molécula entre o fluoróforo e o supressor. A supressão dinâmica ocorre quando o fluoróforo que está no estado excitado

é desativado pelo contato de um supressor em solução, assim não ocorre alteração química. Já a supressão estática ocorre quando o fluoróforo que está no estado excitado retorna ao estado fundamental através da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor (Figura 12) (Lakowicz, 2013).

Figura 12. Ilustração dos efeitos das supressões dinâmica e estática. O círculo amarelo representa o fluoróforo em seu estado fundamental, o círculo verde representa o fluoróforo em seu estado excitado e em laranja representa o supressor.

Fonte: Raw, 2016.

Entre os biopolímeros, alguns peptídeos apresentam fluoróforos intrínsecos. São três os aminoácidos responsáveis por essa fluorescência, os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais possuem espectros distintos (Figura 13).

Figura 13. Espectro de absorvância (A) e fluorescência (F) dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa de pH 7.

Fonte: Lakowicz, 2013.

A lunatina-1 tem três resíduos de fenilalanina, assim o espectro de fluorescência é centralizado em uma única região. Como não existem estudos de fluorescência para a lunatina-1, consideramos importante estudar a influência e as interações do PEG com esse peptídeo. Mudanças no meio podem causar o deslocamento de espectro de fluorescência, principalmente na posição do pico de máxima emissão. Nesse sentido, quando o meio se torna mais apolar e a energia para o rearranjo das moléculas é menor, a energia emitida pelo fóton poderá ser maior ou com o comprimento de onda menor; esse efeito é chamado de *blue-shift*. Já no efeito *red-shift*, o meio torna mais polar e demanda mais energia no rearranjo, assim, a energia remanescente que poderá ser emitida pelo fóton é menor e, portanto maior será seu comprimento de onda (Ghisaidoobe, 2014; Permyakoy, 1993).

A Figura 14 apresenta os resultados de fluorescência da lunatina-1 e o efeito do PEG. É possível observar que o PEG age como supressor de fluorescência da lunatina-1, assim como também causa o efeito *red-shift*. O PEG diminuiu a intensidade da fluorescência, conforme é aumentada a sua concentração e desloca a curva para o

vermelho, área de maior comprimento de onda. Isso indica, que o meio próximo as sondas fluorescentes tornam-se mais polar na presença do PEG, corroborando com o objetivo da PEGuilação, que é tornar esse peptídeo hidrofóbico em uma molécula mais hidrofílica. Cabe ressaltar que esse tipo de experimento não é suficiente para afirmar que houve reação de PEGuilação, somente demonstra o efeito do PEG no perfil de fluorescência do peptídeo.

Figura 14. Espectro de fluorescência da lunatina-1 pura em tampão fosfato e dos meios reacionais F1 e F2, correspondendo à reações de PEGuilação do peptídeo em proporções molares 1:10 e 1:15 de lunatina-1:PEG 2000, respectivamente. A concentração de lunatina-1 foi fixa nos três sistemas.

5.4 Ensaio da integridade de vesículas

O lipídeo esfingomielina (SM) é importante, pois está presente em grande quantidade na monocamada externa da membrana dos eritrócitos e da mielina de humanos e é muito usado na constituição de membranas modelo. Tendo isso em vista, como estudo preliminar para entender interação da lunatina-1 com membranas lipídicas, foi realizado um experimento de interação do peptídeo com vesículas biomiméticas. Para a caracterização do sistema, as vesículas extrusadas em filtros 100 nm obteve-se os

tamanhos de $145 \text{ nm} \pm 1$ e um índice de polidispersão (PDI) de 0,1, também foi feita uma criomicroscopia para visualização da molécula (Anexo A).

A partir do gráfico de integridade da membrana pela razão [Peptídeo]:[Lipídeo] pode-se observar que na proporção de 1:1 a integridade da membrana foi comprometida em aproximadamente 60%, ou seja, é necessária uma grande quantidade de lunatina-1 para que ocorra degradação da membrana. Esse resultado indica que os mecanismos de ação da lunatina-1 podem envolver outras hipóteses e alvos intracelulares, e não apenas um efeito de lise da membrana celular.

Figura 15. Comprometimento da integridade de vesículas lipídicas em função da razão [PEP]:[LIP].

5.5 Estudo da PEGuilação N-terminal da lunatina-1

Foram feitas duas reações de PEGuilação, sob diferentes condições. Na reação R1 utilizou-se uma proporção molar de lunatina-1:PEG de 1:10, mantendo o tampão a fim de ajustar o pH 8.5 da reação e com fluxo de 3mL. Como pode ser visto na Figura 16 referente à análise do meio reacional por RP-HPLC, a PEGuilação foi bem sucedida. O

pico correspondente à lunatina-1 pura está presente em 5,37 min, seguido pelo pico da lunatina-1 PEGuilada em 7,28 min. Como a lunatina-1 PEGuilada interagiu mais fortemente com a fase estacionária da coluna, o seu pico foi observado em tempo superior. Já o PEG que não reagiu, saiu na lavagem da coluna. Também foi calculado o rendimento da reação, pela integração das áreas dos picos, em que o primeiro pico referente à lunatina-1 pura é de 8816691 mAU e o segundo pico referente à lunatina-1 PEGuilada é de 37001150 mAU. Assim o rendimento de lunatina-1 peguilada é de 80% e a porcentagem de lunatina-1 que não reagiu é de 20%

Figura 16. Cromatograma (RP-HPLC) do meio reacional de PEGuilação da lunatina-1 empregando-se PEG de 2 kDa – **R1 com proporção de lunatina-1:PEG de 1:10, pH= 8,5, 60 min.** Com o índice de pureza de pico de 0,9999.

Já na reação R2, a proporção utilizada de PEG:Peptídeo (15:1) foi maior, a fim de investigar se aumentando a quantidade de PEG, o rendimento da reação de PEGuilação seria maior. Como pode ser observado na Figura 17 referente à análise do meio reacional por RP-HPLC, a PEGuilação também foi bem sucedida e rendimentos superiores foram obtidos. O pico correspondente à lunatina-1 pura está presente em 5,32 min, seguido pelo pico da lunatina-1 PEGuilada em 7,38 min. A área do primeiro pico, que se refere a lunatina-1 pura é de 1256884 mAU e a porcentagem de lunatina-1 que não reagiu é de 8%, já o segundo pico referente a lunatina-1 PEGuilada a área do pico é 14897356 mAU e seu rendimento foi de 92%. Assim, com o aumento na quantidade de PEG, pode-se observar um maior rendimento da R2 quando comparado com a R1. Diversas tentativas

de analisar o peptídeo peguilado por eletroforese foram feitas, porém o peptídeo é muito pequeno, e não foi possível a sua visualização pelo gel SDS-PAGE.

Figura 17. Cromatograma (RP-HPLC) do meio reacional de PEGuilação da lunatina-1 empregando-se PEG de 2 kDa – **R2 com proporção de PEG:Proteína (15:1) , pH = 8,5, 60 min.** Com o índice de pureza de pico de 0,9999.

5.6 Caracterização da lunatina-1 peguilada por espectrometria de massas

A confirmação da PEGuilação sítio-específica foi feita por espectrometria de massa, a intensidade do sinal do pico de MS correspondente aos peptídeos *N*-terminais foi comparada entre lunatina-1 PEGuilada e não PEGuilada após digestão com tripsina na lisina para provar a PEGuilação *N*-terminal. Como visto na Figura 18, após a digestão, ocorre a formação de dois resíduos de massa diferentes, FIGGLLK e TLTSFF, sendo que a lunatina-1 foi peguilada no grupamento amínico da fenilalanina do primeiro resíduo (Figura 19). Como a massa de PEG pode variar (ainda que o PEG reativo seja de baixo índice de polidispersão, consiste em uma média de PEGs com massa molecular aproximada de 2 kDa), o que vemos é um espectro de PEGuilação. Como pode ser visto, a PEGuilação no *N*-terminal foi bem-sucedida e a lunatina-1 foi monopeguilada.

Figura 18. Esquema da digestão por tripsina (**A**) e a porção peguilada (**B**).

Figura 19. MALDI-TOF da lunatina-1 livre e PEGuilada. (**A**) Digestão da lunatina-1 pela tripsina. (**B**) Digestão da lunatina-1 monopeguilada. (**C**) Espectro da PEGuilação da lunatina-1.

5.7 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da lunatina-1 livre foi avaliada contra bactérias Gram-negativas e positivas e, como mostrado na Tabela 2, a lunatina-1 livre conseguiu inibir apenas na concentração mais alta o crescimento das bactérias Gram-negativas (173 μM) e na segunda diluição para a Gram-positiva (86 μM). Esses resultados diferem dos resultados prévios apresentados em Santana (2012), que relatam para a lunatina-1 valores de CIM de 1,49 a 5,95 μM para bactérias Gram-positivas e de 23,8 a 47,8 μM para Gram-negativas. Os valores de absorbância das duas concentrações iniciais da lunatina-1 livre se comparam aos valores da absorbância da ampicilina (Anexo 1) que foi o antibiótico usado para o controle positivo

A forma peguilada, conforme esperado, apresentou redução da atividade antimicrobiana, sendo que todos os poços que continham a lunatina-1 peguilada apresentaram crescimento microbiano. Há na literatura registros de perda da atividade antimicrobiana pela PEGuilação. Guiotto e colaboradores realizaram o estudo da PEGuilação da nisina, um PAM anfifílico de 34 aminoácidos com baixa solubilidade em meio aquoso. A nisina foi mono-peguiada nos resíduos de amino por meio de um PEG-SPA éster ativo, e observou-se perda total da atividade (Guiotto *et al.*, 2003). Devido às interações das cadeias de PEG com os sítios ativos dos PAMs, assim como alteração na solubilidade ou mudanças na estrutura do peptídeo, não é incomum que peptídeos PEGuilados percam parte da sua atividade original. Mas a perda total da atividade da nisina foi explicada devido a seu mecanismo de ação pela formação de poros na membrana (modelo barril), por conta do desequilíbrio entre a lipofilicidade/hidrofiliicidade que a introdução de cadeias de PEG causaram (Guiotto *et al.*, 2013).

Diferentes estudos sobre a PEGuilação de PAMs, referem-se ao efeito da introdução de cadeias de PEG na atividade antimicrobiana. Em um estudo com um análogo da magainina II, um PAM α -helicoidal, observou-se que o PEG leva à redução da helicidade do peptídeo, a porção hidrofílica do PEG no *N*-terminal parece impedir a inserção desta porção na membrana, causando uma inserção mais rasa do peptídeo peguilado. Além de diminuir a afinidade de ligação do peptídeo peguilado à membrana, há um efeito de mascarar as cargas pela fração do PEG contribuindo para a redução da afinidade (Imura, Nishida & Matsuzaki, 2007).

Em outro estudo com o PAM taquileína I, uma folha- β com mecanismo de ação que forma poro toroidal, é mostrado que a PEGuilação não altera o mecanismo de ação,

porém a atividade anti-microbiana é reduzida 32 a 64 vezes. Também observou-se que a membrana externa e camada de peptídeoglicano dificultam a permeação de frações do PEG nas membranas celulares (Imura *et al.*, 2007).

Com bases nesses estudos, é possível que a lunatina-1 peguilada não seja capaz de interagir com a matriz celular externa eficientemente devido ao grande impedimento estérico da fração de PEG. Provavelmente, a peguilação resulta em inserção rasa da molécula, causando a redução da atividade antimicrobiana.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana da lunatina-1 livre e PEGuilada.

	CIM ^a (µM)	
	Lunatina-1 livre	Lunatina-1 PEGuilada
Gram-negativa		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	173	>140
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	173	>140
Gram-positiva		
<i>S. aureus</i> CECT 239	86	>140

^a CIM são expressos como valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.8 Determinação do potencial hemolítico da lunatina-1 livre e PEGuilada

A determinação do potencial hemolítico de peptídeos anti-microbianos é importante devido ao mecanismo de ação destes, que envolve interação com membranas. O peptídeo ideal para uso farmacêutico é aquele que possui uma baixa atividade hemolítica e alta atividade antimicrobiana. De acordo com os ensaios realizados (Figura 20), a lunatina-1 tem a capacidade de causar hemólise em concentrações superiores a 20 µmolar. Observa-se uma hemólise gradual, sendo que acima dessa concentração o peptídeo causa perturbação na membrana. Quando comparamos a lunatina-1 com outros peptídeos antimicrobianos advindos também de peçonhas de escorpião, percebemos que

há dois análogos de peptídeos que são mais citotóxicos, o HC₅₀ (concentração que produz 50% de hemólise) dos PAMs VpAMP 1.0 e VpAMP 1.1 é de 9 μ M e 34 μ M respectivamente (Ramírez-Carreto *et al.*, 2015), enquanto que a lunatina-1 apresenta HC₅₀ é de 46 μ M, ainda assim, a mesma apresenta alta citotoxicidade, com concentrações hemolíticas bem abaixo do valor de CIM determinado, o que dificulta sua aplicação terapêutica.

Figura 20. Efeito hemolítico da lunatina-1 livre nas concentrações de 3-600 μ M. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Em um estudo prévio, a carga líquida e a hidrofobicidade foram os fatores utilizados para estimar a relação de PAMs e citotoxicidade, provando que peptídeos altamente carregados tinham maiores atividades hemolíticas e consequentemente, mais tóxicos (Ruiz *et al.*, 2014). Normalmente, um aumento na cationicidade à redução da atividade biológica do PAM e aumento da atividade hemolítica (Texeira, Feio & Bastos, 2012). Assim, a alta hidrofobicidade da lunatina-1 somada à carga global positiva estão correlacionadas com a atividade hemolítica. Outros fatores como a tendência de formas α -hélice, ponto isoelétrico, comprimento e massa molecular também foram usados para prever a toxicidade de PAMs (Ruiz *et al.*, 2014; Polyansky *et al.*, 2009).

Ao PEGuilar a lunatina-1 (Figura 21) pode-se observar que não há hemólise (HC₅₀ > 600 μ M), mesmo em doses muito acima das investigadas no ensaio de CIM. No entanto, nossos resultados mostram que, apesar de reduzir a toxicidade, a PEGuilação levou à

redução da atividade antimicrobiana. Portanto, uma possibilidade futura a ser estudada seria o emprego de estratégias de peguilação que gerassem uma ligação clivável entre o peptídeo e o PEG, como por exemplo a ligação éster. A PEGuilação da lunatina-1 levou a uma redução da hidrofobicidade devido aos grupos –OH do PEG, que interagem com a água por ligações de hidrogênio, aumentando a solubilidade. A diminuição da hidrofobicidade contribuiu para a redução do potencial hemolítico, assim como o aumento da massa molecular do peptídeo. Conforme mencionado anteriormente, PAMs de alta massa molecular demonstraram baixa toxicidade, pois há interferência na interação com membranas celulares (Polyansky *et al.*, 2009).

Figura 21. Efeito hemolítico da lunatina-1 PEGuilada nas concentrações de 20-600 μM . As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Tabela 3. Peptídeos antimicrobianos e seus HC₅₀ correspondentes. Os PAMs estão em ordem decrescente de acordo com seus valores de HC₅₀.

Peptídeo antimicrobiano (PAM)	Sequência de aminoácidos	HC ₅₀ (μM)	Referências
Mellitin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1,7	Kuhn-Nentwig <i>et al.</i> , 2002
MG-H1	GIKKFLHIIWKFIKAFVGEIMNS	2,9	Tachi <i>et al.</i> , 2002
Pis-1 (nativa)	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG	11	Lee <i>et al.</i> , 2007
Cupiennin1d	GFGSLFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVANKHMQ	14,5	Kuhn-Nentwig <i>et al.</i> , 2002
MG-H2	IIKKFLHSIWKFGKAFVGEIMNI	16	Lee <i>et al.</i> , 2007
Tritrpticin	VRRFPWWWPFLRR	19,98	Schibli <i>et al.</i> , 2006
Pr-3	VSRRRRRRGRRRR	37,17	Perez-cordero <i>et al.</i> , 2011
PDD-B	INWLKLGKKILGAL	45	Čeřovský <i>et al.</i> , 2008
Lunatina-1	FIGGLLKTLSFF	46	-
PMM	INWKKIASIGKEVLKAL	80	Čeřovský <i>et al.</i> , 2008
Ranatuerin2Ara	GLMDTVKNAAKNLAGQLLDTIKCKMTGC	100	Ali <i>et al.</i> , 2002
MP	INWLKLGKKMMSAL	100	Čeřovský <i>et al.</i> , 2008
Brevinin2Tsa	GIMSLFKGVLTAGKHAVAGSLVDQLKCKITGGC	100	Conlon <i>et al.</i> , 2006
Esculentin1Arb	GLFPKFNNKKVKTGIFDIIKTVGKEAGMDVLRTGIDVIGCKIKGEC	120	Ali <i>et al.</i> , 2002
Ranatuerin-1	SMLSVLKNLGKVGLGFVACKINKQC	140	Čeřovský <i>et al.</i> , 2008

Ranatuerin2ARb	GILDTIKNAAKTVAVGLLEKIKCKMTGC	150	Ali <i>et al.</i> , 2002
Ranatuerina2CSa	GILSSFKGVAKGVAKDLAGKLLETCLKCKITGC	160	Subasinhage, Conlon & Hewage, 2008
Esculentina1ARa	GIFSKINKKKAKTGLFNIIKTVGKEAGMDVIRAGIDTISCKIKGEC	180	Ali <i>et al.</i> , 2002
Palustrina3AR	GIFPKIIGKGIVNGIKSLAKGVGMKVFKAGLNNIGNTGCNNRDEC	200	Ali <i>et al.</i> , 2002
Lunatina-1-PEG	FIGGLLKTLTSFF-PEG	>600	-

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, investigamos o potencial anti-microbiano do peptídeo lunatina 1 em sua forma PEGuilada. Empregando-se estudos *in silico*, algumas propriedades físico-químicas da lunatina-1 foram estimadas e a partir desses resultados calculou-se o parâmetro crítico de empacotamento, o qual indica que a lunatina-1 peguilada poderia agregar-se em solução aquosa em estruturas micelares, do tipo micelas poliméricas. Os estudos de PEGuilação mostraram o pH 8.5 como ótimo para a PEGuilação sítio-dirigida ao grupo *N*-terminal, sendo que maiores rendimentos foram obtidos com excesso significativo de PEG reativo; obtivemos um rendimento de 92% para a reação com proporção molar lunatina-1:PEG de 1:15. A lunatina-1 livre e bioconjugada foi testada frente a diferentes cepas bacterianas, mostrando que ao PEGuilar o peptídeo, o mesmo perde significativamente o potencial bactericida. Contudo, o ensaio de hemólise revelou que PEGuilação reduziu, de forma considerável, a atividade hemolítica da lunatina-1. Portanto, uma alternativa para viabilizar a estratégia de PEGuilação da lunatina-1 seria a conjugação de um PEG por meio de ligação clivável/reversível, como por exemplo as do tipo éster ou ainda reações de clivagem sítio-específica. Além disso, faz-se necessário repetir os ensaios de CIM e investigar concentrações maiores da forma PEGuilada. Não obstante, esse estudo traz a possibilidade de emprego da estratégia de PEGuilação para a redução do potencial hemolítico de peptídeos antimicrobianos e fármacos.

REFERÊNCIAS

- Abbassi, F et al. Temporin-SHf, a new type of phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16880-16892, 2010.
- Abuchowski, A.; Van Es, T.; Palczuk, N.C. & Davis, F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, v.10, n.252. p.3578- 3581. 1977.
- Acosta, R G; Vargas, C M. Mecanismos de resistencia bacteriana. **Diagnóstico**, v. 57, n. 2, p. 82-86, 2018.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Rev Saude Publica**. v.38. n.3. p.47-48. 2004.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Critérios diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde [Internet]. Brasília: ANVISA; 2017
- Alekshun, M. N.; Levy, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial. Multidrug Resistance. **Cell** 128. v. 6. p. 1037-1050, 2007.
- Ali, M F. et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1601, n. 1, p. 55-63, 2002.
- Allegranzi B, Kilpatrick C, Storr J, Kelley E, Park BJ, Donaldson L; Global Infection Prevention and Control Network. Global infection prevention and control priorities 2018-22: a call for action. **Lancet Glob Health**. p.5. n. 12. p.1178-1180. 2017
- Allende D, McIntosh T.J. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. **Biochem**. v. 42. p.1101-1108, 2003.
- Almaaytah, A.; Albalas, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.
- Alvim, A. L. S.; Santos, F. C. R. Medidas De Prevenção De Contato Para Prevenção E Controle De Infecções: Relato De Experiência. **Rev. enferm. Cent.-Oeste Min**; 7Jul. - Dec. 2017.
- Andreu, d. & Rivas, I. animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47. p. 415–433. 1998.

- ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Agência Nacional de Vigilância a Saúde**. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- Benachir, T. et al. Melittin-induced leakage from phosphatidylcholine vesicles is modulated by cholesterol: a property used for membrane targeting. **European Biophysics Journal**, v. 25, n. 3, p.201-210, 1997.
- Berkowitz, B A.; Bevins, Charles L.; Zasloff, Michael A. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. **Biochemical pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 625-629, 1990.
- Blair, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 42- 51, 2015.
- Bozelli, J. C. et al. effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritripticin to lipid membranes. **Chemistry And Physics Of Lipids**, v. 165, n. 4, p.365-373, 2012.
- Brogden, K., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Rev. Microbiol.** v. 3, p. 238–250, 2005.
- Brown, K. L. and Hancock, R. E. W., Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides, **Current Opinion in Immunology**, v. 206, n.2, p. 143- 149, 2006.
- Castro, T G.; Micaêlo, N M.; Melle-Franco, M. Modeling the secondary structures of the peptaibols antiamoebin I and zervamicin II modified with D-amino acids and proline analogues. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 11, p. 313, 2017.
- Čeřovský, V et al. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 992-1003, 2008.
- Christian, D A. et al. Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 463-474, 2009.
- Conlon, J. M et al. Antimicrobial peptides from the skin of the Tsushima brown frog *Rana tsushimensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 42-49, 2006.
- Correia, C. R. D.; Saito, E. Y.; Gozzo, F. C.; Macedo, F. M.; Santana, M. H. A., Martinez, P. D. G. Processo de conjugados de interferon com óxido de poliaquilenos e seus usos. 2008.
- Cox, G.; Wright, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int J Med Microbiol.** v.303 p. 287– 292, 2013.

- Demain, A.L.; Spizek, J. The antibiotic crisis. In: Tegos, G.; Mylonakis, E. (eds) Antimicrobial drug discovery: emerging strategies. **CAB International, Wallingford, UK** : p. 26–43, 2012.
- Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008
- ECDC. Factsheet for experts - Antimicrobial resistance. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>. 2008
- Ehrenstein, G., Lecar, H., Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Q. Rev. Biophys.** v. 10, p. 1–34. 1977.
- Ehrentraut C, Ekholm M, Tanushi H, Tiedemann J, Dalianis H. Detecção de infecções adquiridas em hospitais: uma abordagem de classificação de documentos usando máquinas de vetores de suporte e aprimoramento da árvore de gradiente. **Revista de Informática em Saúde**. v. 24, n. 1, p. 24 - 42, 2018.
- Epand, R. M.; Vogel, H. J.. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p.11-28, 1999.
- Fernandes LR, Stern ACB, Cavaglieri RC, Nogueira FCS, Domont G, Palmisano G, Bydlowski SP. 7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDR1 mechanism. **Journal of Proteomics**. v. 151 p.12–23; 2017.
- Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CRV, Barth AL, Carneiro ICDRS, Giamberardino HIG, Rodrigues JLN, Santos Filho L, de Mello MJG, Pereira MS, Gontijo Filho PP, Rocha M, Servolo de Medeiros EA, Pignatari ACC. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **J Hosp Infect**. v. 96 n. 2 p.139-144. 2017
- Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discover Today**; v. 20 p.122–128. 2015
- Frazier, M L. et al. Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. **Biophysical journal**, v. 92, n. 7, p. 2422-2433, 2007.
- Ghisaidoobe AB, Chung SJ. “Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Protein: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques”, **Int. J. Mol Sci.**, n. 15, pp. 22518-22538, 2014.
- Ginn, C.; Khalili, H.; Leve, R.; Brocchini, S. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines. **Future Medicinal Chemistry**, v.6, n.16, p.1829-1846, 2014.

- Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**. v. 1, p. 1-33, 2007.
- Gomes, A. Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., Giri B., Anticancer potential of animal venoms and toxins, **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 2, p. 93–103, 2010.
- Gomes, M. F.; Moraes, V. L. O programa de controle de infecção relacionada à assistência à saúde em meio ambiente hospitalar e o dever de fiscalização da agência nacional de vigilância sanitária. **Rev. direito sanit**; v. 18 n. 3 p. 43-61, 2017.
- Guiotto, A et al. PEGylation of the antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives. **Il Farmaco**, v. 58, n. 1, p. 45-50, 2003.
- Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., Shaw, C., Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities, **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784–1794, 2013.
- H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, **Clinical infectious diseases** : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v.48, p.1-12. 2009.
- Hamley, I W. PEG–peptide conjugates. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 5, p. 1543-1559, 2014.
- Hancock REW, Chapplee DS. Peptide antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 43 p. 1317-1323. 1999.
- Hancock, RE; Scott, MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 97 p. 8856-8861. 2000.
- Hans, M. L. and Lowman, A. M., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, **Journal Control Release**, v. 6, p. 319–327, 2002.
- Harpaz, Y.; Gerstein, M. & Chothia, C. Volume changes on protein folding. **Structure**, v. 2, n. 7, p.641-649, 1994.
- Hernández-Aponte, C. A. et al. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p.84-92, 2011.
- HO, P. L.; ONG, H. K.; TEO, J.; OW, D. S.-W.; CHAO, S.-H. HEXIM1 Peptide Exhibits Antimicrobial Activity Against Antibiotic Resistant Bacteria Through Guidance of Cell Penetrating Peptide. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 203, 2019.

- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control.** v. 36, n. 5, p. 309-332. 2008.
- Huang, H.W., Chen, F.-Y., Lee, M.-T., Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. **Phys. Rev. Lett.** v. 92, p. 198304/1-198304/4. 2004.
- Huang, Y; Huang, J; Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152, 2010.
- Imura, Y et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 5, p. 1160-1169, 2007.
- Imura, Y; Nishida, M; Matsuzaki, K. Action mechanism of PEGylated magainin 2 analogue peptide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2578-2585, 2007.
- Imura, Y. Nishida, M. Matsuzaki, K. Action mechanism of PEGylated magainin 2 analogue peptide. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, pp. 2578-2585. 2007
- Ireno, I. C., Peptidoma parcial do veneno do escorpião da Amazônia *Brotheas amazonicus*. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica e Imunologia), Universidade Federal De Minas Gerais. 2009.
- Israelachvili, J. N. *et al.* Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal Of The Chemical Society, Faraday Transactions 2**, v. 72, p.1525-1568, 1976.
- Izadpanah, A. e Gallo, R.L. Antimicrobial peptides. **J Am Acad Dermatol**, 2005.
- J. González-Valdez, M. Rito-Palomares, J. Benavides, Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer–protein conjugates for “PEGylated” bioprocesses, **Anal. Bioanal. Chem.** v. 403, p. 2225–2235. 2012.
- J.M. Harris, R.B. Chess. Effect of PEGylation on pharmaceuticals **Nat. Rev., Drug Discov.**, v. 2, p. 214-221. 2003.
- Jenssen H, Hammil P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19 p. 491-511. 2006.
- Ji, Y., De Lima, M. E., Ion Channel-Target Toxicology, **Journal of Toxicology**. 2012.
- Kamysz, W.; Okroj, M.; Lukasiak, J., Novel properties of antimicrobial peptides, **Acta Biochimica**, v. 50, n. 2, p.461–469, 2003.
- Kang, J S; Deluca, P P; Lee, K C. Emerging PEGylated drugs. **Expert Opinion On Emerging Drugs**, v. 14, n. 2, p.363-380, 2009.

- Kuhn-Nentwig, L et al. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 11208-11216, 2002.
- Kumar, S; Varela, M F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **chemotherapy**, v. 14, p. 18, 2013.
- LACERDA, R. A. Controle de infecção em centro cirurgico fatos, mitos e controversias. **Revista SOBECC**, v. 8 n. 3 p. 29. 2003.
- Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science & Business Media, 2013
- Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Kluwer Academic, 1999.
- Larson E. Innovations in health care: antisepsis as a case study. **Am J Public Health**. v. 79 n. 1 p. 92-99. 1989.
- Lee, S et al. Solution structure and cell selectivity of piscidin 1 and its analogues. **Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 3653-3663, 2007.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Selsted, M.E., Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. **J. Clin. Invest.** v. 84, p. 553–561. 1989.
- Lewis, K. Persister cellules, la dormance et les maladies infectieuses. **Nature**, v. 5, p. 48-56, 2007.
- Li, Y; Xiang, Q; Zhang, Q; Huang, Y; Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides** v. 37 p. 207-215. 2012.
- Ling, K.; Jiang, H.; Zhang, Q. A colorimetric method for the molecular weight determination of polyethylene glycol using gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p.538-548, 2013.
- Lopez-Fernandez H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. **BMC Bioinformatics**. v.16 p. 318, 2015
- Lorena NS, Pitombo MB, Cortes PB, Maya MC, Silva MG, Carvalho AC, et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. **Acta Cir Bras**. v.25 n.5, p. 455-459. 2010.

- Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., Huang, H.W., Membrane pores induced by magainin. **Biochemistry** v. 35, p.13723–13728. 1996.
- Machado, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p.1180-1189. 2017.
- Machado, P.R.L., Carvalho, L.; Araújo, M.I.A.S.; Carvalho, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. p. 647-664, 2004.
- Mandal, S. M.; Roy, A.; Mahata, D.; Migliolo, L.; Nolasco, D. O.; Franco, O. L., Functional and structural insights on self-assembled nanofiber-based novel antibacterial ointment from antimicrobial peptides, bacitracin and gramicidin S., **The Journal of Antibiotics**, v. 67, p. 771-775, 2014.
- Manteghi, R et al. Pegylation and formulation strategy of Anti-Microbial Peptide (AMP) according to the quality by design approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 144, p. 105197, 2020.
- Matos, M. C. B. *et al.* Controle de infecção é sinal de segurança": discussões a partir da perspectiva discente. **Rev. pesqui. cuid. fundam. (Online)**; v. 10 n. 3 p. 640-646, 2018.
- Mattei, B. Lira, R. B. Perez, K. R. and Riske, K. A. \Membrane permeabilization induced by triton x-100: the role of membrane phase state and edge tension," **Chemistry and physics of lipids**, v. 202, pp. 28-37, 2017.
- Mojsoska, B.; Jenssen, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 366-415, 2015.
- Mulani, MS et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: a review. *Frontiers In Microbiology*, **Frontiers Media SA** v. 10, p. 1-24, 1 abr. 2019.
- Narayana, J. L.; Chen, Jyh-yih. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p.88-94, 2015.
- Nawrocki, L. K.; Crispell, K. E.; McBride, M. S., Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria, **Antibiotics**, v. 3, p. 449 – 461, 2014.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4ª edição. Editora W. H. FREEMAN & CO., 2011.
- Nogueira Jr C, Mello DS, Padoveze MC, Boszczowski I, Levin AS, Lacerda RA. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Cad Saude Publica**; v. 30, n. 1, p. 11-20. 2014

- Obuobi, Sybil et al. Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of Surface Engineered Polycationic Albumin Nanoparticles with Reduced Hemolytic Activity. **Macromolecular bioscience**, v. 18, n. 10, p. 1800196, 2018.
- Oliveira, HM; Silva, CPR; Lacerda, RA. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. : a conceptual analysis. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [s.l.], v. 50, n. 3, p. 505-511, jun. 2016.
- Osman MF, Askari R. Infection control in the intensive care unit. *Surg Clin North Am* [Internet]. v. 94, n.6, p.1175-1194. 2014.
- Padilha, J. M. F. O, *et al.* Luvas e adesão de profissionais de enfermagem às precauções de contato: uma revisão integrativa. **Rev. enferm. UFPE on line**; v. 11, n. 2, p. 667-674, 2017.
- Padoveze, M. C, et al. The concept of vulnerability applied to Healthcare-associated Infections. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 299-303, fev. 2019. FapUNIFESP (SciELO).
- Padoveze, M. C.; Fortaleza, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 995-1001, 2014.
- Pérez-Cordero, J J et al. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 683-690, 2011.
- Permyakoy, E. A, Luminescent Spectroscopy of Proteins, Boca Raton: CRC Press, 1993.
- Pfister, D.; Morbidelli, M. Process for protein PEGylation. **Journal of Controlled Release**, v.180, p.134-149, 2014.
- Polyansky, A A. et al. N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: a case study in laticins. **FEBS letters**, v. 583, n. 14, p. 2425-2428, 2009.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y., Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. **Biochemistry** v. 31, p. 12416–12423. 1992.
- Pushpanathan, M.; Gunasekaran, P.; Rajendhran, J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. **International Journal of Peptides**. 2013.
- Ramírez-Carreto, S. et al. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. **Peptides**, v. 73, p.51-59, 2015.
- Rangel-Yagui, C.O. et al. Novel potential drug against T-cruzi and its interaction with surfactant micelles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 12, n. 2, p. 183-192, 2007.

- Rashband, W.S., **ImageJ**, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- RAW, Juliana. **Estudo da interação de Líquidos Iônicos com proteínas modelo**. 2016. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- Reardon, S. Bacterial arms race revs up. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 402-403, 2015.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**. v. 197, n. 8, p1079–1081. 2008
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p.459– 476, 2002.
- Roque, C.; Sheung, A; Rahman, N.; Ausar, S.F. Effect of Polyethylene Glycol Conjugation on Conformational and Colloidal Stability of a Monoclonal Antibody Antigen-binding Fragment (Fab'). **Molecular Pharmaceutics**, v.12, p.562-575, 2015.
- Roy, A.; Franco, O. L.; Mandal, S. M., Biomedical exploitation of self assembled peptide based nano-structures, **Current Protein Peptide Science**, v. 14, p.580-587, 2013.
- Saint Jean, K D. et al. Effects of hydrophobic amino acid substitutions on antimicrobial peptide behavior. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 3, p. 408-419, 2018.
- Santajit, S; Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- Santana, H. F. Determinação da diversidade peptídica do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus*. [s.l.] Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p.1-17, 2018.
- Sax H, Clack L, Touveneau S, Jantarada Fda L, Pittet D, Zingg W.PROHIBIT study group. Implementation of infection control best practice in intensive care units throughout Europe: a mixed-method evaluation study.**Implement Sci**. [Internet] 2013.
- Schibli, D J. et al. Structure-function analysis of tritrypticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures. **Biophysical journal**, v. 91, n. 12, p. 4413-4426, 2006.
- Selwyn, Sydney. Hospital infection: the first 2500 years. **Journal of Hospital Infection**, v. 18, p. 5-64, 1991.

- Subasinghage, A P.; Conlon, J. M; Hewage, C M. Conformational analysis of the broad-spectrum antibacterial peptide, ranatuerin-2CSa: identification of a full length helix–turn–helix motif. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 6, p. 924-929, 2008.
- Sun, S et al. Enantiomeric effect of D-amino acid substitution on the mechanism of action of α -helical membrane-active peptides. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 67, 2018.
- Tacconelli, E et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- Tachi, T et al. Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide– lipid interactions and selective toxicity. **Biochemistry**, v. 41, n. 34, p. 10723-10731, 2002.
- Teixeira, V; Feio, M J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.
- Turecek, P L. et al. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 2, p. 460-475, 2016.
- Urbán, P.; Valle-Delgado, J.; Moles, E.; Marques, J.; Díez, C.; Fernàndez-Busquets, X.; Nanotools for the Delivery of Antimicrobial Peptides, **Current Drug Targets**, v. 13, p.1158-1172, 2012.
- Valeur, B. Molecular Fluorescence: Principles and Application, Wiley-VCH, Weinheim. 2001.
- Van Meer, G; Voelker, D R.; Feigenson, G W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008.
- Venomics. " A European project supported through the Seventh Framework Program (FP7 HEALTH)." Visualizado em:< <http://www.venomics.eu>>. 2012.
- Veronese, F. M.; Pasut, G. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 461-472, 2012.
- Veronese, F.M., Pasut, G. PEGylation: successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.21, p.1451-1458, 2005.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z., APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education, **Nucleic Acids Research**, v. 44, p.1087-1093, 2016.

- WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1.
- Who. Global guidelines for the prevention on surgical site infections. **World Health Organization**. Inglaterra. 2016.
- Who. Health care-associated infections Fact Sheet. **World Health Organization**. 2014
Disponível em: https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf>, acesso em 19/01/2019.
- Who. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. **World Health Organization**. Geneva, Suíça. 2011.
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys. J.** 79 : 1475-1485. 2001.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** 415, p.389-395. 2002.
- ZENG, Xian-chun; CORZO, Gerardo; HAHIN, Richard. Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. **Iubmb Life (international Union Of Biochemistry And Molecular Biology: Life)**, v. 57, n. 1, p.13-21, 2005.
- Zhang, C.; Yang, X.L.; Yuan, Y.H.; Pu, J.; Liao, F. Site-specific PEGylation of Therapeutic Proteins via Optimization of Both Accessible Reactive Amino Acid Residues and PEG derivatives. **Biodrugs**, v.26, n.4, p.209-215, 2012.
- Zhang, G et al. Modification of antimicrobial peptide with low molar mass poly (ethylene glycol). **Journal of biochemistry**, v. 144, n. 6, p. 781-788, 2008.
- Zhang, L. Gallo, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.14-19, 2016.
- Zhang, S K et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.
- Zhao, Z., Y. Ma, et al. "Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*." **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 53(8): 3472-3477. 2009.

ANEXO A

Tabela A1. Absorbâncias obtidas nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para a lunatina-1 livre, utilizando as cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* e CECT 239 de *Staphylococcus aureus*.

Cepas	Concentrações (µM)*				
	173,5	86,45	43,37	17,54	Amoxicilina (342,07 µM)
ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i>	0,073	0,075	1,176	1,185	0,059
ATCC 9027 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,066	1,117	1,230	1,19	0,094
CECT 239 de <i>Staphylococcus aureus</i>	0,0653	0,063	1,167	1,188	0,097

* Os valores de absorbância são referentes a média das triplicatas.

Tabela A2. Absorbâncias obtidas nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para a lunatina-1 PEGuilada, utilizando as cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* e CECT 239 de *Staphylococcus aureus*.

Cepas	Concentrações (µM)*				
	140,35	70,17	35,08	17,54	Amoxicilina (342,07 µM)
ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i>	0,759	0,7143	1,247	1,142	0,059
ATCC 9027 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,283	0,842	1,114	1,174	0,094
CECT 239 de <i>Staphylococcus aureus</i>	0,695	0,689	0,816	1,105	0,097

* Os valores de absorbância são referentes a média das triplicatas.

ANEXO A
(Continuação)

Figura A1. Criomicroscopia das vesículas composta por 40% POPC, 40% colesterol e 20% esfingomielina na concentração de 14 mM, extrusadas em filtro de 100 nm. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LLNano/CNPEM).