

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Juliana Rodrigues Moraes

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PEPTÍDEOS  
NÃO-CITOTÓXICOS PARA MACRÓFAGOS RAW 264.7**

Belo Horizonte

2023

Juliana Rodrigues Moraes

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PEPTÍDEOS  
NÃO-CITOTÓXICOS PARA MACRÓFAGOS RAW 264.7**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco

Belo Horizonte

2023

043

Moraes, Juliana Rodrigues.

Análise das propriedades físico-químicas de peptídeos não-citotóxicos para macrófagos RAW 264.7 [manuscrito] / Juliana Rodrigues Moraes. – 2023.  
103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.

Coorientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Peptídeos. 3. Biofísica. 4. Imunomodulação. 5. Toxicidade. I. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. II. Franco, Luís Henrique. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1




Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA RODRIGUES MORAES.** Ao um dia do mês de dezembro de 2023 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Microsoft Teams”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PEPTÍDEOS NÃO-CITOTÓXICOS PARA MACRÓFAGOS RAW 264.7”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof<sup>a</sup>. Mariana Torquato Quezado de Magalhães, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada (Universidade Católica de Brasília), aprovada; Dr. Prof. Artur Santos Miranda (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA  
 REPROVADA


O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2023.

Documento assinado digitalmente  
 MARCELO HENRIQUE SOLLER RAMADA  
 Data: 04/12/2023 18:14:10-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada (Universidade Católica de Brasília)**

Documento assinado digitalmente  
 ARTUR SANTOS MIRANDA  
 Data: 05/12/2023 11:27:31-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Prof. Artur Santos Miranda (UFMG)**

Documento assinado digitalmente  
 MARIANA TORQUATO QUEZADO DE MAGALHAE  
 Data: 04/12/2023 15:53:49-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães - Orientadora (UFMG)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à banca examinadora por ter aceitado participar desta defesa e por me dar o privilégio de receber suas considerações, críticas e contribuições, que serão fundamentais para o amadurecimento deste trabalho.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Agradeço muitíssimo aos colaboradores deste trabalho: ao professor Dr. Rodrigo Verly e sua equipe em Diamantina, por terem me acolhido, me ensinado e me dado a possibilidade de sintetizar os peptídeos deste projeto; à professora Dra. Leda e ao Dr. Leonardo, por ceder um espaço em seu laboratório e por ter tido toda a paciência do mundo para me ensinar algo com o qual eu nunca havia trabalhado antes; ao professor Dr. Thiago de Castro e sua equipe, por também terem me acolhido e ensinado tanto em momentos cruciais; ao meu coorientador professor Dr. Luís e sua equipe, por ter compartilhado tanto conhecimento em relação à biologia celular e imunologia, que foi fundamental para a execução deste projeto.

Agradeço também a todos os alunos do laboratório maravilhoso do qual tenho orgulho de fazer parte atualmente, o LBM. Vocês se tornaram mais do que colegas de trabalho, se tornaram grandes amigos muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por amenizarem todo o estresse da pós-graduação com conversas, comemorações e brincadeiras. A companhia de vocês faz o ambiente de trabalho ser muito mais tranquilo do que poderia ser. Quero deixar um agradecimento especial ao Dr. Bruno, o maior nerd de todos, que me ensinou, brigou comigo, me elogiou e me criticou tantas vezes que me fez amadurecer cientificamente de forma considerável. Também deixo um agradecimento especial ao IC Flávio, por ter me ensinado muito e por ter me feito companhia em diversos cantos deste ICB.

Gostaria de deixar um agradecimento muito especial à querida orientadora Mariana Quezado. Sob sua orientação nestes últimos dois anos, percebi que amadureci muito cientificamente e pessoalmente. Muito obrigada por me ensinar tanto, você exala ciência e isso me inspira, sua resistência neste ambiente machista, seu jeito único de orientar, e a forma como você respira ciência, me fazem sentir orgulho de ter sido orientada por uma mulher cientista tão forte como você. Sei que você fez e

continuará fazendo o possível para acompanhar e apoiar todos os seus alunos, sem interferir em nossa independência, sempre se preocupando em fazer com que todos aprendam verdadeiramente a fazer ciência. Muito obrigada também por todas as vezes que você foi comigo, e com outros alunos, para bancada fazer experimento, esses momentos ficarão gravados em nossas memórias para sempre. É óbvio, mas preciso dizer que, sem sua orientação, este trabalho não teria sido realizado. Obrigada!

Agradeço aos meus amigos Bárbara, Vinícius, Luiz e Luiza. Bárbara, te agradeço por sua lealdade e companhia, por me entender, por todas as conversas, por dividir comigo sua positividade não-tóxica, por ter uma dicção tão ruim, por todos os almoços e fofocas, e por sempre estar por perto. Vinícius, te agradeço por me aguentar por mais de treze anos e ter feito parte de praticamente todas as etapas da minha vida, por ser tão estranho e assim fazer eu me sentir normal, por ser tão otaku e assim fazer com que eu possa te zoar por isso, por ser meu companheiro a vida toda e por também sempre estar por perto. Aos amigos de Conselheiro Lafaiete, Luiz e Luiza, obrigada por serem tão esquisitos e compartilharem comigo suas realizações, frustrações, felicidades, companheirismo, coisas de nerd como xadrez e cubo mágico e, no caso da Luiza, obrigada por compartilhar a própria casa e por ser o extremo oposto de "intercambiável". Obrigada a todos vocês por me ensinarem expressões novas como "vitaminado do seninha", "ecologia de serrano", "alitas de pollo são asas de porco" e "camaleão jamais será um arlequim", que me rendem tantas risadas. Vocês todos fazem eu não me sentir deslocada, me sentir pertencente, me sentir em casa em meio a tanta desolação. Obrigada por compartilharem suas solidões comigo.

Agradeço enormemente à minha noiva Rafaela. Passamos por muitos momentos difíceis nestes últimos dois anos de relacionamento à distância, justamente o período de meu mestrado, mas você nunca deixou de ser minha "companheira de vida" e me apoiar nesta jornada. Não posso prever o futuro e dizer o que será de nós daqui para frente, mas quero deixar eternizado neste documento nosso amor, para que todos que um dia venham a ler estas linhas, saibam que duas mulheres podem se amar verdadeira e poderosamente, e que nunca houve nada de errado nisso. Obrigada por ser tão presente em minha vida, mesmo estando em outro país agora, e por não deixar eu me perder dentro de mim mesma. Obrigada por ter

aguentado firme, rido e chorado comigo, e por ter me dado a mão em momentos em que eu nem sabia se eu existia. Você foi peça chave para a conclusão deste trabalho. Agradeço também à sua família, em especial ao meu sogro José Eduardo, por sempre apoiar e acreditar na minha capacidade.

Agradeço à psicóloga Dra. Panera, ao psicólogo Dr. André e ao psiquiatra Dr. Marcelo por terem me guiado nesta jornada em caminhos menos destrutivos e por terem me auxiliado nessa luta contra minha maior inimiga interna.

Agradeço à minha família por me apoiar em meus estudos, mesmo sem entender profundamente o que eu faço. Agradeço especialmente à minha mãe Roseli por me ensinar a ser sua filha selvagem, e, mesmo sem querer, me mostrar que eu sou boa demais para ser ignorada. Agradeço aos meus irmãos Fernanda, Henrique, Cristiane, Rafaella e especialmente o pequeno Matheus, que me salvou tantas vezes sem nem se dar conta disso, desde seu nascimento. Prometo jogar Roblox com você mais vezes. Agradeço ao meu pai Darci por sempre me ensinar o valor dos estudos, mesmo ele mesmo tendo tão pouco. Agradeço à minha tia Lucilene, vulgo Michele, por ser minha amiga, companheira e por me inspirar a ser um espírito livre. Quero agradecer também ao Gustavo, o gato, por ter me acolhido e me entendido em tantas noites obscuras, por ter sido minha companhia na virada do ano e em tantos outros dias do ano, por ter me dado tanto carinho peludo e tanto amor apenas com seus olhares felinos.

Por fim, gostaria de finalizar não com um agradecimento, mas sim com uma homenagem ao meu tio Rodney, que nos deixou este ano. Você nunca vai ler isso, mas gostaria de deixar eternizado neste documento que você e seus filhos foram fundamentais para a minha criação, principalmente na primeira infância, e isso ficará marcado para sempre na minha vida, assim como ficará marcado para sempre o homem trabalhador, simples e feliz que você foi durante sua vida toda.

Muito obrigada a todas as pessoas de luz que encontrei pelo caminho!

## RESUMO

Peptídeos bioativos, com origem natural ou sintética, desempenham várias funções biológicas, incluindo atividade antimicrobiana e imunomodulatória. Suas propriedades físico-químicas, como carga, estrutura e hidrofobicidade, influenciam seus efeitos biológicos. O desequilíbrio desses atributos pode levar à citotoxicidade para células hospedeiras, o que é indesejável para aplicações terapêuticas. Por causa disso, o objetivo principal deste trabalho foi determinar quais os atributos físico-químicos dos peptídeos bioativos são responsáveis pela sua atividade citotóxica em modelo de macrófagos murinos. Foram sintetizados 20 peptídeos bioativos por meio de síntese em fase sólida por estratégia Fmoc, purificados por cromatografia líquida e identificados por espectrometria de massa MALDI-ToF. As propriedades físico-químicas dos peptídeos foram determinadas pelo programa enCrypted, e os resultados foram submetidos ao algoritmo de clusterização K-Means. Os peptídeos foram classificados em 4 grupos distintos, como evidenciado por uma Análise de Componente Principal (PCA). A análise de carga e o teste estatístico ANOVA foram aplicados para identificar as propriedades físico-químicas que mais contribuíram para a formação dos grupos, que foram: volume e massa monoisotópica; coeficientes de estrutura secundária; acessibilidade dos resíduos ao solvente; e porcentagem de resíduos básicos e carregados. Ensaios de MTT revelaram que o Grupo 0 inclui peptídeos não-citotóxicos. Já os grupos 1, 2 e 3 contêm peptídeos com citotoxicidade confirmada neste estudo (LyeTx1, D e L-ecPis2s) e em outros trabalhos, o que sugere que as propriedades físico-químicas supracitadas são responsáveis pela separação entre peptídeos tóxicos e não-tóxicos. Quanto à quantificação de óxido nítrico, foi observado que os peptídeos LyeTx1, D-ecPis2s e L-ecPis2s, L-Phes, Lun1 F12A e Schisn3 diminuíram a concentração de NO, enquanto o peptídeo Lun1 K7A a aumentou. A relação entre atributos físico-químicos e a atividade imunomodulatória desses peptídeos necessita de mais investigações. Por fim, neste trabalho determinamos características físico-químicas que parecem ser fundamentais para determinar a não-citotoxicidade de um peptídeo bioativo. Ainda, sugerimos que estes atributos devem ser considerados para o desenho de novos peptídeos não-citotóxicos.

**Palavras-chave:** peptídeos bioativos; desenho de peptídeos; propriedades físico-químicas; biofísica; citotoxicidade; imunomodulação



## **ABSTRACT**

Bioactive peptides, whether of natural or synthetic origin, perform various biological functions, including antimicrobial and immunomodulatory activities. Their physicochemical properties, such as charge, structure, and hydrophobicity, influence their biological effects. Imbalance in these attributes can lead to cytotoxicity to host cells, which is undesirable for therapeutic applications. Because of this, the aim of this work was to determine which physicochemical attributes of bioactive peptides are responsible for their cytotoxic activity in a murine macrophage model. Twenty bioactive peptides were synthesized through Fmoc solid-phase synthesis, purified by liquid chromatography, and identified by MALDI-ToF mass spectrometry. The physicochemical properties of the peptides were determined using the enCrypted program, and the results were subjected to the K-Means clustering algorithm. The peptides were classified into four distinct groups, as evidenced by Principal Component Analysis (PCA). Loadings analysis and the ANOVA statistical test were applied to identify the physicochemical properties that contributed most to the groups formation, which included volume and monoisotopic mass, secondary structure coefficients, solvent accessibility of residues, and the percentage of basic and charged residues. MTT assays revealed that Group 0 includes non-cytotoxic peptides. Groups 1, 2, and 3, on the other hand, contain peptides with confirmed cytotoxicity in this study (LyeTx1, D and L-ecPis2s) and in other articles, suggesting that the above-mentioned physicochemical properties are responsible for the separation between toxic and non-toxic peptides. As for the quantification of nitric oxide, it was observed that the peptides LyeTx1, D-ecPis2s, L-ecPis2s, L-Phes, Lun1 F12A, and Schisn3 decreased NO concentration, while the peptide Lun1 K7A increased it. The relation between physicochemical attributes and the immunomodulatory activity of these peptides requires further investigation. In conclusion, in this study, we determined physicochemical characteristics that appear to be crucial in determining the non-cytotoxicity of a bioactive peptide. Furthermore, we suggest that these attributes should be considered in the design of new non-cytotoxic peptides.

**Keywords:** bioactive peptides; peptide design; physicochemical properties; biophysics; cytotoxicity; immunomodulation

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema dos modelos de interação de peptídeos bioativos com membranas celulares.....	19
Fig. 2. Esquema do funcionamento geral do programa enCrypted.....	25
Fig. 3. Peptídeos sintéticos.....	26
Fig. 4. Estrutura primária da proteína Sm29.....	28
Fig. 5. Esquema geral dos métodos.....	35
Fig. 6. Esquema geral da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc.....	43
Fig. 7. Formação de cristais de formazan.....	46
Fig. 8. Reação de Griess modificada.....	48
Fig. 9. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1.....	51
Fig. 10. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 I2A.....	52
Fig. 11. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 G4A.....	53
Fig. 12. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 K7A.....	54
Fig. 13. Clusterização dos peptídeos de acordo com seus atributos físico-químicos e análise de cargas.....	56
Fig. 14. Citotoxicidade dos peptídeos Lycotoxina-1, L- e D-ecPiscidina-2s sobre macrófagos murinos.....	59
Fig. 15. Curvas de citotoxicidade dos peptídeos LyeTx1, L-ecPis2s e D-ecPis2s.....	60
Fig. 16. Citotoxicidade das lunatinas.....	63
Fig. 17. Citotoxicidade dos peptídeos Hylaseptina-1, Caspase-3 e D- eL-Fenilseptina.....	64
Fig. 18. Citotoxicidade das schistocininas-1 a -4.....	65
Fig. 19. Citotoxicidade das schistocininas-5, -7, -8 e -9.....	66
Fig. 20. Parte 1: valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo...	68
Fig. 21. Parte 2: Valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo...	69
Fig. 22. Parte 3: Valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo...	72

Fig. 23. Avaliação da ativação da via do óxido nítrico em macrófagos RAW tratados com os peptídeos.....	75
Fig. S5. WCSS.....	99
Fig. S6. Cromatogramas dos peptídeos Schistocininas-1, -2, -3 e -4.....	100
Fig. S7. Cromatogramas dos peptídeos Schistocininas-5, -7, -8 e -9.....	101
Fig. S8. Purificação e caracterização das piscidinas.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: Peptídeo antimicrobiano

Cas3: Caspase-3

CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica 50%

CL: Cardiolipina

DBAASP: Banco de Dados de Atividade Antimicrobiana e Estruturas de Peptídeos

DCM: Diclorometano

D-ecPis2s: D-ecPiscidina-2s

DIC: Diisopropilcarbodiimida

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

D-Phes: D-fenilseptina

ecPis2: ecPiscidina-2

ecPis3: ecPiscidina-3

ecPis4: ecPiscidina-4

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarboil

GP: Grupo protetor

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

Hsp1: Hylaseptina-1

IPA: Isopropanol

L-ecPis2s: L-ecPiscidina-2s

L-Phes: L-fenilseptina

LPS: Lipopolissacarídeo

Lun1: Lunatina-1

Lun1 I2A: Lunatina-1 I2A

Lun1 G4A: Lunatina-1 G4A

Lun1 K7A: Lunatina-1 K7A

Lun2 F12A: Lunatina-2 F12A

LyeTx1: Lycotoxina-1

MALDI-ToF: Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo

MIC: Concentração inibitória mínima

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NED: N-(1-naftil)etilenodiamina

NO: Óxido nítrico

PA: Ácido fosfatídico

PCA: Análise de componente principal

PG: Fosfatidilglicerol

PI: Fosfatidilinositol

PI: Ponto isoelétrico

PIPE: Piperidina

PS: Fosfatidilserina

RMN: Ressonância magnética nuclear

ROS: Espécies reativas de oxigênio

Schisn1: Schistocinina-1

Schisn2: Schistocinina-2

Schisn3: Schistocinina-3

Schisn4: Schistocinina-4

Schisn5: Schistocinina-5

Schisn6: Schistocinina-6

Schisn7: Schistocinina-7

Schisn8: Schistocinina-8

Schisn9: Schistocinina-9

SFB: Soro fetal bovino

TFA: Ácido trifluoroacético

TIS: Triisopropilsilano

WCSS: Soma dos quadrados *intra-clusters*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. Peptídeos bioativos.....	16
1.2. Mecanismos de ação dos peptídeos bioativos.....	18
1.2.1. Mecanismos de ação membranolíticos.....	18
1.2.2. Mecanismos de ação não-membranolíticos: alvos alternativos e imunomodulação.....	20
1.3. Desenho de peptídeos bioativos e a relação entre propriedades físico-químicas e função.....	23
1.4. enCrypted: programa de identificação e caracterização físico-química de peptídeos encriptados.....	24
1.5. Peptídeos utilizados neste trabalho.....	26
1.5.1. Schistocininas.....	27
1.5.2. Hylaseptina-1, Caspase-3 e Lycotoxina-1.....	28
1.5.3. Fenilseptinas.....	29
1.5.4. Piscidinas.....	29
1.5.5. Lunatina-1 e seus análogos.....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1. Parametrização físico-química dos peptídeos bioativos.....	36
4.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos.....	41
4.2.1. Síntese de peptídeos por fase sólida Fmoc.....	41
4.3. Caracterização bioquímica dos peptídeos sintéticos.....	43
4.3.1. Purificação dos peptídeos sintéticos por cromatografia líquida e identificação por espectrometria de massa.....	43
4.3.2. Quantificação dos peptídeos sintetizados.....	44
4.4. Atividade citotóxica e imunomodulatória dos peptídeos sobre	

macrófagos RAW 264.7.....	45
4.4.1. Cultivo e manutenção dos macrófagos RAW 264.7.....	45
4.4.2. Avaliação do efeito citotóxico dos peptídeos por ensaio de MTT.....	46
4.4.3. Quantificação de nitrito.....	47
4.5. Análises estatísticas.....	49
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1. Síntese química e caracterização bioquímica dos peptídeos de interesse.....	50
5.2. Peptídeos bioativos podem ser agrupados e classificados de acordo com suas características físico-químicas.....	55
5.3. Peptídeos não-citotóxicos estão concentrados no “Grupo 0”, enquanto peptídeos citotóxicos estão distribuídos entre os grupos 1, 2 e 3.....	58
5.4. Diferenças biofísicas significativas no Grupo 0 são indicativos promissores para o desenvolvimento racional de peptídeos não citotóxicos.....	67
5.5. Peptídeos bioativos podem modular a via do óxido nítrico em macrófagos RAW.....	74
5.6. Uma estratégia para o desenho racional de novos peptídeos bioativos sem atividade citotóxica pode ser proposta.....	78
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>93</b>



## 1. Introdução

### 1.1. Peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos representam uma classe diversificada de biomoléculas que podem desempenhar múltiplas atividades biológicas, como, por exemplo, efeitos antitumorais, antiparasitários e antibacterianos. Esses peptídeos podem ser sintetizados em laboratório ou serem extraídos de fontes naturais, tais como venenos animais, secreção da pele de anfíbios, hemolinfa de artrópodes, sementes de plantas, entre outras. Por serem moléculas ubíquas na natureza, os peptídeos bioativos podem desempenhar diferentes funções, principalmente em relação ao combate de patógenos durante a resposta imune de um organismo a uma infecção iminente.

Os peptídeos bioativos são moléculas diversas em tamanho, estrutura e especificidade, levando-os a serem frequentemente submetidos a diferentes abordagens de classificação. Os peptídeos bioativos podem ser classificados com base em vários critérios, incluindo a sua estrutura (como peptídeos desenovelados, com formação de  $\alpha$ -hélices ou folhas- $\beta$ ), o organismo de origem (como peptídeos extraídos de amostras biológicas de insetos, anfíbios, venenos de serpentes, etc.) e a seletividade para um alvo específico. Ainda, conforme revisado por Brogden (2005), é possível classificar os peptídeos bioativos em alguns subgrupos diferentes, que serão discutidos a seguir (Bahar A. A. e Ren D., 2013; Hoskin D. W. e Ramamoorthy, A., 2008; Brogden K. A., 2005).

- **Peptídeos antimicrobianos (AMPs):** os AMPs são provavelmente a classe de peptídeos bioativos mais estudada até os dias de hoje, devido ao seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos alternativos para infecções causadas por microorganismos diversos. Conforme revisado por Koo H. B. e Seo J. (2019), existem diversos AMPs em diferentes estágios de formulação na indústria farmacêutica. Dois exemplos de AMPs em estágio pré-clínico são os peptídeos D2A21<sup>1</sup> (Demegen<sup>®</sup>) e NP432<sup>2</sup>, ou Novarifyn (Novabiotics<sup>®</sup>), ambos peptídeos sintéticos com atividade antibacteriana e propostos como candidatos a

---

<sup>1</sup> Sequência do D2A21: FAKKFAKKFKKFAKKFAKFAFAF-OH

<sup>2</sup> Sequência do NP432: RRRFRFFFRFRRR-OH

antibióticos de uso tópico. Os AMPs, em geral, caracterizam-se por serem moléculas anfipáticas, compostas tanto por resíduos hidrofóbicos quanto por resíduos carregados positivamente. A carga líquida positiva dos AMPs, conferida por resíduos de aminoácidos como a lisina, por exemplo, é descrita como uma característica físico-química fundamental para a sua interação com as membranas celulares dos patógenos, que geralmente são compostas de moléculas carregadas negativamente, como lipopolissacarídeo (LPS), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA), permitindo a ocorrência de interações eletrostáticas (Koo H. B. e Seo J., 2019; Ballweber L. M., Jaynes J. E. e Lampe M. F., 2002; Brogden K. A., 2005; Li Y. et al., 2012; Gaspar D., Veiga A. S. e Castanho A. R. B., 2013; Mulder K. C. L., 2013; Sohlenkamp C. e Geiger O., 2015).

- **Peptídeos com carga líquida positiva (catiônicos):** estes se diferenciam do primeiro grupo por serem peptídeos extremamente ricos em resíduos carregados positivamente em pH neutro, como a lisina (K) e a arginina (R). Este subgrupo contém peptídeos que normalmente formam  $\alpha$ -hélices anfipáticas na presença de meios miméticos de membrana. Este é o caso do peptídeo Temporina-1CEa<sup>3</sup> (Shang D. et al., 2009), isolado da *Rana chensinensis*, cuja estrutura em hélice causa alterações na membrana de células tumorais, levando-as à necrose. (Brogden K. A., 2005; Li Y. et al., 2012; Gaspar D., Veiga A. S. e Castanho A. R. B., 2013; Hoskin D. W. e Ramamoorthy, A., 2008).
- **Peptídeos com carga líquida negativa (aniônicos):** são peptídeos ricos em resíduos carregados negativamente em pH neutro, sendo eles o ácido aspártico (D) e o ácido glutâmico (E). São muitas vezes explorados para a síntese de peptídeos quimeras mais seletivos, como é o caso da MMIS:Buforina-IIb<sup>4</sup>, uma quimera produto da junção de um peptídeo catiônico (Buforina-IIb<sup>5</sup>) e um peptídeo aniônico (Magainina<sup>6</sup>) (Jang J. H. et al., 2011).
- **Peptídeos que formam pontes dissulfeto:** são peptídeos que formam pontes dissulfeto devido à presença de resíduos de cisteína (C), que normalmente

<sup>3</sup> Sequência da Temporina-1CEa: FVDLKKIANIINSIF-NH<sub>2</sub>

<sup>4</sup> Sequência do MMIS:Buforina-IIb:

DAEAVGPEAADEEKDEEDGPLGIAGQRAGLQFPVG[RLLR]<sub>3</sub>-OH

<sup>5</sup> Sequência da Buforina IIb: RAGLQFPVG[RLLR]<sub>3</sub>-OH

<sup>6</sup> Sequência da Magainina: GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH

induzem à formação de estruturas secundárias do tipo folhas- $\beta$ . Os representantes mais conhecidos desta classe são as defensinas, que são citotóxicas para diferentes linhagens tumorais, e podem ser encontradas em células do sistema imune de seres humanos, plantas, animais, entre outros (Brogden K. A., 2005; Li Y. *et al.*, 2012; Hoskin D. W. e Ramamoorthy, A., 2008).

- **Peptídeos enriquecidos:** são peptídeos catiônicos que apresentam resíduos específicos em proporções maiores aos outros resíduos de sua estrutura. É o caso das Apidaecinas<sup>7</sup>, que são ricas em resíduos de prolina (P), sendo este responsável por 29% de sua estrutura primária (Casteels-Josson K. *et al.*, 1993). Estes enriquecimentos são normalmente empregados em modelos sintéticos de peptídeos com o intuito de aumentar a sua atividade antimicrobiana (Brogden K. A., 2005).
- **Peptídeos encriptados:** são descritos como peptídeos inseridos e criptografados em uma proteína maior, que podem ser fragmentos de proteínas gerados por uma proteólise, e que quando liberados podem ter funções biológicas similares ou distintas de sua matriz proteica. A obtenção de um peptídeo encriptado pode acontecer *in vivo*, *in vitro* e, mais recentemente, *in silico*. Simulações computacionais podem facilitar a identificação e propor peptídeos encriptados, como é o caso dos programas de computador Kamal e enCrypted (Brand G. D. *et al.*, 2019; Santos B. P. O. *et al.*, 2021), este último será melhor discutido no item 1.4.

Além de compreender a classificação desses peptídeos, é crucial entender os variados mecanismos de ação que essas moléculas empregam para desempenhar suas funções em um sistema biológico.

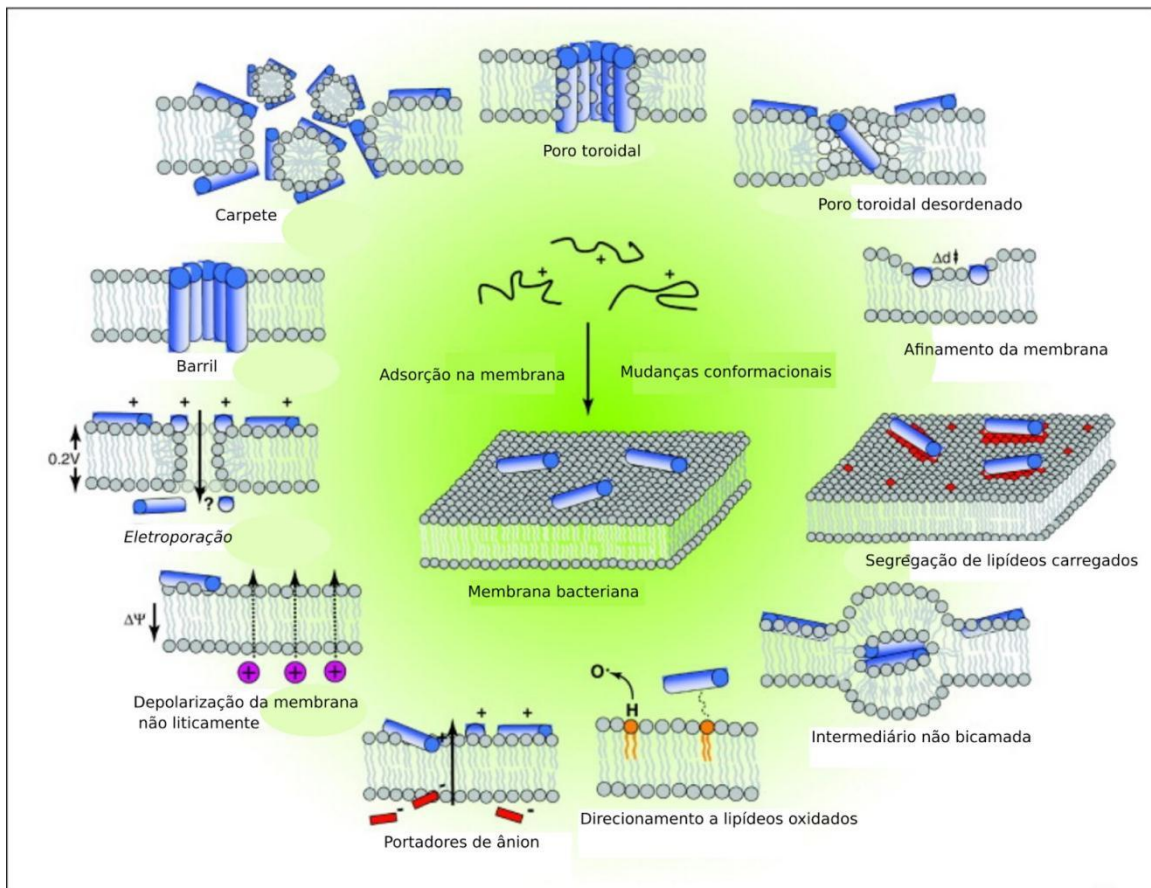
## 1.2. Mecanismos de ação dos peptídeos bioativos

### 1.2.1. Mecanismos de ação membranolíticos

---

<sup>7</sup> Sequência da Apidaecina: GNNRPVYISQPRPPHPRL-OH

Os mecanismos de ação dos peptídeos bioativos são geralmente explicados pela sua interação com membranas biológicas, o que pode resultar na lise de células patogênicas. A ruptura da membrana, ou até mesmo a formação de poros transmembranares, levam ao extravasamento de íons e de componentes citoplasmáticos vitais para a célula, resultando em sua morte (Mahlpuu M. *et al.*, 2016; Yeaman M. R. e Yount N. Y., 2003).



**Fig. 1. Esquema dos modelos de interação de peptídeos bioativos com membranas celulares.** Adaptado de Nguyen L. T., Haney E. F. e Vogel H. J., 2011. Após a inicial adsorção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) na membrana citoplasmática bacteriana, uma série de eventos se desencadeia, sendo que eles não são estritamente exclusivos entre si. Nos modelos clássicos de ruptura da membrana, os peptídeos atingem uma concentração crítica, inserindo-se na membrana e dando origem a poros alinhados no formato de barril. Isso resulta na solubilização da membrana em estruturas micelares, conforme observado no modelo de carpete, ou na formação de poros alinhados por peptídeos e lipídios, característico do modelo de poro toroidal. No modelo revisado de poro toroidal desordenado, a formação de poros ocorre de maneira mais desordenada e envolve menos peptídeos. A presença dos peptídeos pode afetar a espessura da bicamada, ou a própria membrana pode ser reorganizada para criar domínios ricos em lipídios aniônicos ao redor dos peptídeos. Em situações mais específicas, podem ocorrer intermediários não-bicamada na membrana. A adsorção de peptídeos à membrana pode

ser otimizada ao direcioná-los para fosfolipídios oxidados. Em alguns casos, um peptídeo pode se ligar a pequenos ânions através da bicamada, resultando em seu efluxo. O potencial de membrana pode ser dissipado sem causar danos perceptíveis, ou, inversamente, no modelo de eletroporação molecular, o acúmulo de peptídeos na folha externa eleva o potencial de membrana acima de um limiar, tornando a membrana transitoriamente permeável a várias moléculas, incluindo os próprios peptídeos.

A atividade membranolítica dos peptídeos é tradicionalmente descrita por modelos clássicos baseados nas diferentes orientações que essas moléculas podem assumir ao interagir com a membrana biológica. O modelo de tapete postula que a membrana se desestabiliza e colapsa devido à tensão gerada pelo peptídeo. De forma semelhante, no modelo detergente, a membrana também se desestabiliza, e, posteriormente, formam-se micelas devido à união entre os peptídeos e os lipídeos membranares. Outro modelo clássico é o de barril, que é baseado nas interações laterais entre os peptídeos que se inseriram na membrana do patógeno, formando uma estrutura em "barril" que desestabiliza a organização dos fosfolipídios. Em contrapartida, de acordo com o modelo de poro toroidal, os peptídeos não interagem entre si ao se inserirem na membrana, e assim formam poros que afetam a sua estrutura e curvatura (Wimley W. C., 2010). Todos estes modelos estão resumidos na Figura 1.

Por fim, apesar do foco de estudos de mecanismos de ação de peptídeos estar na ação membranolítica, existem outras maneiras pelas quais essas moléculas podem atuar. Todos os modelos de mecanismos de ação são importantes para se construir uma compreensão abrangente de como os peptídeos bioativos exercem suas atividades em sistemas biológicos.

### **1.2.2. Mecanismos de ação não-membranolíticos: alvos alternativos e imunomodulação**

Atualmente, pesquisas têm investigado peptídeos bioativos que atuam por meio de mecanismos não-membranolíticos, ou seja, que exercem suas funções biológicas sem provocar a lise celular. Alguns peptídeos podem alterar a integridade da membrana e atravessá-la, para então alcançar alvos intracelulares. Os mecanismos propostos neste caso incluem bloqueio da síntese de RNA,

bloqueio da síntese de proteínas, inibição da respiração celular e efluxo de ATP e NADH por ruptura da membrana mitocondrial (Wu Y. e Jin W., 2020; Nguyen L. T., Haney E. F. e Vogel H. J., 2011; Teixeira V., Feio M. J. e Bastos M., 2012; Bahar A. A. e Ren D., 2013).

Alguns exemplos de peptídeos com ação não-lítica são revisados por Bahar e Ren (2013). Por exemplo, o peptídeo PR-39<sup>8</sup>, proveniente do intestino de porcos, consegue eliminar bactérias de forma não-lítica, parando a síntese de DNA e de proteínas, agindo de forma semelhante a uma protease. Já a histatina-5<sup>9</sup> é capaz de inibir proteases de bactérias que causam periodontite, o que gera a inibição da destruição do tecido da gengiva. Também são reportados na literatura alguns peptídeos que agem intracelularmente em células que se encontram em estágios de crescimento específicos (Bahar A. A. e Ren D., 2013; Boman H. G., Agerberth A. e Boman A., 1993; Nishikata M. *et al.*, 1991).

Existem ainda peptídeos que exercem suas funções por meio da imunomodulação, ou seja, aumentando ou diminuindo alguma resposta de células do sistema imune, por meio da regulação de vias bioquímicas ativadas ou inibidas durante uma infecção. Alguns autores definem a imunomodulação como a capacidade de influenciar o estresse oxidativo (Jakubczyk A. *et al.*, 2020), e isso abrange a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Por sua vez, o óxido nítrico é um gás radical instável que, ao reagir com o oxigênio, produz outros radicais como o nitrito e o nitrato. Em um sistema biológico, o NO é quase que instantaneamente oxidado após a enzima NO-sintase se tornar cataliticamente ativa (Pavlicevic M., Marmioli P. e Maestri E., 2022; Jakubczyk A. *et al.*, 2020).

A via do óxido nítrico desempenha um papel importante na resposta imune, especialmente em células fagocíticas, como os macrófagos, durante infecções por patógenos intracelulares. O NO e seus derivados são conhecidos por serem efetores antimicrobianos, combatendo uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitos e vírus. No entanto, os detalhes precisos desses mecanismos muitas vezes permanecem incompletos. Além de sua ação

---

<sup>8</sup> Sequência do PR-39: RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP-NH<sub>2</sub>

<sup>9</sup> Sequência da Histatina-5: DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY-OH

antimicrobiana direta, o NO também regula a produção de mediadores inflamatórios, influenciando processos como agregação plaquetária, aderência de leucócitos e a resposta inflamatória como um todo. Adicionalmente, a conversão do nitrato em nitrito por bactérias comensais no sistema gastrointestinal de vertebrados resulta em uma acidificação no estômago e na pele, constituindo uma importante barreira inicial de defesa epitelial para o hospedeiro (Fang F. C. *et al.*, 2002).

Dessa forma, reguladores da via do óxido nítrico despertam interesse biotecnológico, já que o efeito imunomodulador pode ser útil para a produção de novas drogas antiinflamatórias, antibacterianas, antiparasitárias, entre outras. Alguns peptídeos têm sido explorados em outros trabalhos da literatura com o objetivo de encontrar moléculas que induzem a produção de NO. Este é o caso do peptídeo Phylloseptina-1<sup>10</sup> (Kückelhaus S. A. *et al.*, 2020), que a 32 µM (24h de tratamento) aumentou a produção de NO e liberação de fator de crescimento transformador-β (TGF-β) em macrófagos não-infectados e infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*, além de ter sido observada atividade leishmanicida nas mesmas condições. É hipotetizado que o efeito modulador da produção de NO auxilie na atividade antiparasitária observada para a Phylloseptina-1. Outro peptídeo que modula a via do óxido nítrico é o Peptídeo-C<sup>11</sup> (Kitamura T. *et al.*, 2003), uma molécula pró-insulina que atua na homeostase vascular. Neste caso, foi observado que células endoteliais da aorta de ratos Wistar, estimulados com Peptídeo-C por 3h, tiveram a concentração de NO dobrada em relação à concentração basal. Essa estimulação também aumentou o conteúdo de mRNA da enzima NO-sintase 3, o que é apontado como a causa do aumento da concentração de NO. Por isso, o Peptídeo-C é investigado como uma molécula pró-inflamatória. Outro exemplo é o peptídeo sintético NRWC<sup>12</sup>, desenhado por Shiri S. e colaboradores (2022), que dobrou a concentração de NO produzida por macrófagos J774 tratados com 200 µg/mL do peptídeo por 48h. Essa mesma concentração corresponde à concentração inibitória mínima (MIC) para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, duas bactérias patogênicas para seres

---

<sup>10</sup> Sequência da Phylloseptina-1: FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH<sub>2</sub>

<sup>11</sup> Sequência do Peptídeo-C: EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ-OH

<sup>12</sup> Sequência do NRWC: NRWCFAGR-R-NH<sub>2</sub>

humanos. As atividades imunomoduladora e bactericida do peptídeo NRWC podem estar íntimamente correlacionadas (Shiri S., Hasani F. e Fasihi-Ramandi M., 2022).

Tendo em vista o amplo espectro de alvos e mecanismos de ação dessas moléculas, o desenho de peptídeos bioativos com propriedades terapêuticas e aplicações biotecnológicas tem sido uma área de pesquisa em destaque.

### **1.3. Desenho de peptídeos bioativos e a relação entre propriedades físico-químicas e função**

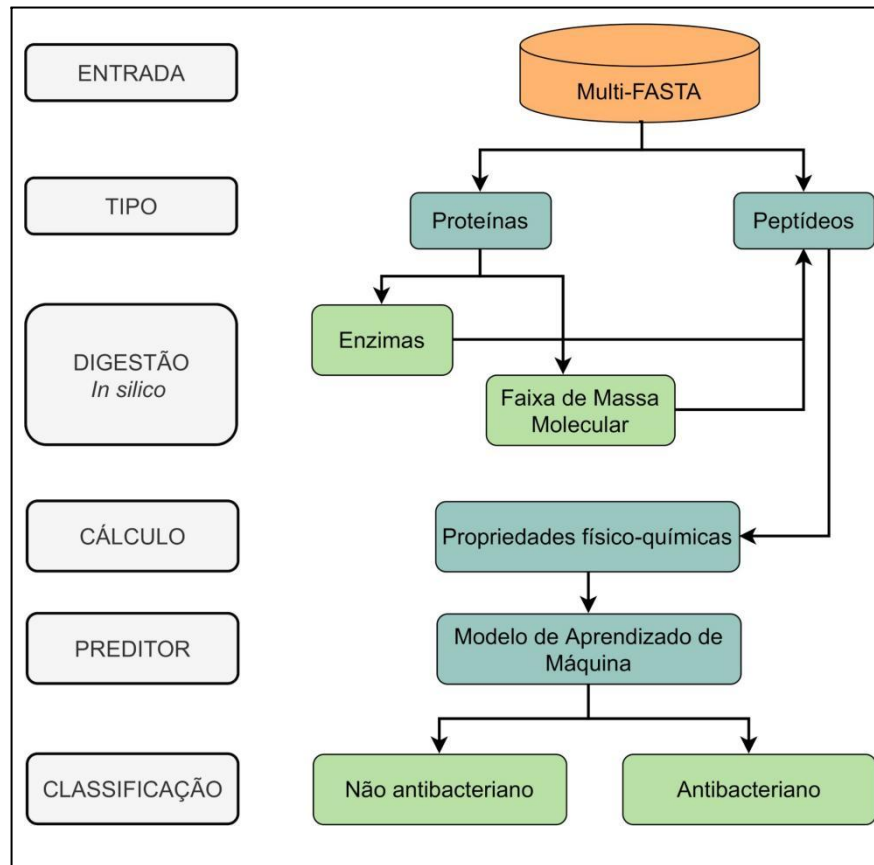
A obtenção de peptídeos sintéticos, em geral, envolve a criação de moléculas catiônicas e anfipáticas, ou seja, peptídeos com interfaces hidrofílicas e hidrofóbicas, possibilitando assim uma interação eficaz com os fosfolipídios presentes nas membranas-alvo. No entanto, peptídeos excessivamente carregados podem demonstrar alta toxicidade em relação às células eucarióticas, limitando, assim, seu potencial terapêutico (Greco I. *et al.*, 2020). Por outro lado, peptídeos com alta hidrofobicidade podem apresentar dificuldades na administração, e a combinação de características hidrofílicas e hidrofóbicas em um único peptídeo pode, por vezes, resultar em AMPs ineficazes (Mueller L. K. *et al.*, 2020).

Para se obter peptídeos com atividades biológicas específicas, é possível adotar uma abordagem estratégica e desenhá-los racionalmente, o que permite a inclusão de características fundamentais para a finalidade pretendida (Wheeler L. C. *et al.*, 2020). Durante o desenho racional de peptídeos, é crucial realizar uma seleção criteriosa das propriedades a serem consideradas, e não apenas incorporar de forma indiscriminada um grande número de atributos durante o processo. Para isso, ferramentas computacionais podem auxiliar na proposição de novos peptídeos e na prospecção de características biofísicas fundamentais para suas atividades. Uma dessas ferramentas é o enCrypted, ferramenta utilizada neste trabalho e que será discutida no próximo item.



#### **1.4. enCrypted: programa de identificação e caracterização físico-química de peptídeos encriptados**

O programa enCrypted, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, tem por objetivo principal identificar peptídeos potencialmente antibacterianos encriptados dentro de estruturas primárias de proteínas, bem como classificar suas características biofísicas (Santos B. P. O. *et al.*, 2021, disponível em <https://github.com/bposantos/encrypted>). No caso deste trabalho, o enCrypted foi utilizado exclusivamente para se obter os valores de 19 atributos físico-químicos dos peptídeos de interesse. Tais atributos foram: volume, massa molecular, porcentagem de resíduos básicos, porcentagem de resíduos carregados, porcentagem de resíduos ácidos, porcentagem de resíduos não-polares, porcentagem de resíduos polares, porcentagem de resíduos aromáticos, porcentagem de resíduos enterrados, momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ponto isoelétrico, carga, coeficientes de  $\alpha$ -hélice, coeficiente de folhas- $\beta$ , coeficiente de voltas, acessibilidade da cadeia principal ao solvente, acessibilidade de resíduos não-polares ao solvente, e acessibilidade de resíduos polares ao solvente. Os códigos e a bibliografia utilizados para se calcular cada um dos parâmetros são referenciados no repositório GitHub citado anteriormente. Resumidamente, o programa enCrypted fornece peptídeos encriptados em uma proteína, ao extraí-los de sua estrutura primária e propô-los como peptídeos bioativos com possível atividade antimicrobiana, como ilustrado na Fig. 2. Além disso, ele também determina os diferentes atributos físico-químicos dos peptídeos com base em equações e valores pré-estabelecidos de cada aminoácido que o compõe, como valores individuais de massa, acessibilidade ao solvente e hidrofobicidade de um resíduo de aminoácido.



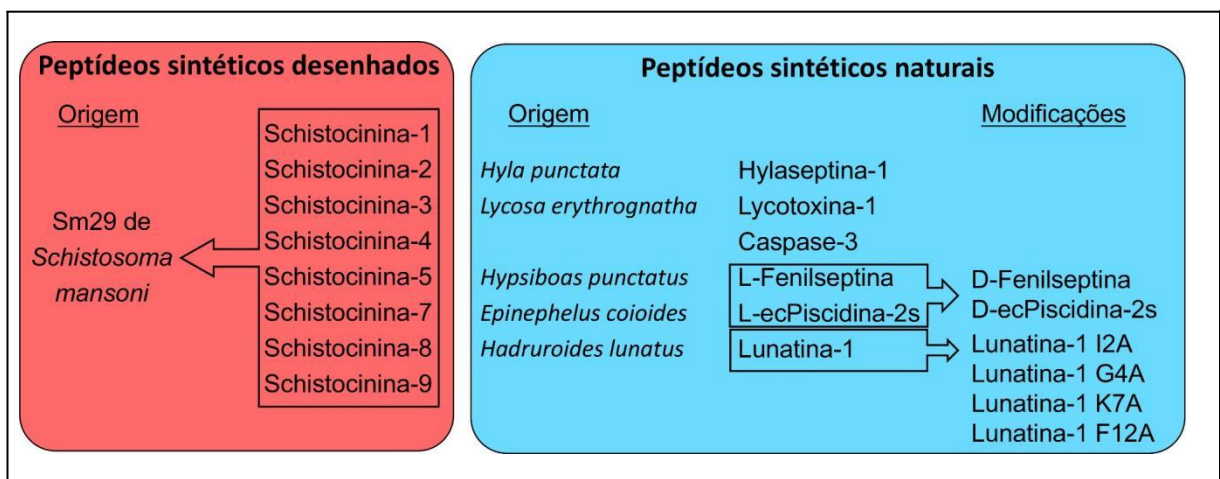
**Fig. 2. Esquema do funcionamento geral do programa enCrypted.** Imagem de Santos B. P. O., 2021 (Tese: “Caracterização biofísica e estrutural de criptídeos antimicrobianos: Estudo da porção antigênica da proteína SmKI-1 de *Schistosoma mansoni*”). No presente trabalho, o programa foi utilizado apenas até a etapa de cálculo das propriedades físico-químicas, por meio da seleção do tipo peptídeo.

A coleta dos dados das características biofísicas dos peptídeos desempenhou um papel fundamental neste trabalho, uma vez que a partir dela foi possível fazer a classificação e a clusterização dos peptídeos de interesse e também os disponíveis na biblioteca de peptídeos do LBM. Entretanto, apesar de mecanismos de reconhecimento de padrões serem úteis para tomadas de decisões de problemáticas biológicas, é necessário que haja validação experimental dos poderes preditivos de uma ferramenta bioinformática para que se estabeleça uma relação entre dados obtidos *in silico* e a realidade em um sistema biológico da melhor forma possível. Por causa disso, no presente trabalho, buscou-se validar o poder preditivo do enCrypted em relação a peptídeos não-citotóxicos, além de gerar dados experimentais que possam alimentá-lo futuramente, melhorando suas

previsões. Para isso, alguns peptídeos bioativos foram escolhidos para a realização dos experimentos, que serão descritos a seguir.

### 1.5. Peptídeos utilizados neste trabalho

Neste trabalho, foram utilizados peptídeos de diferentes origens, evidenciados na Fig. 3. As schistocininas (Schisn) são peptídeos encriptados desenhados a partir da proteína Sm29 do verme *Schistosoma mansoni*. A hylaseptina-1 (Hsp1) é um peptídeo natural isolado do anfíbio *Hyla punctata*. A lycotoxina-1 (LyeTx1) é um peptídeo extraído do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. A caspase-3 (Cas3) é uma molécula derivada de proteases do sistema imune humano. A L-fenilseptina (L-Phes) é encontrada em secreções do anfíbio *Hypsiboas punctatus*, sendo a D-fenilseptina (D-Phes) seu epímero. A L-ecpiscidina-2s (L-ecPis2s) é proveniente de mastócitos do peixe *Epinephelus coioides*, sendo a D-ecpiscidina-2s (D-ecPis2s) seu isômero. A lunatina-1 (Lun1) é um peptídeo isolado do veneno do escorpião *Hadruides lunatus*, e seus análogos I2A, G4A, K7A e F12A foram desenvolvidos por meio da substituição de resíduos por uma alanina. Cada um deles será melhor discutidos a seguir.



**Fig. 3. Peptídeos sintéticos.** Peptídeos sintéticos de diversas origens foram utilizados neste trabalho. Os peptídeos descritos dentro do quadro vermelho, à esquerda, foram obtidos por desenho de peptídeos, enquanto os peptídeos do quadro azul, à direita, são peptídeos bioativos que podem ser obtidos em fontes naturais.

### 1.5.1. Schistocininas

As schistocininas fazem parte do conjunto de peptídeos sintetizados e testados neste trabalho, sendo elas: Schistocinina-1 (LYIDDQISCCSTDLCNGMT-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-2 (NTDLCNGLTVDNTG-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-3 (VTTRGSGIIS-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-4 (YIMVNILD-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-5 (EYIGIFLYIMVNILD-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-6 (LSIHRHVIIIVLFCIGIS-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-7 (NYSIHRICVF-NH<sub>2</sub>), Schistocinina-8 (TAGYNYSIHRICVF-NH<sub>2</sub>) e Schistocinina-9 (WEYIGIFLYIMVNILD-NH<sub>2</sub>).

As schistocininas são peptídeos que foram desenhados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o programa enCrypted. Posteriormente, foram sintetizados e purificados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor colaborador Dr. Rodrigo Moreira Verly, do Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB/UFVJM). Os peptídeos em questão foram propostos pelo programa enCrypted, visando uma possível atividade antibacteriana de fragmentos da proteína Sm29 (dados não publicados). Como descrito por Cardoso F. C. e colaboradores (2006), a Sm29 é uma proteína transmembranar encontrada no tegumento de trematódeos adultos da espécie *Schistosoma mansoni*. A proteína Sm29, cuja estrutura primária está evidenciada na Fig. 4, contém um peptídeo sinal de 26 aminoácidos, sítio de clivagem entre a serina 26 (S26) e a valina 27 (V27), três sítios de glicosilação e alta hidrofobicidade entre os resíduos de lisina 169 (K169) e leucina 191 (L191). Os estudos realizados por estes pesquisadores revelaram que anticorpos IgG1 e IgG3 para Sm29 recombinante são encontrados nos soros de indivíduos resistentes à infecção por *S. mansoni*, fazendo com que a Sm29 seja uma candidata promissora para a elaboração de uma nova vacina contra a esquistossomose, nome dado à infecção pelo verme (Cardoso F. C. *et al.*, 2006). A sequência de 191 aminoácidos descrita na Fig. 4 é referente à proteína Sm29, e as regiões que formam as nove schistocininas são destacadas em vermelho escuro. Mais informações sobre a proteína Sm29 podem ser encontradas em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O96368/entry>.

```
>tr|O96368|O96368_SCHMA Sm29 OS=Schistosoma mansoni OX=6183
GN=Sm29 PE=2 SV=1
```

```
MKSGWEYIGIFLYIMVNILDKQRCHSVRCYVCDYCPIVTSVSISEENNCTSCS
TAGYNYSIHRICVFKDGIPINFPNENRTQCNTDLCNGLTVDNTGKIPSVPIAN
PFRCYTCLNCTKSNQKVLGCGACVTRRGSGLIISKFCGTTTCERLYIDDQISC
CSTDLCNGMTKLSIHRHVIIVLFVCIGISKYIL
```

**Fig. 4. Estrutura primária da proteína Sm29.** A proteína Sm29 (*Schistosoma mansoni*) possui 191 aminoácidos e deu origem aos peptídeos Schistocininas 1 ao 9, destacados em vermelho-escuro.

### 1.5.2. Hylaseptina-1, Caspase-3 e Lycotoxina-1

A Hylaseptina-1 (Hsp1) é mais um AMP derivado de amostras biológicas de anfíbios, sendo originalmente isolado da secreção dérmica da perereca *Hyla punctata*. A Hsp1 (GILDAIKAIKAAG-NH<sub>2</sub>) é um peptídeo catiônico anfipático que forma  $\alpha$ -hélice e produz atividade contra diversos microorganismos patogênicos, como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, em trabalhos anteriores, a Hsp1 não apresentou atividade hemolítica significativa contra leucócitos e eritrócitos (Prates M. V. *et al.*, 2004; Junior E. F. C. *et al.*, 2017).

A Lycotoxina-1 (LyeTx1) é um peptídeo encontrado no veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. A LyeTx1 (IWLTKALKFLGKNLKGKHLAKQQLAKL-NH<sub>2</sub>) faz parte da família das lycotoxinas, peptídeos isolados de espécies do gênero *Lycosa* sp., reportados pela primeira vez Yan L. e Adams M. E. (1998). Essa família de peptídeos normalmente apresenta moléculas anfipáticas e helicoidais, com amplo espectro de atividade antimicrobiana. Particularmente, a LyeTx1 apresentou, em outros trabalhos, atividade contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Olivo E. A. C., 2016; Santos D. M. *et al.* 2009; Yan L. e Adams M. E., 1998)

Já a Caspase-3 (Cas3) (FIGLLKKITNFF-NH<sub>2</sub>) é um peptídeo helicoidal fragmento da protease humana caspase 3. As caspases são cisteíno-proteases

responsáveis pela ativação da cascata das caspases e por alterações morfológicas nas células, em situações de morte celular por apoptose. A ativação dessas enzimas desencadeiam a fragmentação do DNA e a condensação da cromatina, o que resulta na apoptose. Por causa disso, Gomes K. S. (2018) hipotetizou que o peptídeo Cas3 seria citotóxico, o que de fato foi observado para células HEK-293, HEPG2 e LUHMES (Fink S. L. *et al.*, 2005; Taylor R. C., Cullen S. P. e Martin S. J., 2008; Gomes K. S., 2018).

### 1.5.3. Fenilseptinas

As fenilseptinas (FFFDTLKKNLAGKVIGALT-NH<sub>2</sub>) são AMPs  $\alpha$ -helicoidais catiônicos lineares, que foram isoladas da secreção cutânea da perereca *Hypsiboas punctatus* (Munhoz V. H. O. *et al.*, 2021). De acordo com resultados de ressonância magnética nuclear (RMN), as configurações levógena (L-fenilseptina) ou dextrógena (D-fenilseptina) do carbono- $\alpha$  da fenilalanina na posição 2 provocam mudanças organizacionais notáveis na estrutura desses peptídeos (Magalhães M. T. *et al.*, 2013). Por causa disso, Magalhães e colaboradores (2013) investigaram a diferença na atividade antimicrobiana da L-Phes e D-Phes sobre alguns patógenos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Xanthomonas axonopodis*, e verificaram que o epímero D apresentava uma atividade antimicrobiana aumentada. Este efeito ocorre, aparentemente, devido à maior hidrofobicidade da D-Phes, que favorece as interações  $\pi$  entre os resíduos do motivo FFF, como sugerido por Mijiddorj B. e colaboradores em 2019. Por esse motivo, investigações sobre as particularidades funcionais, estruturais e físico-químicas de epímeros, como a L-Phes e a D-Phes, são notavelmente importantes para o planejamento de estratégias para o desenvolvimento racional de antimicrobianos mais eficazes.

### 1.5.4. Piscidinas

As piscidinas são AMPs isolados de mastócitos de diferentes espécies de robalos comerciais, e desempenham funções cruciais no sistema imunológico inato

desses peixes. São peptídeos lineares e anfipáticos, com N-terminal normalmente rico em F e H. As piscidinas têm atraído atenção como alternativas promissoras para antibióticos clássicos, devido ao seu espectro amplo de atividade contra diferentes microorganismos. Apesar disso, por serem promíscuas e não apresentarem seletividade de alvos, as piscidinas têm potencial terapêutico limitado. Assim, vários esforços têm sido feitos para projetar análogos sintéticos desses peptídeos que sejam mais seletivos e que possuam citotoxicidade reduzida para células de mamíferos (Raju S. V. *et al.*, 2021).

Zhuang e colaboradores (2017) identificaram três novas piscidinas parálogas às piscidinas clássicas, denominadas ecPiscidina-2 (ec-Pis2), ecPiscidina-3 (ec-Pis3) e ecPiscidina-4 (ec-Pis4), clonadas do peixe *Epinephelus coioides*. O peptídeo ecPis2s (FFFHIIKGLFHAGRMHGLV-NH<sub>2</sub>), no qual o "s" indica a ausência do peptídeo sinal (NRRRHRHGMEELDLQRAFEREKAFKA), demonstrou a mais alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* entre os peptídeos testados no trabalho de Zhuang. Além disso, a ecPis2s foi caracterizada como uma molécula catiônica em pH 8,5, com C-terminal amidado e que possui atividade contra outros microorganismos, sendo eles *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Pichia pastoris* (Zhuang Z. *et al.*, 2017).

Neste trabalho, estudou-se as propriedades físico-químicas da ec-Pis2s e sua relação com a atividade citotóxica em macrófagos murinos. Foi utilizada uma abordagem de investigação dos isômeros D-ecPis2s e L-ecPis2s, com o intuito de estabelecer possíveis relações entre o aumento, a inibição ou a manutenção da atividade do peptídeo e a configuração espacial de seus resíduos.

### **1.5.5. Lunatina-1 e seus análogos**

As lunatinas são peptídeos isolados a partir do veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*, que teve sua composição explorada pela primeira vez em 1981 por Zavaleta A. e colaboradores. Entretanto, Santana H. F. (2012) foi o primeiro a realizar investigações sobre a diversidade peptídica do veneno, tendo caracterizado dois peptídeos bioativos, a Lunatina-1 (FIGLLKTLTSFF-NH<sub>2</sub>) e a

Lunatina-2 (FLSTIANIVGGILGGGAL-NH<sub>2</sub>). No trabalho de Santana H. F. (2012), a Lunatina-2 (Lun2) não apresentou atividade antimicrobiana nas condições testadas. Já a Lunatina-1 (Lun1) apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de também aumentar a produção de ROS em células HL60, como descrito por Gomes K. S. (2018). Por causa disso, em 2018, Gomes K. S. investigou a relação estrutura-função da Lun1 e seus 13 análogos, obtidos por uma técnica denominada Alanina-Scan, que consiste na substituição de cada resíduo de aminoácido por um resíduo de alanina (A) (Zavaleta A. *et al.*, 1981; Santana H. F., 2012).

O resíduo de A é usado neste caso por ser um aminoácido com cadeia lateral não-reativa, pouco volumosa e que limita a mobilidade conformacional dos ângulos diédricos da cadeia peptídica. Assim, a Alanina-Scan permite verificar a importância de cada resíduo substituído sem que haja uma mudança conformacional do peptídeo original, facilitando a interpretação do resultado que será feita apenas dentro de um aspecto químico da cadeia lateral.

Dentre os 13 análogos da Lun1, os peptídeos Lun1 I2A (FAGLLKTLTSFF-NH<sub>2</sub>), Lun1 G4A (FIGALLKTLTSFF-NH<sub>2</sub>), Lun1 K7A (FIGLLATLTSFF-NH<sub>2</sub>) e Lun1 F12A (FIGLLKTLTSAF-NH<sub>2</sub>) foram escolhidos para serem investigados no presente trabalho. As substituições da isoleucina (I) na posição 2 e da fenilalanina (F) na posição 12 significam a troca de um aminoácido com cadeia lateral maior e mais complexa do que a cadeia lateral da A, o que favorece a perda de interações hidrofóbicas e, possivelmente, a perda ou diminuição da atividade citotóxica. Já a substituição da glicina (G), que possui cadeia lateral menor que a da alanina, pode favorecer a interação com outras proteínas, aumentando sua atividade. Entretanto, como observado por Gomes K. S. (2018), este ganho na atividade deve ser posição-específico, uma vez que, em seu trabalho de dissertação, o análogo Lun1 G3A não apresentou aumento da atividade citotóxica para células HL60, mas o análogo Lun1 G4A sim. Quanto à substituição da lisina (K) na posição 7 por A, pode ser observada a perda total da atividade da lunatina, muito provavelmente devido à perda da carga positiva do peptídeo, que impossibilita a interação com elementos carregados negativamente nas membranas celulares.



Os resultados obtidos por Gomes K. S. (2018) são relativos às atividades dos peptídeos sobre a linhagem HL60. Como a atividade varia de acordo com a linhagem celular que está sendo desafiada, outros testes de citotoxicidade da Lun1 e seus análogos devem ser feitos com outras linhagens celulares, com o intuito de abranger o conhecimento da atividade destes peptídeos.

## 2. Justificativa

Como descrito anteriormente, os peptídeos bioativos são moléculas que carregam consigo grande potencial biotecnológico, principalmente em relação aos seus efeitos antimicrobianos. Entretanto, alguns desses peptídeos são citotóxicos para células hospedeiras, pois, por serem membranolíticos, podem não só resultar na lise do patógeno, mas também na morte da célula do sistema imune do hospedeiro. Este comportamento não é o ideal quando se objetiva o desenvolvimento de drogas alternativas para o tratamento de algumas infecções, uma vez que uma molécula tóxica para o organismo não é ideal para a composição de um fármaco. Por causa disso, peptídeos bioativos pouco ou não-citotóxicos podem ser obtidos por meio do desenho racional realizado computacionalmente, que por sua vez deve considerar propriedades físico-químicas importantes para se obter uma molécula antimicrobiana não tóxica para o hospedeiro. Neste caso, predições de ferramentas computacionais utilizadas no processo devem ser validadas experimentalmente, com o intuito também de aprimorá-las.

Dessa forma, compreender e validar as características físico-químicas e os mecanismos subjacentes aos peptídeos bioativos certamente pode contribuir para o desenvolvimento de peptídeos eficazes e seguros, que poderão ser utilizados como estratégias inovadoras no contínuo combate às doenças infecciosas.

### 3. Objetivos

Em consonância com as justificativas anteriormente mencionadas, o objetivo principal deste trabalho foi identificar os possíveis atributos físico-químicos responsáveis pela atividade citotóxica de peptídeos bioativos utilizando modelo de macrófagos murinos.

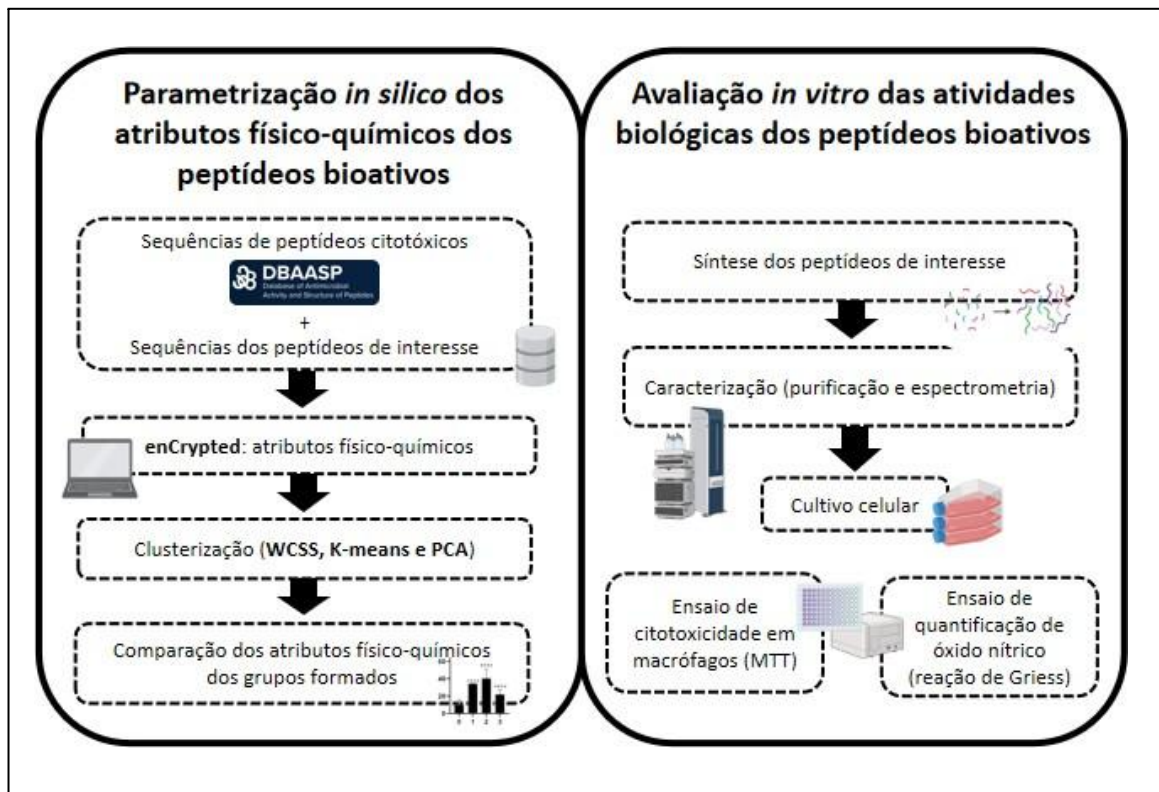
Para isso, visamos responder às seguintes perguntas:

- Quais são as características físico-químicas de cada um dos peptídeos bioativos sintetizados? Como elas se correlacionam com as atividades biológicas?
- É possível classificar os peptídeos bioativos em peptídeos citotóxicos ou peptídeos não-citotóxicos com base em seus atributos físico-químicos?
- O desenho racional de peptídeos não-citotóxicos para macrófagos murinos pode ser guiado apenas com base em propriedades físico-químicas específicas?

Para responder a essas perguntas e alcançar os objetivos e metas, empregamos os métodos que serão descritos no item 4.

#### 4. Material e métodos

Para alcançar os objetivos propostos e responder às perguntas deste trabalho, foram utilizados os métodos esquematizados na Fig. 5. O fluxo de trabalho foi dividido em experimentos *in vitro* e análises *in silico*. Entretanto, estas partes não são isoladas, e sim complementares.



**Fig. 5. Esquema geral dos métodos.** O fluxo de trabalho deste estudo foi dividido em duas etapas, uma *in silico* e outra *in vitro*. O quadro da esquerda ilustra as etapas executadas para as análises *in silico* dos atributos físico-químicos dos peptídeos. O quadro à direita ilustra as etapas dos experimentos *in vitro* de obtenção de peptídeos e testes biológicos de citotoxicidade e quantificação de óxido nítrico.

#### 4.1. Parametrização físico-química dos peptídeos bioativos

Para mapear quais características físico-químicas podem delimitar o efeito citotóxico de um peptídeo, foi feita uma análise *in silico* de tais propriedades a partir das sequências de peptídeos bioativos. Para isso, foram utilizadas as sequências de 32 peptídeos de interesse do nosso grupo de pesquisa (incluindo lunatinas, schistocinas, schistocininas, piscidinas, fenilseptina, caspase-3, lycotoxina-1 e hylaseptina-1) e de 17 peptídeos conhecidamente citotóxicos para macrófagos. Estes últimos foram obtidos no *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (Banco de Dados de Atividade Antimicrobiana e Estruturas de Peptídeos, DBAASP, disponível em <https://dbaasp.org/home>), no qual foi realizada a busca por sequências de peptídeos que foram testados em macrófagos murinos RAW 264.7.

As informações bibliográficas de cada peptídeo resultante da busca foram manualmente revisadas, de forma que os peptídeos escolhidos para serem utilizados na análise fossem apenas aqueles que possuem atividade citotóxica em macrófagos RAW 264.7 evidenciada por ensaio de MTT (mesmo método utilizado no presente trabalho, conforme descrito no item 4.4.2.). As propriedades físico-químicas dos peptídeos foram acessadas por meio do programa enCrypted, que recebeu como *input* as sequências de cada peptídeo e forneceu os valores de: porcentagem de resíduos básicos, ácidos, polares, não-polares, aromáticos e enterrados; acessibilidade do solvente a resíduos polares, não-polares e da cadeia principal; volume; massa monoisotópica; ponto isoelétrico; momento hidrofóbico; hidrofobicidade; carga; coeficiente de propensão de formação de  $\alpha$ -hélices, de voltas e de folhas- $\beta$ .

A partir da obtenção dos valores dos atributos físico-químicos dos peptídeos de interesse, os resultados foram submetidos ao método WCSS (soma dos quadrados intra-*clusters*) para a obtenção do número ótimo de grupos (ou *clusters*) para estes dados. Posteriormente, a clusterização foi feita com o algoritmo K-means, e também foi realizada a análise de componente principal (PCA) e uma análise de carga para verificar quais das propriedades fornecidas eram significativas para a formação dos *clusters*. Cada uma das etapas descritas anteriormente foram realizadas com *scripts python* descritos abaixo.

**Código WCSS:** WCSS, também conhecido como “método do cotovelo” (do inglês *elbow method*), é uma forma de encontrar o valor K ótimo em uma clusterização com K-means. O número de *clusters* (K) varia de 1 a 10, e para cada um dos valores, o WCSS é calculado a partir da soma das distâncias ao quadrado entre cada ponto e a centróide de um *cluster*. O valor ótimo de K é definido pelo primeiro ponto do gráfico em que há uma mudança abrupta do valor do WCSS, formando um "cotovelo" (Syakur M. A. *et al.*, 2018).

```
# Importa as bibliotecas necessárias
import pandas as pd
import numpy as np
from sklearn.decomposition import PCA
from sklearn.cluster import KMeans

# Objetivo: determinar o número ótimo de clusters para os dados

# Recebe o arquivo csv com os dados a serem clusterizados
csv_path = input("Arquivo: ")
data = pd.read_csv(csv_path)
numeric_columns = data.columns[:-2]

# Normaliza os dados
normalized_data = (data[numeric_columns] -
data[numeric_columns].mean()) / data[numeric_columns].std()
normalized_data_array = normalized_data.values

# Calcula o WCSS
wcss_values = []
max_clusters = 10 # Define o número máximo de clusters que deseja
testar
for n_clusters in range(1, max_clusters+1):
    kmeans = KMeans(n_clusters=n_clusters)
    kmeans.fit(normalized_data_array)
    wcss_values.append(kmeans.inertia_)

# Calcula as distâncias entre os pontos no eixo y
distances = []
for i in range(1, len(wcss_values)):
    distance = abs(wcss_values[i] - wcss_values[i-1])
    distances.append(distance)
```

```

# Plota o gráfico do WCSS
import matplotlib.pyplot as plt
plt.plot(range(1, max_clusters+1), wcss_values, marker='o')
plt.xlabel('Número de clusters')
plt.ylabel('WCSS')
plt.title('WCSS x número de clusters')

# Plota as distâncias dos pontos do eixo y no gráfico
for i, distance in enumerate(distances):
    plt.annotate(f'{distance:.2f}', xy=(i+1, wcss_values[i]),
xytext=(i+1, wcss_values[i]+0.1), color='blue')
plt.show()

```

**Código PCA, K-means e análise de cargas:** PCA é uma técnica de redução de dimensionalidade que é frequentemente usada para simplificar conjuntos de dados complexos, mantendo as informações mais importantes em um número de dimensões menor. O K-means é um algoritmo de clusterização usado para dividir um conjunto de dados em grupos ou *clusters* com base em características semelhantes. A análise de cargas é baseada em um valor calculado de carga para cada variável em relação a cada componente principal do PCA. A análise de cargas do PCA ajuda a entender como as variáveis originais se relacionam com os componentes principais, e isso pode ser valioso ao interpretar os *clusters* resultantes do K-means, uma vez que se pode identificar as variáveis mais influentes para cada *cluster* (Ding C. e He X., 2004; Honda K., Notsu A. e Ichihashi H., 2010). A combinação dessas técnicas auxilia na compreensão mais profunda dos dados e dos *clusters*.

```

# Importa as bibliotecas necessárias
import pandas as pd
import numpy as np
import seaborn as sns
import os
import argparse
import sys
import matplotlib.pyplot as plt
from sklearn.decomposition import PCA

```

```
from sklearn.preprocessing import StandardScaler
from sklearn.cluster import KMeans

# Objetivo 1: clusterizar os dados com KMeans
# Objetivo 2: plotar a PCA em duas dimensões
# Objetivo 3: fazer a análise de cargas do PCA

# Configura o analisador de argumentos
parser = argparse.ArgumentParser(description='2D plot/PCA/kmeans
clustering')
parser.add_argument("-f", '--file', help="file_name.csv",
action="store")
parser.add_argument("-o", '--output', help="file name",
action="store")
parser.add_argument("-cl", '--n_clusters', help="file name",
action="store")
args = parser.parse_args()

# Define a dataframe a partir do arquivo csv com os dados a serem
plotados (arquivo resultante do enCrypted)
df1 = pd.read_csv(args.file)
cols = df1.columns.tolist()
cols = cols[-1:] + cols[:-1]
df1 = df1[cols]
df1.set_index(name, inplace=True)

##### Pré-tratamento dos dados #####
# Pré-processamento dos dados
scaling=StandardScaler() # transformador que realiza o
escalamento dos dados

# Ajusta e transforma os dados
scaling.fit(df1) # calcula a média e o desvio padrão de cada
característica (coluna) para usar no escalamento
Scaled_data=scaling.transform(df1)

# Define o número de componentes
principal=PCA(n_components=2)
principal.fit(Scaled_data)
df=principal.transform(Scaled_data)
```



```

##### K-Means #####
# Clusteriza com o algoritmo K-Means incorporado ao PCA
kmeans = KMeans(n_clusters=int(args.n_clusters), random_state=0)
previsoes = kmeans.fit_predict(df)

# Adiciona as coordenadas das centróides
centroids = kmeans.cluster_centers_
df1['Clusters'] = previsoes
df1.to_csv(args.output + '.csv')

##### PCA #####
# Plota os dados em um gráfico de dispersão
scatter = plt.scatter(df[:, 0], df[:, 1],
                      s=100,
                      c=df1['Clusters'],
                      cmap='rainbow',
                      linestyle='solid',
                      alpha=0.8,
                      linewidth=1,
                      edgecolor='black',
                      picker=True)

# Plota as centróides
plt.scatter(centroids[:, 0], centroids[:, 1], c='black',
           marker='o', s=100, label='Centroides')

# Adiciona uma legenda para as centróides
legend1 = plt.legend(*scatter.legend_elements(),
                    loc="lower left", title="Clusters",
                    fontsize=14)

# Calcula e exibe as variâncias das componentes principais
explained_variances = principal.explained_variance_
variance_labels = [f'{i + 1}: {variance:.2f}' for i, variance in
                   enumerate(explained_variances)]

# Adiciona rótulos aos eixos x e y com variância
plt.xlabel(f"PC 1 ({variance_labels[0]})", fontsize=16)
plt.ylabel(f"PC 2 ({variance_labels[1]})", fontsize=16)

# Plota o gráfico de PCA

```

```

plt.show()

##### Análise de cargas #####
# Calcula a contribuição dos atributos
labelstest = ['Volume', 'Resíduos Acídicos (%)', 'Resíduos Básicos (%)', 'Resíduos Carregados (%)', 'Momento Hidrofóbico', 'Hidrofobicidade', 'Ponto Isoelétrico', 'Massa Monoisotópica', 'Resíduos Não-Polares (%)', 'Resíduos Polares (%)', 'Resíduos Aromáticos (%)', 'Coeficiente de  $\alpha$ -Hélice', 'Coeficiente de Folhas- $\beta$ ', 'Coeficiente de Voltas', 'Carga', 'Resíduos Enterrados (%)', 'Acessibilidade do Solvente à Cadeia Principal', 'Acessibilidade do Solvente a Resíduos Não-Polares', 'Acessibilidade do Solvente a Resíduos Polares']

loadings = principal.components_
num_pc = principal.n_features_
pc_list = ["PC"+str(i) for i in list(range(1, num_pc+1))]
loadings_df = pd.DataFrame.from_dict(dict(zip(pc_list, loadings)))
df1.drop(['Clusters'],axis=1,inplace=True)
loadings_df['Atributos físico-químicos'] = labelstest
loadings_df = loadings_df.set_index('Atributos físico-químicos')

# Plota a Matriz de correlação
ax = sns.heatmap(loadings_df, annot=True, cmap='Spectral')
plt.show()

```

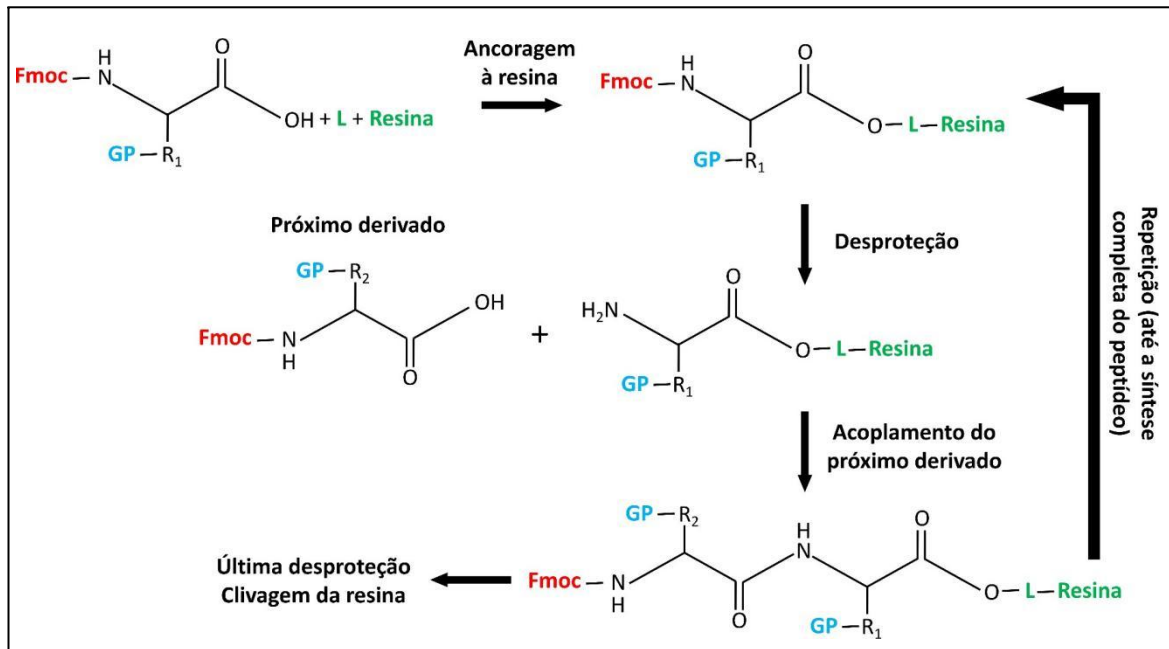
## 4.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos

### 4.2.1. Síntese de peptídeos por fase sólida Fmoc

Para obter os peptídeos de interesse, eles foram sintetizados utilizando o método de síntese em fase sólida por estratégia Fmoc (Chan W. C. e White P. D., 2000), esquematizado na Fig. 6. A síntese manual dos peptídeos foi realizada em seringas contendo a resina Rink Amide, que foi lavada com diclorometano (DCM) sob agitação. Para acoplar os derivados de aminoácidos, realizou-se primeiro a desproteção do derivado anterior, por meio de sucção de uma solução de piperidina (PIPE) 25% (v/v), sob agitação de 15 minutos. A solução de PIPE foi

descartada e o DCM succionado para lavagem, sob agitação de 2 minutos. Antes do processo de acoplamento, cada derivado foi devidamente preparado com quantidade e volumes calculados de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), dimetilformamida destilado (DMF) e diisopropilcarbodiimida (DIC). Por conseguinte, os acoplamentos foram realizados com a sucção da solução contendo o derivado, em excesso de 3x, sob agitação de 3h. Após o período de acoplamento, a resina foi lavada com DMF, DCM e isopropanol (IPA) por 1 minuto cada, 3 vezes. Para verificar se o acoplamento ocorreu corretamente, foi realizado o teste de ninidrina, que consiste em aplicar uma gota de cianeto, duas gotas de fenol e uma gota de ninidrina em uma pequena quantidade do conteúdo granulado da seringa, e aquecer em termobloco por 5 min. Com auxílio de uma lupa, foi observado se os grãos estavam transparentes ou não. Em caso positivo, foi considerado que o acoplamento foi bem sucedido, caso contrário, o processo seria repetido. O mesmo teste foi realizado após a desproteção de cada derivado, sendo que, quando foi observada uma coloração escura dos grãos, foi considerado que o derivado estava de fato desprotegido e apto para o acoplamento do próximo derivado. Caso contrário, a desproteção seria realizada novamente.

Após sintetizados, os peptídeos foram clivados da resina. Primeiramente, foi feito um cálculo do tempo de clivagem, que leva em consideração o maior tempo para clivar um dos grupos protetores de cadeia lateral presentes no peptídeo. Como solução de clivagem, foram utilizados triisopropilsilano (TIS) 2,5%, ácido trifluoroacético (TFA) 95% e água ultrapura 2,5% (v/v). A clivagem foi feita após a desproteção do último derivado acoplado, de forma que toda a solução de clivagem foi succionada com a seringa e deixada sob agitação durante o tempo calculado. O líquido da seringa contendo a solução e o peptídeo clivado foi armazenado em tubo tipo falcon, e o conteúdo foi seco com nitrogênio gasoso até a formação de uma substância colóide, de forma que o máximo possível de TFA evaporasse. Posteriormente, o peptídeo foi ressuscitado em éter diisopropílico gelado e centrifugado a 500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e essa etapa se repetiu cinco vezes. Por fim, o peptídeo foi seco novamente com nitrogênio gasoso até que o máximo de éter diisopropílico fosse removido e depois submetido ao processo de liofilização. Os peptídeos sintetizados foram armazenados em freezer -20 °C até o uso.



**Fig. 6. Esquema geral da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc.** A síntese se inicia com um derivado de aminoácido que possui seu N-terminal protegido pelo grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc, destacado de vermelho), e seu grupo lateral (R<sub>x</sub>) ligado a um grupo protetor (GP, em azul). Este primeiro derivado é acoplado a uma resina e seu ligante (L, em verde), e após uma primeira etapa de desproteção, ocorre o acoplamento do próximo derivado. Este processo se repete até a cadeia peptídica se completar. Finalmente, o peptídeo completo é clivado da resina.

### 4.3. Caracterização bioquímica dos peptídeos sintéticos

#### 4.3.1. Purificação dos peptídeos sintéticos por cromatografia líquida e identificação por espectrometria de massa

Os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de fase reversa, em coluna C<sub>18</sub> semipreparativa (Supelco, Discovery BIO Wide Pore C<sub>18</sub> HPLC Column, 25 cm x 10 mm, 5 μm). As purificações foram realizadas com um método de gradiente das fases móveis utilizadas, acetonitrila com TFA 0,1% (v/v) e água ultrapura acidificada também

com TFA 0,1% (v/v), sob temperatura de 45 °C. As frações coletadas foram liofilizadas, para posteriormente serem analisadas e identificadas por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-ToF MS), utilizando matriz de  $\alpha$ Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. As massas teóricas de cada peptídeo foram calculadas com a ferramenta *web* Peptide Mass Calculator (disponível em: <https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>). Todos os peptídeos foram mantidos em freezer -20 °C até o uso.

#### 4.3.2. Quantificação dos peptídeos sintetizados

Após as etapas cromatográficas, os peptídeos puros foram quantificados por espectrofotometria de absorção de UV-Vis. Cada peptídeo foi ressuspenso em água ultrapura, e uma alíquota da amostra concentrada foi retirada e diluída, também em água ultrapura. A diluição do peptídeo se faz necessária durante a quantificação por espectrofotometria, para que as leituras nos diferentes comprimentos de onda apresentem valores entre 0,9 e 0,2. Esta é a faixa ideal em que a maioria das substâncias obedecem a lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação direta entre a absorvância de uma solução e sua concentração, quando atravessada por feixes de radiação luminosa monocromática paralela (Lima L. S., 2013). No caso dos peptídeos sintetizados, os comprimentos de onda considerados foram os de 205, 215 e 225 nm. Para a obtenção das concentrações das amostras, foram feitos os seguintes cálculos:

$$[ ] = ((x + y) \div 2) \times D, \text{ onde:}$$

[ ] = concentração em  $\mu\text{g/mL}$ ;

$x = (\text{Absorbância a } 215 - \text{Absorbância a } 225) \times 144$  (Waddell W. J., 1956);

$y = \text{Absorbância a } 205 \times 31$  (Scopes R. K., 1974);

$D$  = fator de diluição.

Para peptídeos com triptofano ( $W$ ) em sua estrutura, o cálculo da quantificação foi realizado no comprimento de onda de 280 nm e considerando o seu coeficiente de extinção molar, que está relacionado com o quanto de luz em um comprimento de onda específico cada mol do peptídeo é capaz de absorver ou refletir (Grimsley G. R. e Pace C. N., 2004). O cálculo é feito de acordo com a Lei de Lambert-Beer, da seguinte forma:

$$[\ ] = (A_{280}/\varepsilon \times l) \times D, \text{ onde:}$$

$[\ ]$  = concentração em M;

$A_{280}$  = Absorbância a 280 nm;

$\varepsilon$  = Coeficiente de extinção molar em M;

$l$  = Comprimento, em cm, do caminho óptico da cubeta;

$D$  = fator de diluição.

#### **4.4. Atividade citotóxica e imunomodulatória dos peptídeos sobre macrófagos RAW 264.7**

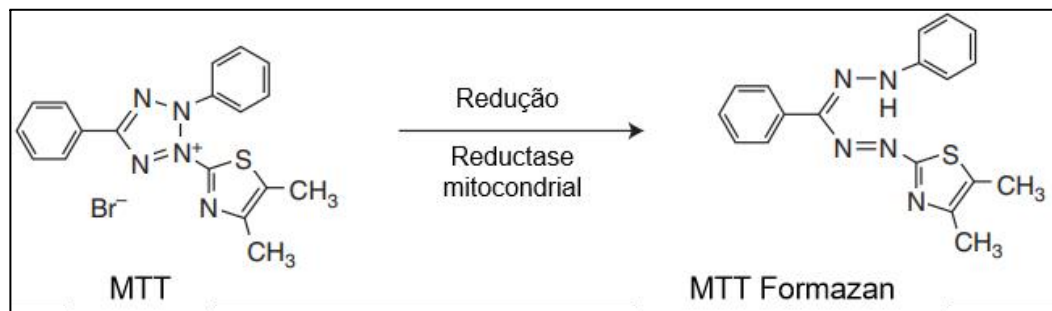
##### **4.4.1. Cultivo e manutenção dos macrófagos RAW 264.7**

Macrófagos murinos da linhagem tumoral RAW 264.7 foram cultivados em garrafas para cultura celular, com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), incubados em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Por serem células que se anexam à superfície da placa, no momento de sua utilização, a desagregação foi realizada por meio de tripsinização durante 5 min, e também mecanicamente com o uso de raspadores de células. Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas células com no máximo 8

passagens, e para os ensaios de quantificação de óxido nítrico, foram utilizadas células de no máximo 3 passagens.

#### 4.4.2. Avaliação do efeito citotóxico dos peptídeos por ensaio de MTT

A avaliação do efeito citotóxico de cada peptídeo foi realizada por ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Entre os diversos testes de viabilidade que envolvem a conversão de um substrato em um produto cromogênico por células vivas, o ensaio de MTT se destaca como um dos métodos mais versáteis. Nesse processo, o corante amarelo MTT, solúvel em água, é reduzido por redutases mitocondriais em um composto sólido roxo e insolúvel conhecido como formazan (Fig. 7). A concentração de formazan é posteriormente determinada através da medição de sua densidade óptica a 570 nm. Os valores de absorvância podem ser relacionados diretamente com valores estimados de viabilidade celular.



**Fig. 7. Formação de cristais de formazan.** Imagem modificada de Kumar P., Nagarajan A. e Uchil P, 2018. O MTT, um composto amarelo e solúvel em água, é reduzido por redutases mitocondriais e há a formação dos cristais de formazan, que são compostos sólidos e insolúveis em água.

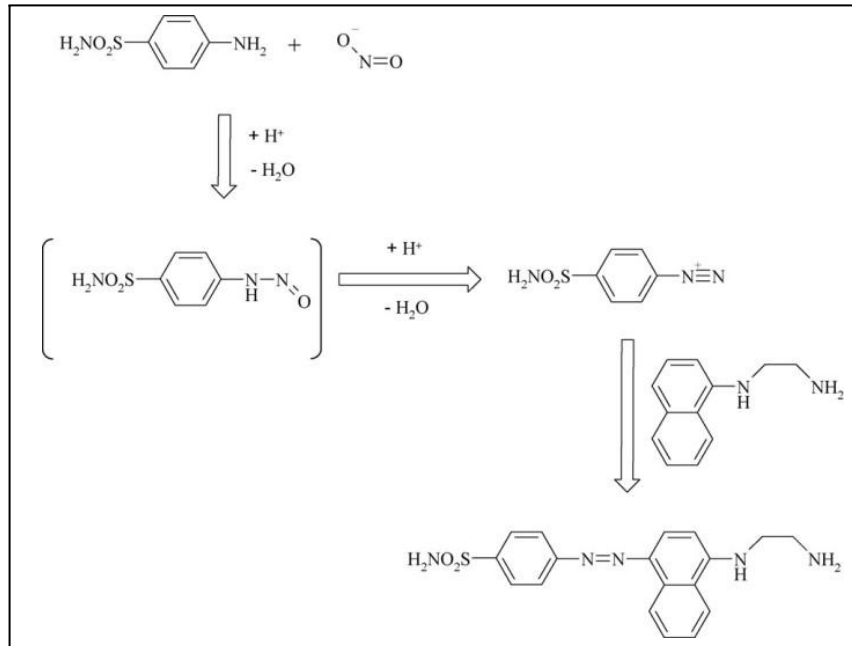
Para a realização do ensaio, os macrófagos RAW foram contados em câmara de Neubauer e semeados em uma concentração de  $10^5$  células por poço, em placas de 96 poços com fundo chato. Os macrófagos aderiram à superfície do material por cerca de 24h. Após este período, os peptídeos, anteriormente diluídos em PBS 1x e meio de cultura, foram filtrados em filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  e aplicados na

placa, de forma que os primeiros poços (linha A) começaram com 100  $\mu\text{M}$  de peptídeo. A diluição seriada de cada peptídeo foi realizada até a concentração de 0,78  $\mu\text{M}$ , e de forma que todos os poços ficaram com 150  $\mu\text{L}$  finais. O detergente triton X-100 0,1% (v/v) e macrófagos não tratados foram utilizados como controles para este experimento. Após os períodos de 24 e 48 horas de incubação com os peptídeos, o MTT (0,5 mg/mL de meio de cultura) foi aplicado em cada poço. Protegidas de luz, as placas foram incubadas novamente em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 3 horas. Posteriormente, o excesso de meio de cada poço foi retirado e os cristais de formazan formados foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica foi medida a 570 nm e os valores de absorbância foram relacionados com a porcentagem de células viáveis, de forma que a absorbância do controle (macrófagos sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis. Para cada peptídeo e em cada tempo diferente, foram executadas triplicatas técnicas e experimentais.

#### **4.4.3. Quantificação de nitrito**

A avaliação do efeito imunomodulatório dos peptídeos foi feita a partir da análise da ativação da via do óxido nítrico pelos macrófagos desafiados. Esta avaliação foi possível a partir da quantificação do nitrito, um metabólito produto da via. Para tal, foi utilizado o método da Reação de Griess, descrita pela primeira vez em 1879 por Johann Peter Griess e modificada diversas vezes desde então (Tsikas D., 2007). Durante a reação, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, e forma um íon diazônio que reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED). Essa reação, representada na Fig. 8, gera um composto vermelho-violeta intenso, que tem absorção máxima de 540 nm. As absorbâncias podem ser diretamente relacionadas com as concentrações de nitrito nas amostras analisadas.





**Fig. 8. Reação de Griess modificada.** Imagem de Tsikas D., 2007. Na reação de Griess, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, e há a formação de um íon diazônio que reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina, gerando um composto vermelho-violeta intenso, que tem absorção máxima de 540 nm.

Para a realização do ensaio, os macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas de 96 poços, em uma concentração de  $10^5$  células/poço. Após 24h de adesão dos macrófagos à superfície da placa, os peptídeos (anteriormente diluídos em meio de cultura e filtrados em filtro de  $0,22 \mu\text{m}$ ) foram aplicados em cada poço, com ou sem LPS,  $10 \mu\text{g/mL}$ .

Aqui, o LPS atua como um agente ativador da célula, uma vez que, por ter origem microbiana, é capaz de ativar vias bioquímicas de células do sistema imune, incluindo a via do óxido nítrico. As concentrações testadas de cada peptídeo foram:  $100 \mu\text{M}$  dos peptídeos Cas3, Hsp1, L-Phes, Lun1 K7A e Schisn 1, 3, 4, 5, 7 e 9;  $50 \mu\text{M}$  da Schisn2;  $25 \mu\text{M}$  dos peptídeos Lun1 G4A, L e D-ecPis2s; e  $6,25 \mu\text{M}$  dos peptídeos Lun1 F12A e LyeTx1. Estas concentrações escolhidas para o ensaio foram determinadas levando em consideração os resultados dos ensaios de citotoxicidade, de forma que foram utilizadas apenas concentrações que mantiveram 100% das células viáveis de acordo com os ensaios de MTT (vide item 5.3.). Macrófagos não-estimulados ou estimulados apenas com LPS foram utilizados como controles para o experimento. Após os períodos de incubação de

24 horas, o sobrenadante de cada poço foi coletado. Em uma nova placa de 96 poços, 50 µL do sobrenadante foi adicionado em cada poço, e posteriormente misturado com 100 µL de Solução de Griess, composta por uma proporção de 1:1 de sulfanilamida 1% (v/v) e NED 0,1% (v/v), ambas solubilizadas em ácido fosfórico 2,5% (v/v) e água ultrapura. A curva padrão foi realizada com uma diluição seriada (250 a 1,95 µM) de nitrito de sódio previamente diluído em meio de cultura, que também foi submetido à adição de solução de Griess. A concentração de nitrito foi obtida a partir da mensuração da densidade óptica em um comprimento de onda de 540 nm. A partir dos valores de absorbância da curva padrão, é possível construir uma curva do tipo  $f(x) = a * x + b$ , a partir da qual a concentração (em µM) de nitrito de cada condição foi calculada. Para cada peptídeo foram feitas triplicatas técnicas e experimentais.

#### 4.5. Análises estatísticas

Para verificação da normalidade da distribuição dos dados obtidos nas análises de citotoxicidade *in vitro*, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (1965). Este teste estatístico é amplamente utilizado para detectar desvios de normalidade e é considerado por muitos o mais poderoso para a maioria das situações, como, por exemplo, para dados de testes biológicos onde o “n” amostral é maior que 3 (Mendes M. e Pala A., 2003). Em seguida, foram realizados os teste t-Student e a plotagem dos gráficos por meio de *scripts python* (materiais suplementares S1, S2 e S3) e do programa GraphPad Prism (Dotmatics, versão 8.0.1., disponível em: <https://www.graphpad.com/features>). Os cromatogramas das purificações foram plotados por meio do código disponibilizado no material suplementar S4. Já para os dados de parametrização e comparação *in silico* dos grupos de peptídeos, foram executados os testes de Brown-Forsythe e Welch (Brown M. B. e Forsythe A. B., 1974; Welch B., 1951). Estes testes são considerados alternativas robustas ao ANOVA tradicional, ideal para análises com K-Means (onde  $k > 2$ ) de amostras independentes que não possuem variâncias homogêneas (Reed III J. F. e Stark D. B., 1988). Esta etapa foi realizada por meio da ferramenta de análise de dados disponível no Prism GraphPad.

## 5. Resultados e Discussão

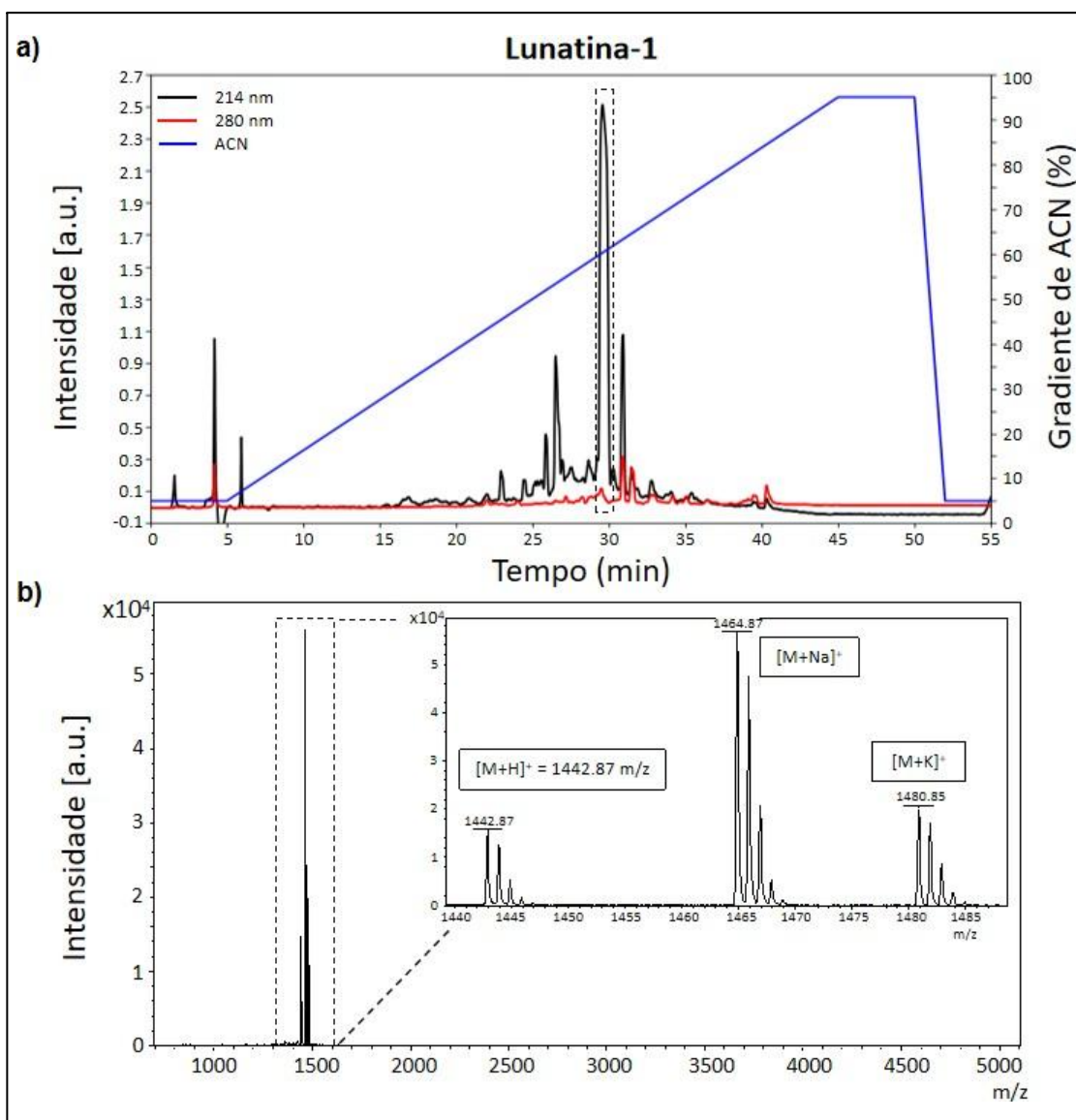
### 5.1. Síntese química e caracterização bioquímica dos peptídeos de interesse

Para a execução deste projeto foi necessário obter os peptídeos bioativos sintéticos, e para isso seguimos as estratégias experimentais descritas nas seções 4.2 e 4.3. Os peptídeos foram sintetizados por meio da estratégia Fmoc, e posteriormente purificados e analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Os peptídeos Schistocininas-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 e -9, L-ecPiscidina-2s e D-ecPiscidina-2s foram gentilmente cedidos pelo professor colaborador Rodrigo Verly, do LASEB-UFVJM, e os resultados referentes a purificação encontram-se no material suplementar figuras S6, S7 e S8

Os peptídeos da família das Lunatinas: Lun1 e seus análogos I2A, G4A e K7A, foram sintetizados com sucesso e todos apresentaram um tempo de retenção similar para as frações contendo o peptídeos de interesse (~30 minutos), sendo que todos foram eluídos entre 60 e 70% de acetonitrila. Isso significa que a substituição dos resíduos I, G e K por A provavelmente não alterou a hidrofobicidade dos análogos de Lun1, o que já era esperado, uma vez que a alanina é um resíduo de aminoácido com cadeia alifática hidrocarbonada que contribui para a hidrofobicidade ao peptídeo. A purificação pode ser verificada nas figuras 9, 10, 11 e 12. A legenda (a) refere-se aos cromatogramas das purificações dos peptídeos Lun1 e seus análogos I2A, G4A e K7A, respectivamente. Nas mesmas figuras, em (b) é mostrado o espectro de massa de cada um dos peptídeos. Os adutos de sódio e potássio, representados por  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ , também são visíveis nos gráficos.

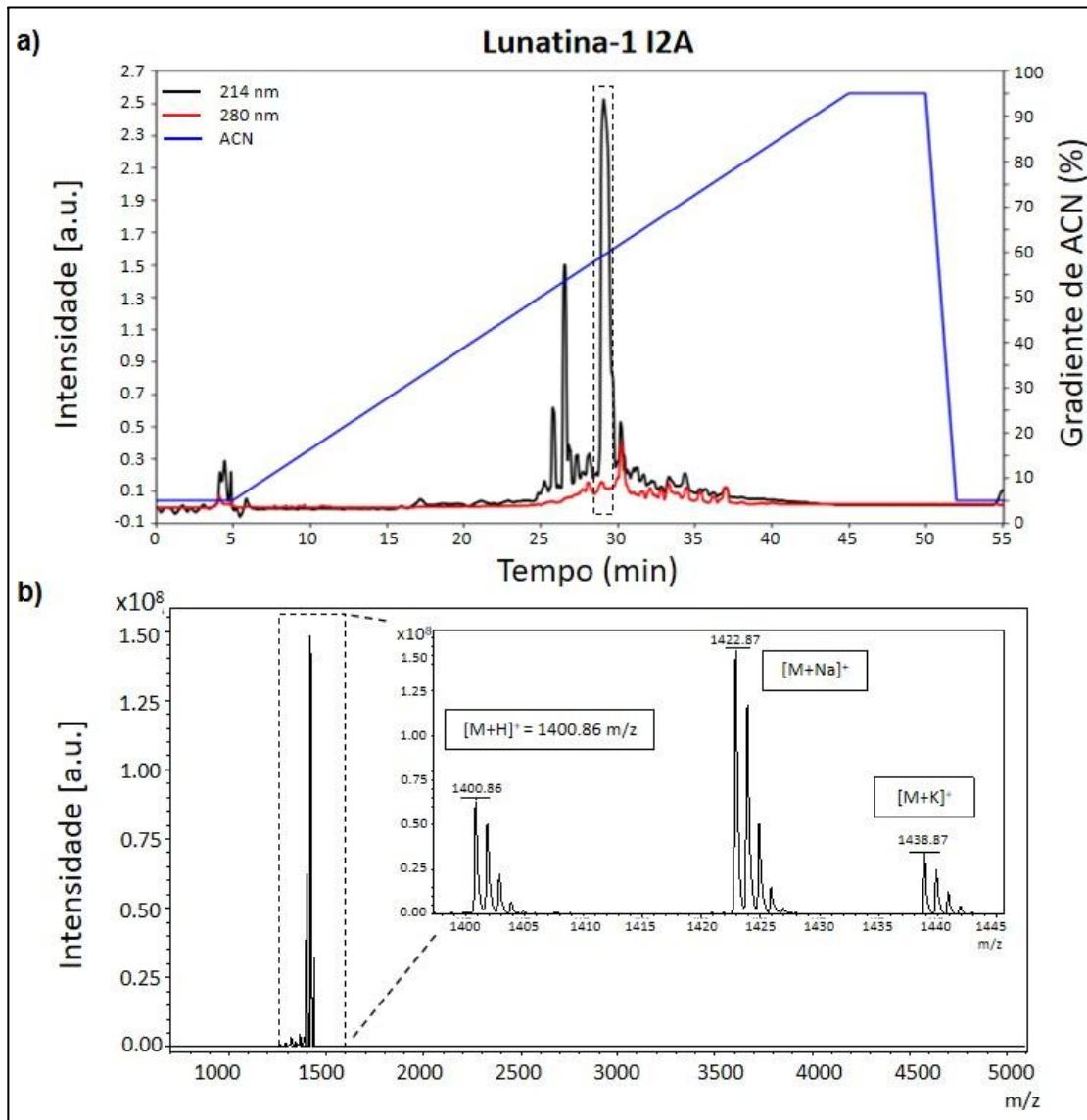
As relações  $m/z$  identificadas foram: Lunatina-1:  $[M+H]^+ = 1442,87$   $m/z$ , Lunatina-1 I2A:  $[M+H]^+ = 1400,86$   $m/z$ , Lunatina-1 G4A:  $[M+H]^+ = 1456,88$   $m/z$ , Lunatina-1 K7A:  $[M+H]^+ = 1385,66$   $m/z$ . Estes dados coincidem com a massa amidada teórica esperada de cada peptídeo (1442,82; 1400,66; 1456,84 e 1385,65 para Lun1, Lun1 I2A, Lun1 G4A e Lun1 K7A, respectivamente), calculadas com a ferramenta *web* Peptide Mass Calculator, que faz a soma da massa molecular de

cada aminoácido e considera a adição de um íon de hidrogênio e o C-terminal amidado do peptídeo. Portanto, nas etapas de purificação e caracterização, foi possível obter os peptídeos puros, que foram liofilizados e armazenados adequadamente para uso, e aferir suas massas. Os cromatogramas das schistocininas e piscidinas estão disponíveis no material suplementar (fig. S6 a S8). Até o momento, não foi possível obter espectros de massa das schistocininas, Hsp1 e Cas3. Também não foi possível obter dados de espectrometria MS/MS de todos os peptídeos.

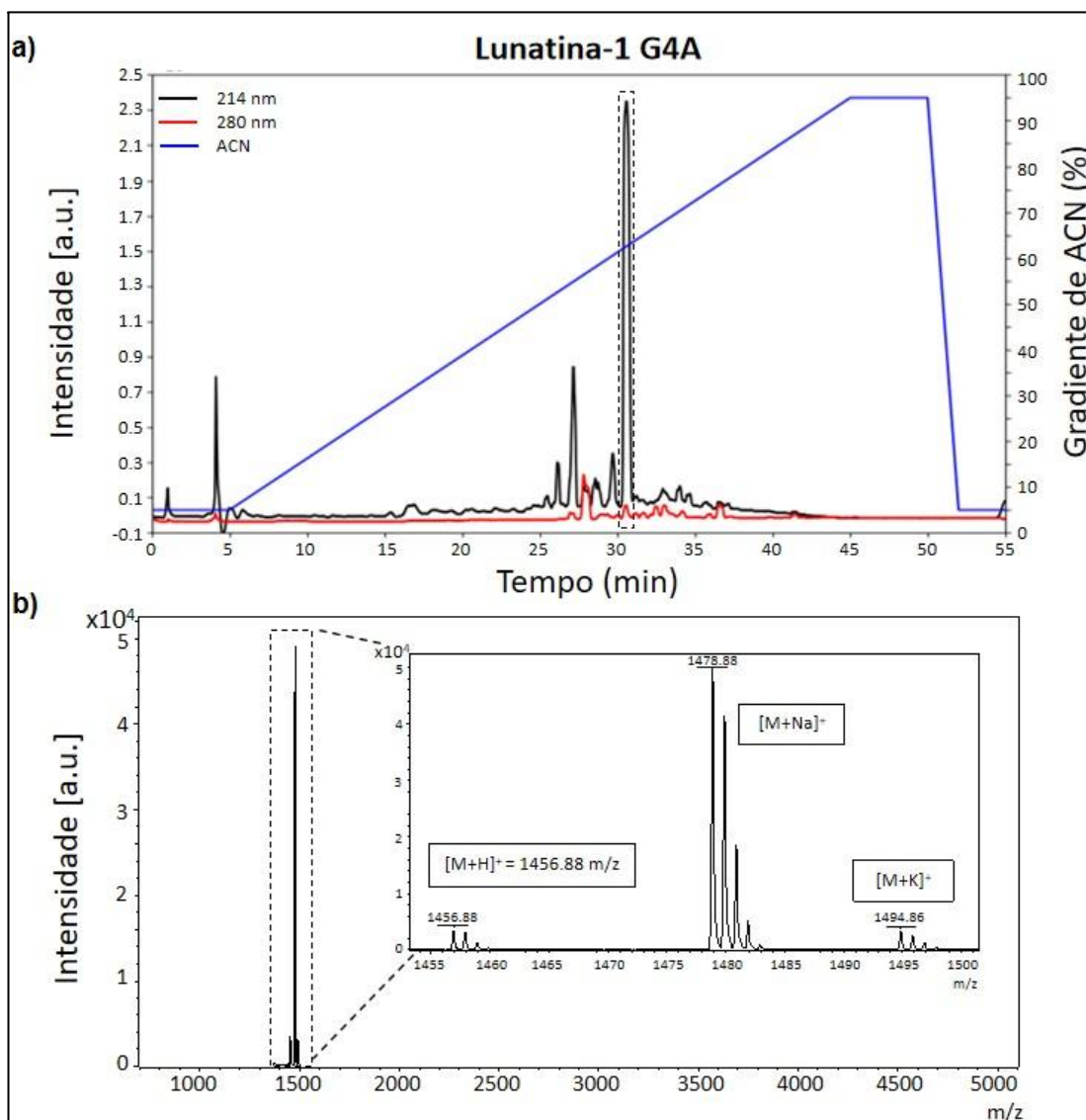


**Fig. 9. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1.** A Lunatina-1 foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa, em um gradiente de 0 a 95% de acetonitrila. O cromatograma é mostrado em (a), onde a região destacada com pontilhado indica a fração correspondente ao peptídeo purificado. O gradiente de acetonitrila é representado pela

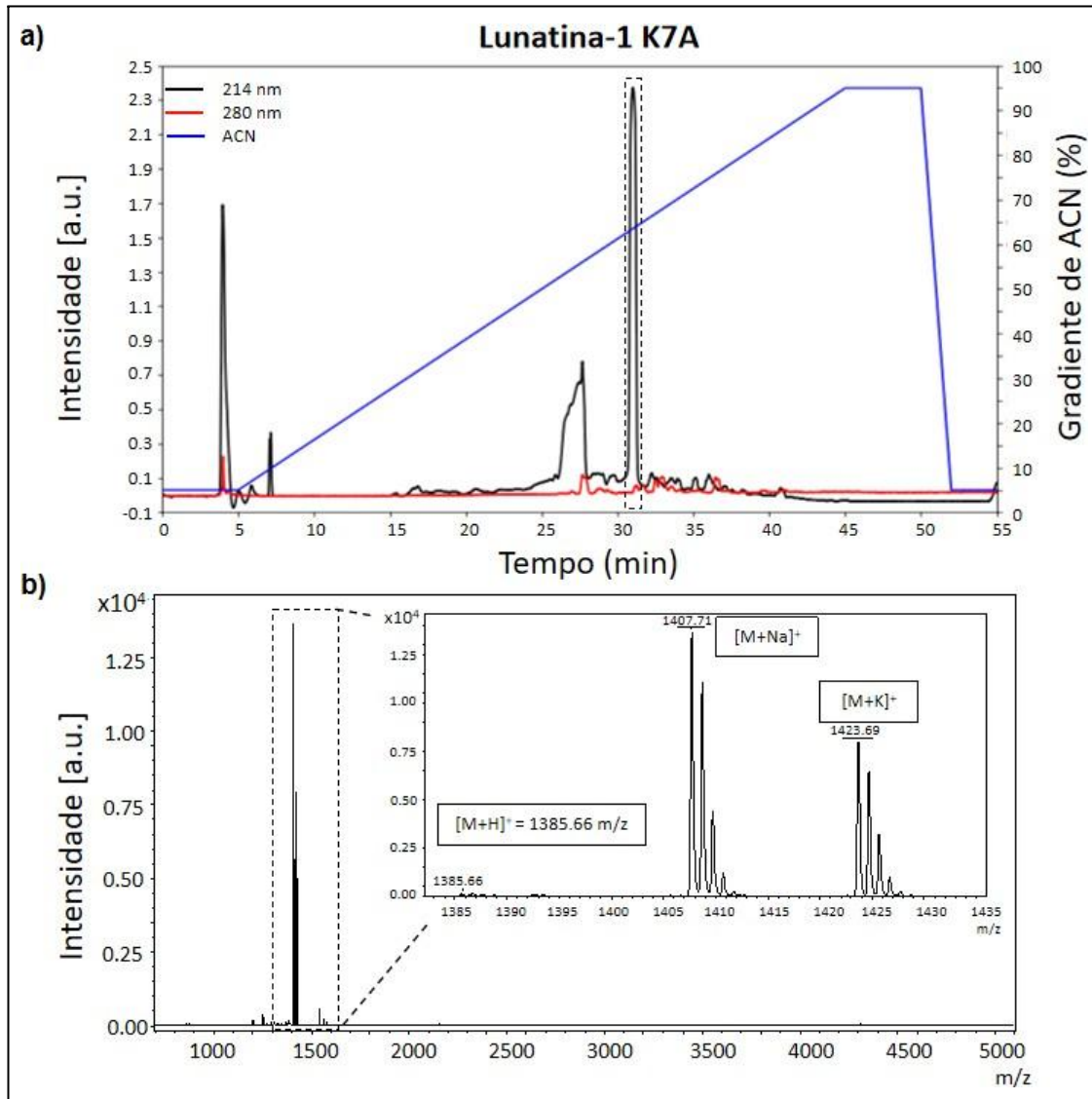
linha azul, e as leituras em 214 e 280 nm são representadas em preto e vermelho, respectivamente. O peptídeo purificado teve sua massa aferida por espectrometria de massa MALDI ToF, conforme mostrado em (b), onde é possível observar o espectro com a relação massa/carga ( $m/z$ ) esperada para o peptídeo e os adutos de sódio (Na) e potássio (K). Intensidades em unidade arbitrária (a.u.).



**Fig. 10. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 I2A.** A Lunatina-1 I2A foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa, em um gradiente de 0 a 95% de acetonitrila. O cromatograma é mostrado em (a), onde a fração destacada com pontilhado indica a fração correspondente ao peptídeo purificado. O gradiente de acetonitrila é representado pela linha azul, e as leituras em 214 e 280 nm são representadas em preto e vermelho, respectivamente. O peptídeo purificado teve sua massa aferida por espectrometria de massa MALDI ToF, conforme mostrado em (b), onde é possível observar o espectro com a relação massa/carga ( $m/z$ ) esperada para o peptídeo e os adutos de sódio (Na) e potássio (K). Intensidades em unidade arbitrária (a.u.).



**Fig. 11. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 G4A.** A Lunatina-1 G4A foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa, em um gradiente de 0 a 95% de acetonitrila. O cromatograma é mostrado em (a), onde a fração destacada com pontilhado indica a fração correspondente ao peptídeo purificado. O gradiente de acetonitrila é representado pela linha azul, e as leituras em 214 e 280 nm são representadas em preto e vermelho, respectivamente. O peptídeo purificado teve sua massa aferida por espectrometria de massa MALDI ToF, conforme mostrado em (b), onde é possível observar o espectro com a relação massa/carga ( $m/z$ ) esperada para o peptídeo e os adutos de sódio (Na) e potássio (K). Intensidades em unidade arbitrária (a.u.).



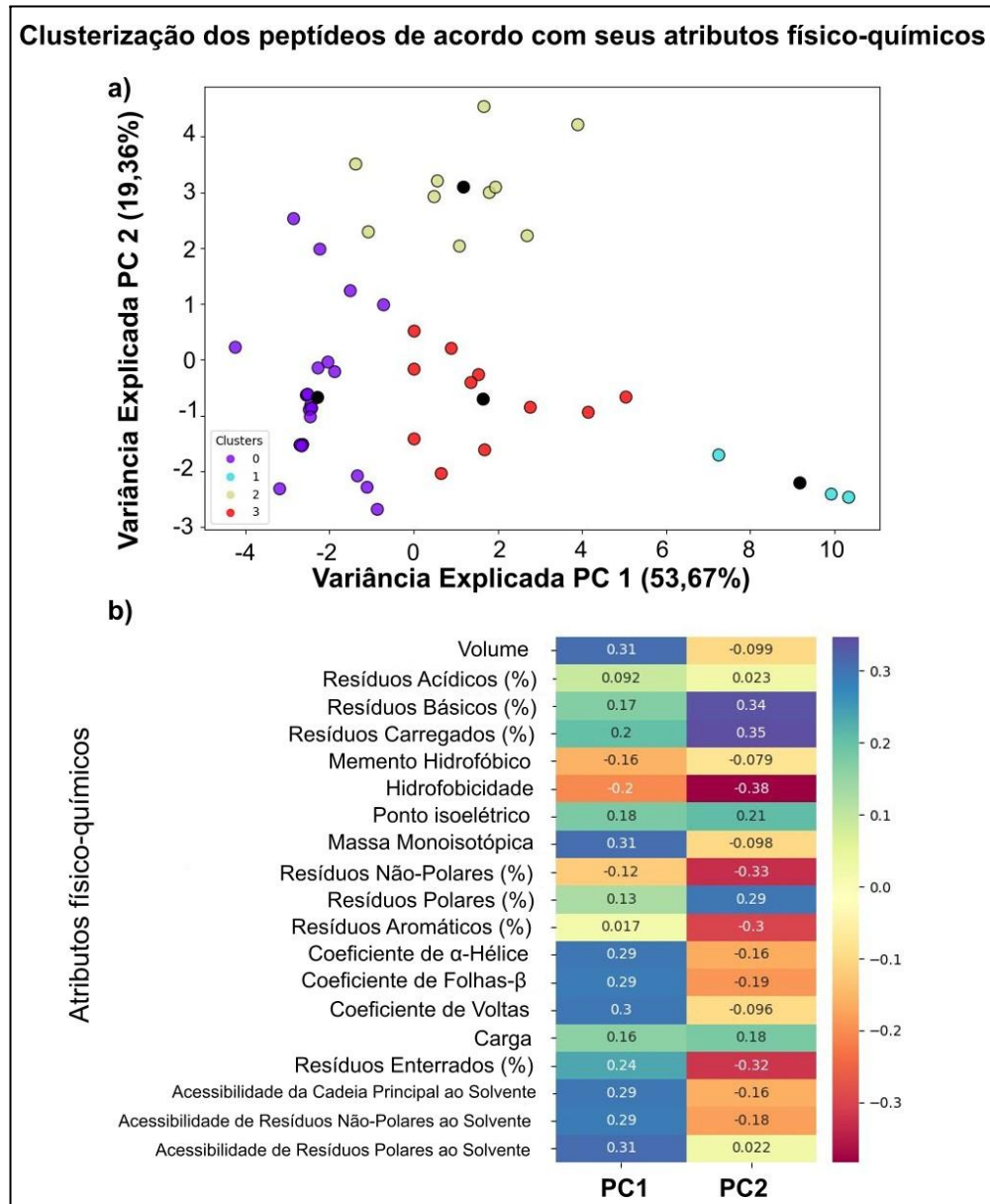
**Fig. 12. Purificação e caracterização do peptídeo Lunatina-1 K7A.** A Lunatina-1 K7A foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa, em um gradiente de 0 a 95% de acetonitrila. O cromatograma é mostrado em (a), onde a fração destacada com pontilhado indica a fração correspondente ao peptídeo purificado. O gradiente de acetonitrila é representado pela linha azul, e as leituras em 214 e 280 nm são representadas em preto e vermelho, respectivamente. O peptídeo purificado teve sua massa aferida por espectrometria de massa MALDI ToF, conforme mostrado em (b), onde é possível observar o espectro com a relação massa/carga ( $m/z$ ) esperada para o peptídeo e os adutos de sódio (Na) e potássio (K). Intensidades em unidade arbitrária (a.u.).

## 5.2. Peptídeos bioativos podem ser agrupados e classificados de acordo com suas características físico-químicas

Em geral, as biomoléculas carregam consigo uma complexidade intrínseca, e o mesmo é observado em relação aos peptídeos. Conforme já discutido anteriormente, os peptídeos bioativos são diversos em tamanho, composição aminoacídica, carga, atividades biológicas, entre outras características. Entretanto, a partir da parametrização dos atributos dos peptídeos analisados neste trabalho, foi possível observar agrupamentos dessas moléculas de acordo com semelhanças físico-químicas.

A abordagem *in silico* possibilitou a categorização biofísica detalhada de cada peptídeo investigado. Por meio da utilização do algoritmo enCrypted, conseguimos determinar uma gama de parâmetros, incluindo volume e massa monoisotópica, porcentagens de resíduos básicos, carregados, acídicos, não-polares, polares, aromáticos e enterrados, momento hidrofóbico e hidrofobicidade, ponto isoelétrico e carga, coeficientes de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e voltas, além da acessibilidade dos resíduos ao solvente. Todos esses dados foram minuciosamente analisados no contexto dos peptídeos citotóxicos para macrófagos RAW 264.7, os quais foram previamente catalogados no banco de dados DBAASP. E, contemplando cada um desses atributos, foi possível agrupar os peptídeos em quatro diferentes *clusters* ( $k$  ótimo = 4, vide Fig. S5), conforme evidenciado na figura 9. a.





**Fig. 13. Clusterização dos peptídeos de acordo com seus atributos físico-químicos e análise de cargas.** Os peptídeos analisados podem ser organizados em quatro diferentes grupos, como evidenciado na PCA em (A). Os grupos são compostos por: Grupo 0: Lunatina-1, Lunatina-1 F1A, Lunatina-1 I2A, Lunatina-1 G3A, Lunatina-1 G4A, Lunatina-1 L5A, Lunatina-1 L6A, Lunatina-1 K7A, Lunatina-1 T8A, Lunatina-1 L9A, Lunatina-1 T10A, Lunatina-1 S11A, Lunatina-1 F12A, Lunatina-1 F13A, Lunatina-2, Hilaseptina-1, Caspase-3, Schistocina-3, Schistocina-3.2, Schistocinina-3, Schistocinina-4, Schistocinina-5, Schistocinina-7, Schistocinina-8, Schistocinina-9; Grupo 1: Heteroscorpine-1 (1-38) (Erviana R. et al., 2021), Cecropin-B [A22] (Wang J. et al., 2018) e Octopromycin (Rajapaksha D. C. et al. 2021); Grupo 2: Schistocina-1, Schistocina-2, Dissulfina-01 (33-48) (Popov C. S. F. C. et al., 2019), EeCentrocin EC1-17KV, EeCentrocin EC1-17RV (Ma L. et al., 2020), IR3, IR2 (Dong N. et al., 2023), (D- ou L-) Dhvar4 [F9K] (Lu J. et al., 2020), Schistocinina-2, Grasscarp interferon (137-156) (Xiao X. et al., 2022); Grupo 3: LSEI\_2135 (53-68) (He J. F. et al., 2020), (D- ou L-) Fenilseptina, (D- ou L-) EcPis2s, Hm-AMP10, Hm-AMP4 (Grafkaia E. N. et al., 2022), LyeTx1, Fowlicidin-1 (3-21), Schistocinina-1, Fowlicidin-1 (1-19), Fowlicidin-1 [P7Y], Fowlicidin-1 (5-23) (Rajasekaran G. et al. 2019). Os pontos negros representam as centroides de cada *cluster*. A contribuição de cada atributo físico-químico para o agrupamento é mostrada em (B).

O grupo 0 é composto por Lunatina-1, Lunatina-1 F1A, Lunatina-1 I2A, Lunatina-1 G3A, Lunatina-1 G4A, Lunatina-1 L5A, Lunatina-1 L6A, Lunatina-1 K7A, Lunatina-1 T8A, Lunatina-1 L9A, Lunatina-1 T10A, Lunatina-1 S11A, Lunatina-1 F12A, Lunatina-1 F13A, Lunatina-2, Hilaseptina-1, Caspase-3, Schistocina-3, Schistocina-3.2, Schistocinina-3, Schistocinina-4, Schistocinina-5, Schistocinina-7, Schistocinina-8 e Schistocinina-9.

O grupo 1 compreende os peptídeos Heteroscorpina-1 (1-38) (Erviana R. *et al.*, 2021), Cecropina-B [A22] (Wang J. *et al.*, 2018) e Octopromycina (Rajapaksha D. C. *et al.* 2021).

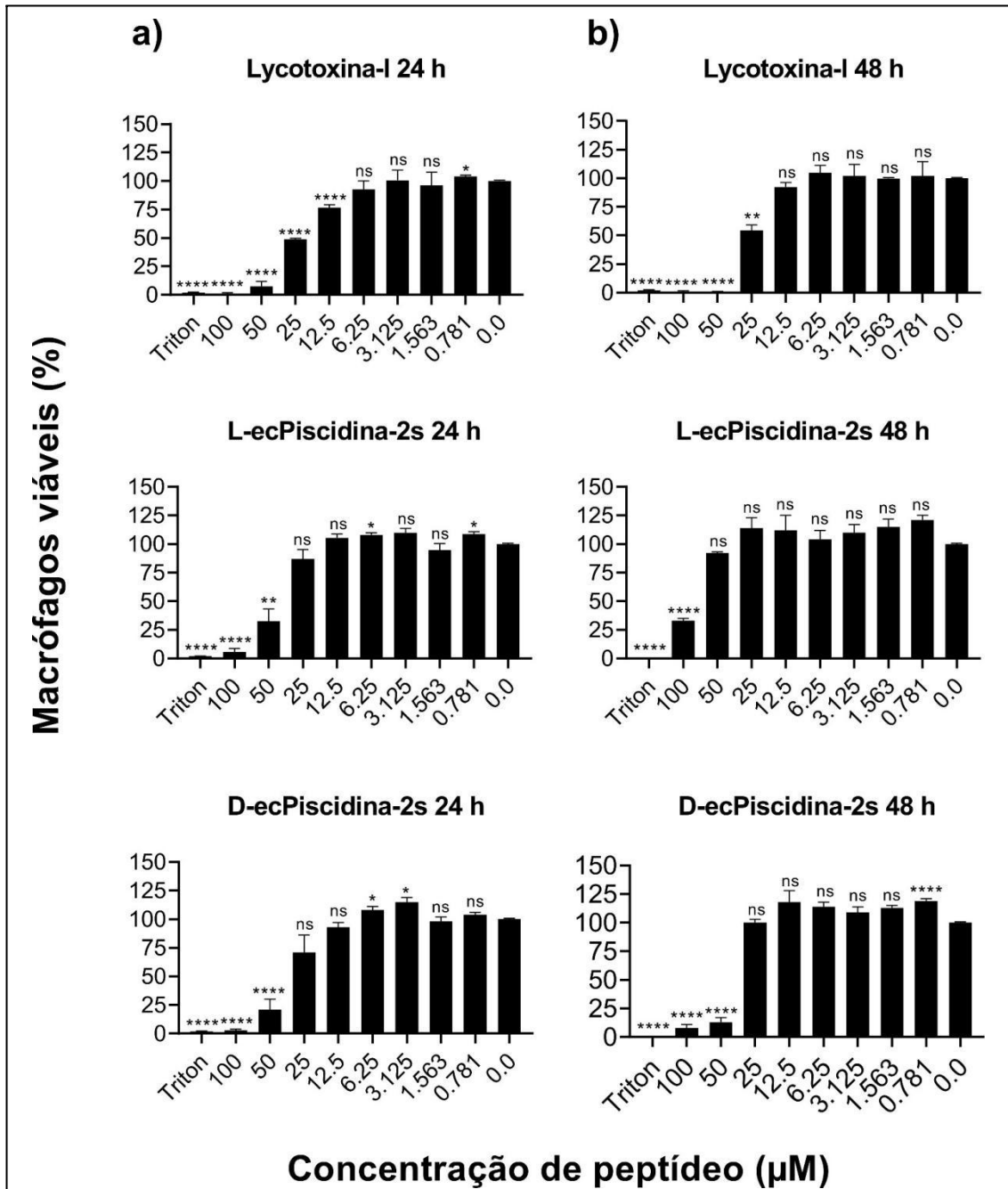
Já o grupo 2 contém os peptídeos Schistocina-1, Schistocina-2, Dissulfina-01 (33-48) (Popov C. S. F. C. *et al.*, 2019), EeCentrocina EC1-17KV, EeCentrocina EC1-17RV (Ma L. *et al.*, 2020), IR3, IR2 (Dong N. *et al.*, 2023), (D-ou L-) Dhvar4 [F9K] (Lu J. *et al.*, 2020), Schistocinina-2 e Grasscarp interferon (137-156) (Xiao X. *et al.*, 2022).

Por fim, o grupo 3 é composto por LSEI\_2135 (53-68) (He J. F. *et al.*, 2020), (D- ou L-) Fenilseptina, (D- ou L-) EcPis2s, Hm-AMP10, Hm-AMP4 (Grafkskaia E. N. *et al.*, 2022), LyeTx1, Fowlicidina-1 (3-21), Schistocinina-1, Fowlicidina-1 (1-19), Fowlicidina-1 [P7Y] e Fowlicidina-1 (5-23) (Rajasekaran G. *et al.* 2019).

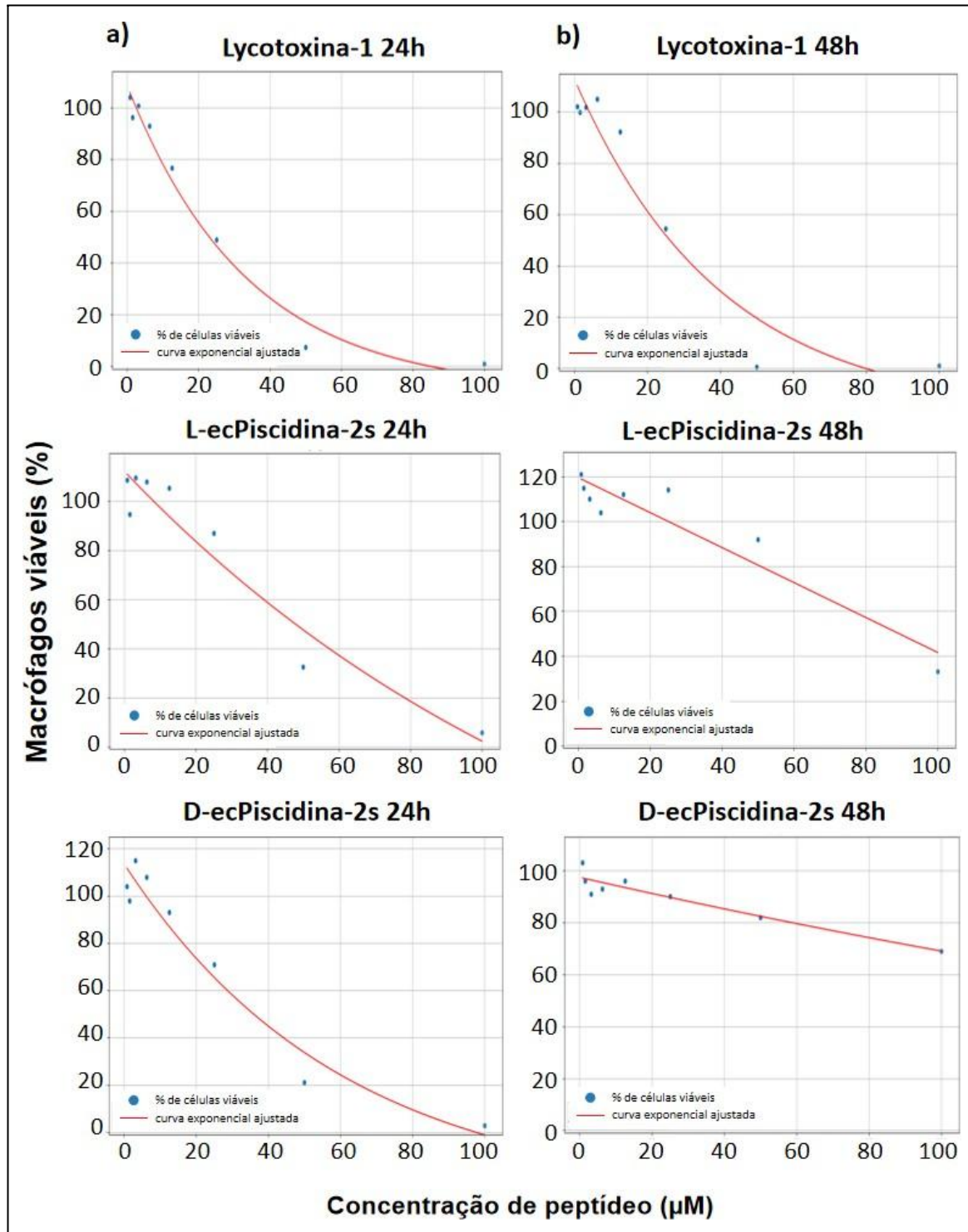
A formação destes grupos indica que os peptídeos bioativos possuem características físico-químicas que, embora distintas, podem ser categorizadas, especialmente em relação a certos parâmetros específicos. A análise de cargas (Fig. 13. b) evidenciou que os atributos que mais influenciaram a formação dos grupos, destacando-se: volume e massa monoisotópica; coeficientes de estrutura secundária (formação de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e voltas); acessibilidade dos resíduos ao solvente; e porcentagem de resíduos básicos e carregados. As comparações entre os grupos e os experimentos *in vitro*, cujos resultados serão discutidos a seguir, ajudam a compreender melhor estes agrupamentos e a relação entre os atributos físico-químicos e a citotoxicidade de cada peptídeo.

### 5.3. Peptídeos não-citotóxicos estão concentrados no “Grupo 0”, enquanto peptídeos citotóxicos estão distribuídos entre os grupos 1, 2 e 3

Como citado anteriormente (item 5.2.), o grupo 3 é composto por peptídeos citotóxicos para macrófagos RAW 264.7 depositados no DBAASP, além de incluir os peptídeos (D ou L) ecPis2s, LyeTx1, (D ou L) Phes e Schisn1. Para testar a classificação do grupo 0, os peptídeos foram testados em modelos de macrófagos murinos. Entre os peptídeos deste grupo, D- e L-ecPis2s e LyeTx1 foram capazes de diminuir consideravelmente o número de células viáveis à medida em que a concentração do peptídeo aumentou, principalmente no tempo de 24h de tratamento (Fig. 14. a). Entretanto, o efeito também pode ser notado no tratamento de 48h (Fig. 14. b). Eles alcançaram a concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>), que representa o ponto da curva de citotoxicidade (Fig. 15) em que 50% das células não estão viáveis. Os valores de CC<sub>50</sub> estão representados na tabela 1, onde é possível observar que os três peptídeos citados anteriormente possuem os menores valores. A fenilseptina, também está inserida neste grupo, e apesar de não ter alcançado a CC<sub>50</sub>, demonstrou ser citotóxica na concentração mais alta testada (100 µM), conforme demonstrado na Fig. 17. Isso significa que para termos calculados os valores de CC<sub>50</sub> seria necessário aumentar as concentrações de uso do ensaio biológico. Deve-se notar que a Schisn1 também está inserida neste grupo que contém peptídeos citotóxicos, apesar de não ter sido citotóxica de acordo com nossos ensaios, podendo ser considerada um *outlier* entre os peptídeos citotóxicos em modelos de macrófagos murinos. Seria importante testar este peptídeo em outros tipos celulares para avaliar a sua citotoxicidade frente a outros modelos.



**Fig. 14** Citotoxicidade dos peptídeos Lycotoxina-1, L- e D-ecPiscidina-2s sobre macrófagos murinos. Os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos ao tratamento com os peptídeos por 24 (a) e 48 (b) horas. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).



**Fig. 15. Curvas de citotoxicidade dos peptídeos LyeTx1, L-ecPis2s e D-ecPis2s.** Os macrófagos foram tratados com os peptídeos por 24h (a) e 48h (b). Círculos azuis representam a porcentagem de células viáveis para cada concentração (0,78 a 100  $\mu\text{M}$ ), e a linha vermelha representa a curva exponencial ajustada de cada caso. Os valores de  $CC_{50}$  foram calculados a partir da equação exponencial das curvas.

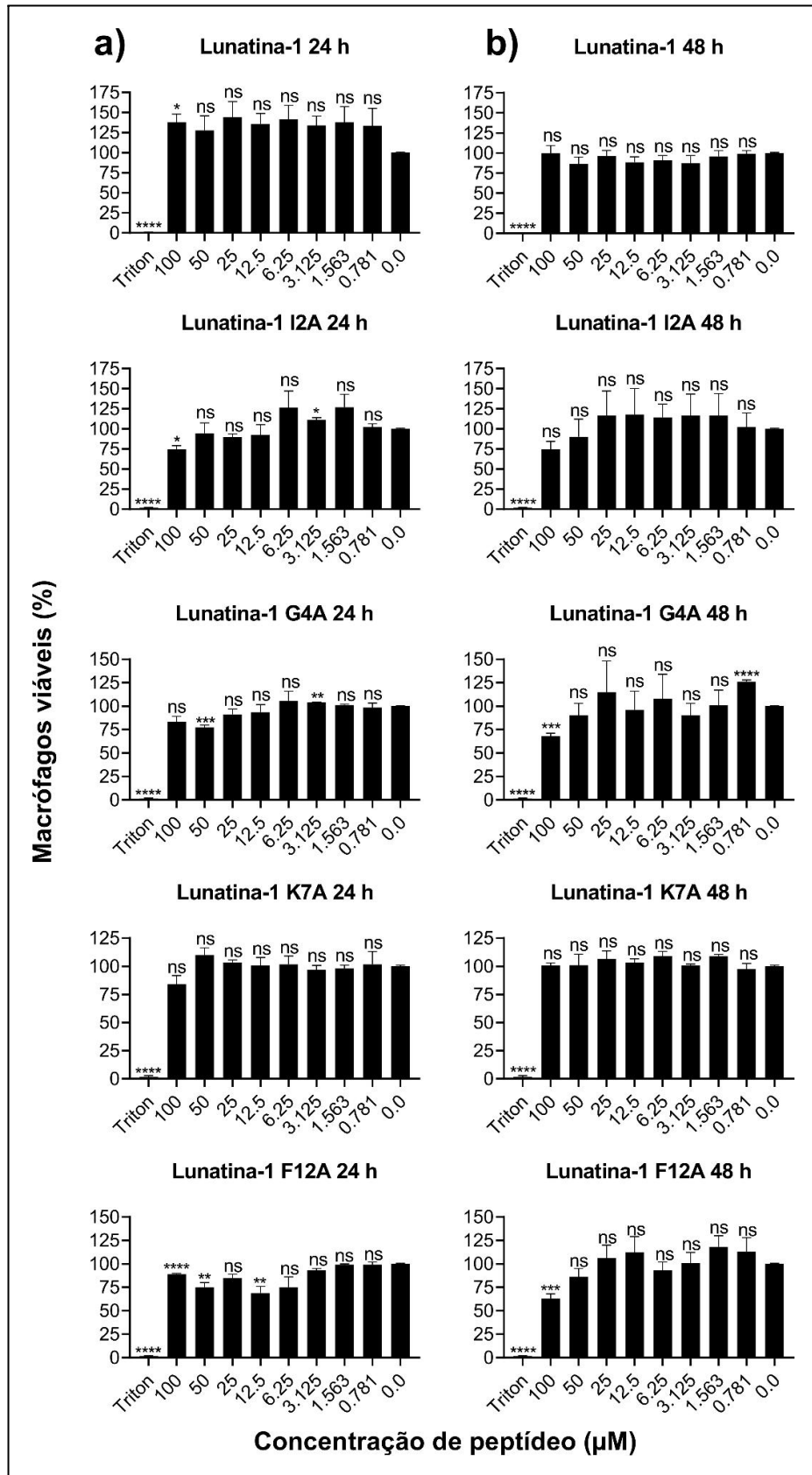
**Tabela. 1. Concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) dos peptídeos sintéticos testados.** O CC<sub>50</sub> é a concentração de peptídeo suficiente para eliminar 50% das células, calculada a partir da curva de citotoxicidade de cada peptídeo testado. Os peptídeos com CC<sub>50</sub> calculada maior que 100 µM não eliminaram 50% das células em nenhuma concentração testada (0,78 a 100 µM). Os valores mostrados para cada tempo representam resultados de pelo menos três experimentos independentes.

Peptídeos	CC <sub>50</sub> calculado	
	24 h	48 h
Schistocinina-1	> 100	> 100
Schistocinina-2	> 100	> 100
Schistocinina-3	> 100	> 100
Schistocinina-4	> 100	> 100
Schistocinina-5	> 100	> 100
Schistocinina-7	> 100	> 100
Schistocinina-8	> 100	> 100
Schistocinina-9	> 100	> 100
Lunatina-1	> 100	> 100
Lunatina-1 I2A	> 100	> 100
Lunatina-1 G4A	> 100	> 100
Lunatina-1 K7A	> 100	> 100
Lunatina-1 F12A	> 100	> 100
Caspase-3	> 100	> 100
L-Fenilseptina	> 100	> 100
D-Fenilseptina	> 100	> 100
Hylaseptina-1	> 100	> 100
Lycotoxina-1	25,78 ± 4,14	32,65 ± 4,93
L-ecPiscidina-2s	31,23 ± 3,08	98,09 ± 12,95
D-ecPiscidina-2s	52,84 ± 7,16	74,89 ± 1,48

O grupo 0 não incluiu nenhum peptídeo conhecidamente citotóxico para macrófagos. Este grupo é composto pelos peptídeos Lunatina-1, Lunatina-1 F1A, Lunatina-1 I2A, Lunatina-1 G3A, Lunatina-1 G4A, Lunatina-1 L5A, Lunatina-1 L6A, Lunatina-1 K7A, Lunatina-1 T8A, Lunatina-1 L9A, Lunatina-1 T10A, Lunatina-1 S11A, Lunatina-1 F12A, Lunatina-1 F13A, Lunatina-2, Hilaseptina-1, Caspase-3, Schistocina-3, Schistocina-3.2, Schistocinina-3, Schistocinina-4, Schistocinina-5, Schistocinina-7, Schistocinina-8 e Schistocinina-9.

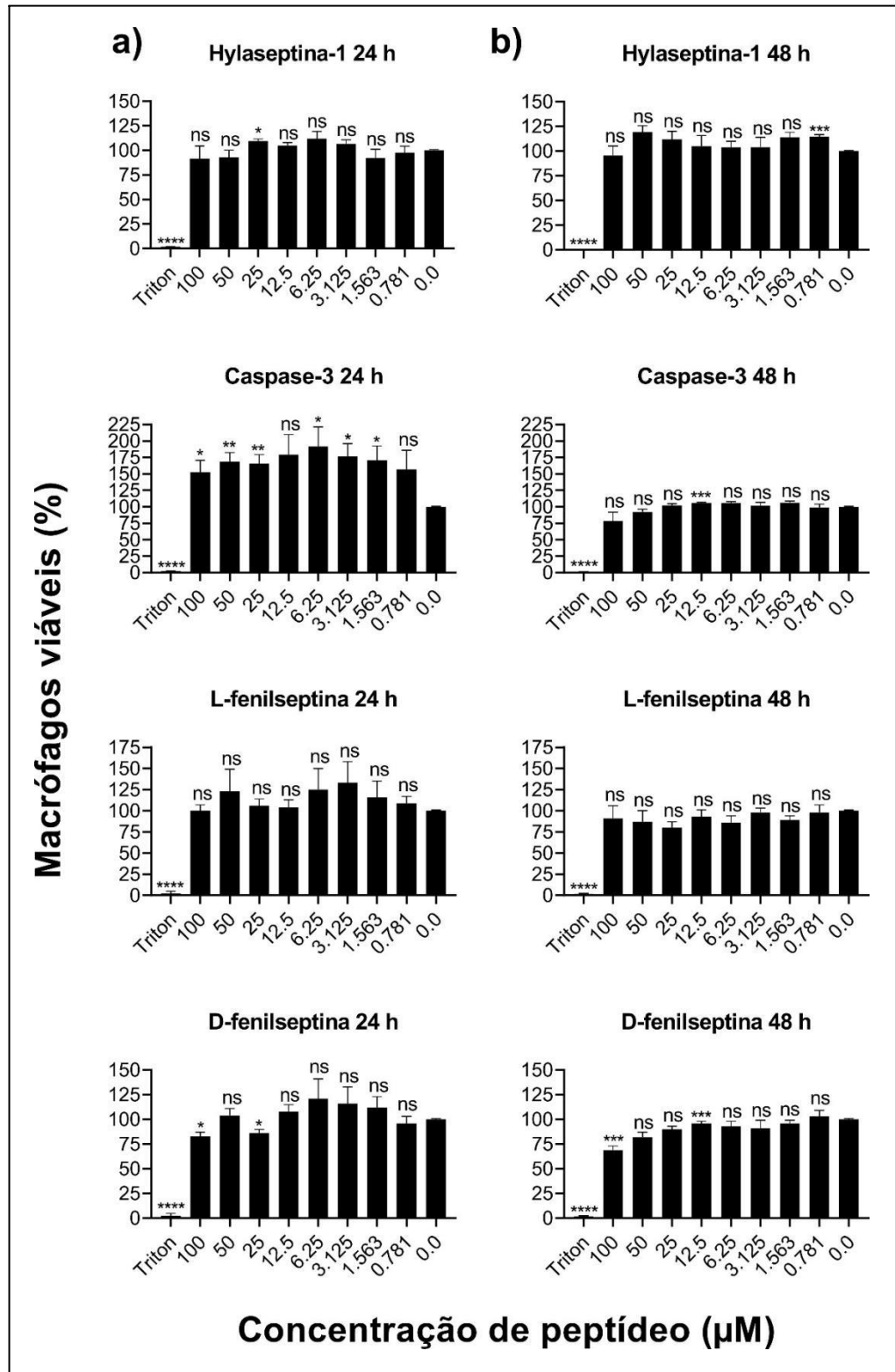
Os peptídeos sintéticos de interesse, pertencentes ao grupo 0, foram testados em modelos de macrófagos RAW, e nenhum deles demonstrou citotoxicidade, como evidenciado nos ensaios realizados. Esses peptídeos incluem Lun1 e seus análogos I2A, G4A, K7A, F12A, além de Hsp1 e Cas3, para os quais não foi possível obter um valor de  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células) evidenciados na tabela 1, uma vez que não houve mortalidade de 50% das células em nenhuma concentração testada (Fig. 16, 17, 18 e 19). A hipótese é que outros peptídeos pertencentes a este grupo, como as Schistocinas e outros análogos da Lun1 que ainda não foram testados, também devem apresentar baixa ou nenhuma citotoxicidade, dado que compartilham características físico-químicas semelhantes aos peptídeos não citotóxicos testados. Contudo, são necessários ensaios de MTT com esses peptídeos para conclusões sobre suas citotoxicidades.

Assim, é interessante destacar que o grupo 0 não apenas engloba a maioria dos peptídeos que não demonstraram citotoxicidade nos ensaios conduzidos neste estudo, mas também não apresenta nenhum peptídeo previamente identificado como tóxico para macrófagos murinos. Esse cenário destaca a importância de aprofundar a investigação dos atributos físico-químicos específicos desse grupo e compará-los de forma sistemática com os atributos dos outros grupos que contêm peptídeos citotóxicos.

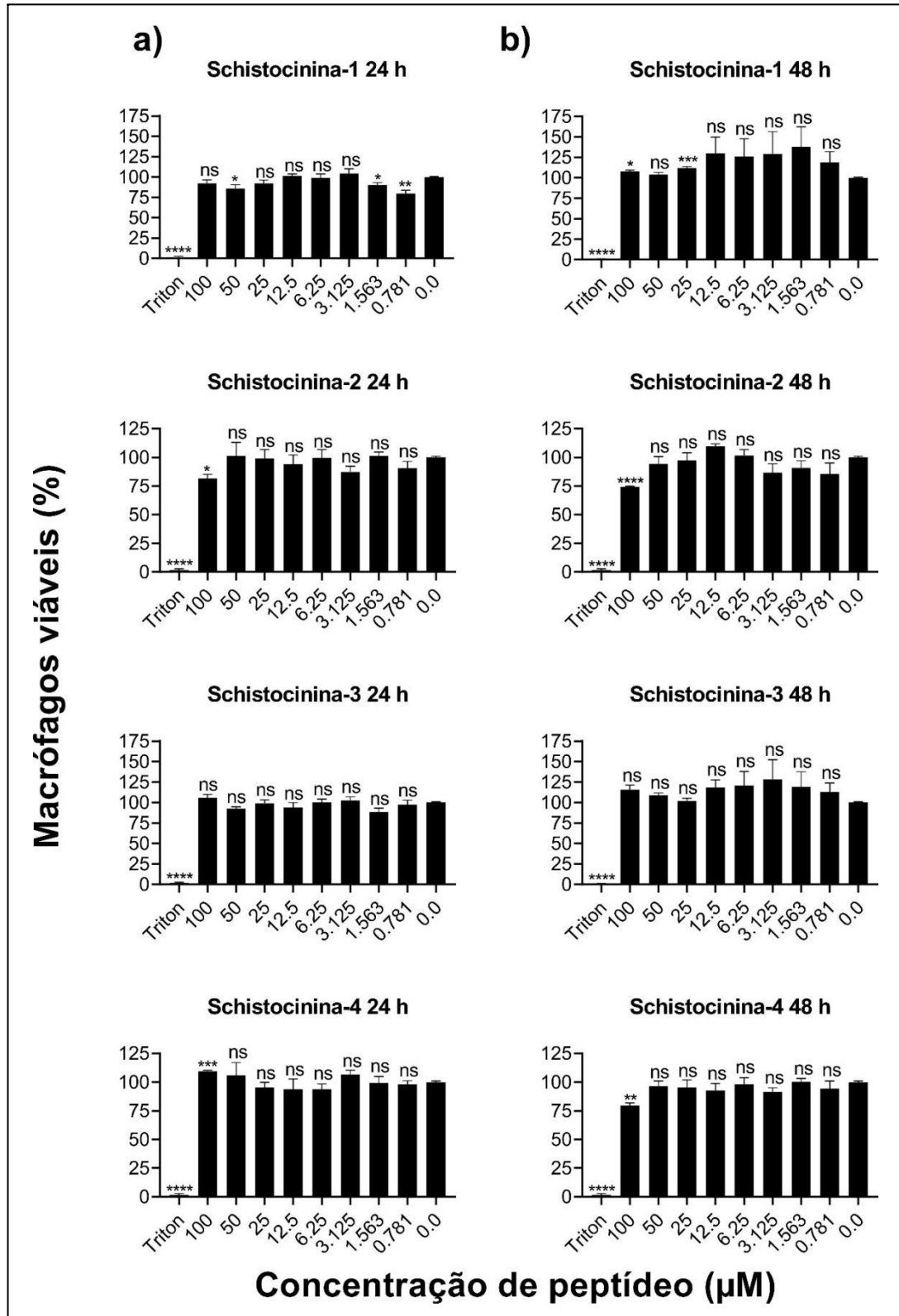


**Fig. 16. Citotoxicidade das lunatins.** Os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos ao tratamento com os peptídeos por 24 (a) e 48 (b) horas. P-value  $\leq$  0,001: \*\*\*\*; p-value  $\leq$  0,005: \*\*\*; p-value  $\leq$  0,01: \*\*; p-value  $\leq$  0,05: \*; p-value  $>$  0,05: ns (não significativo).

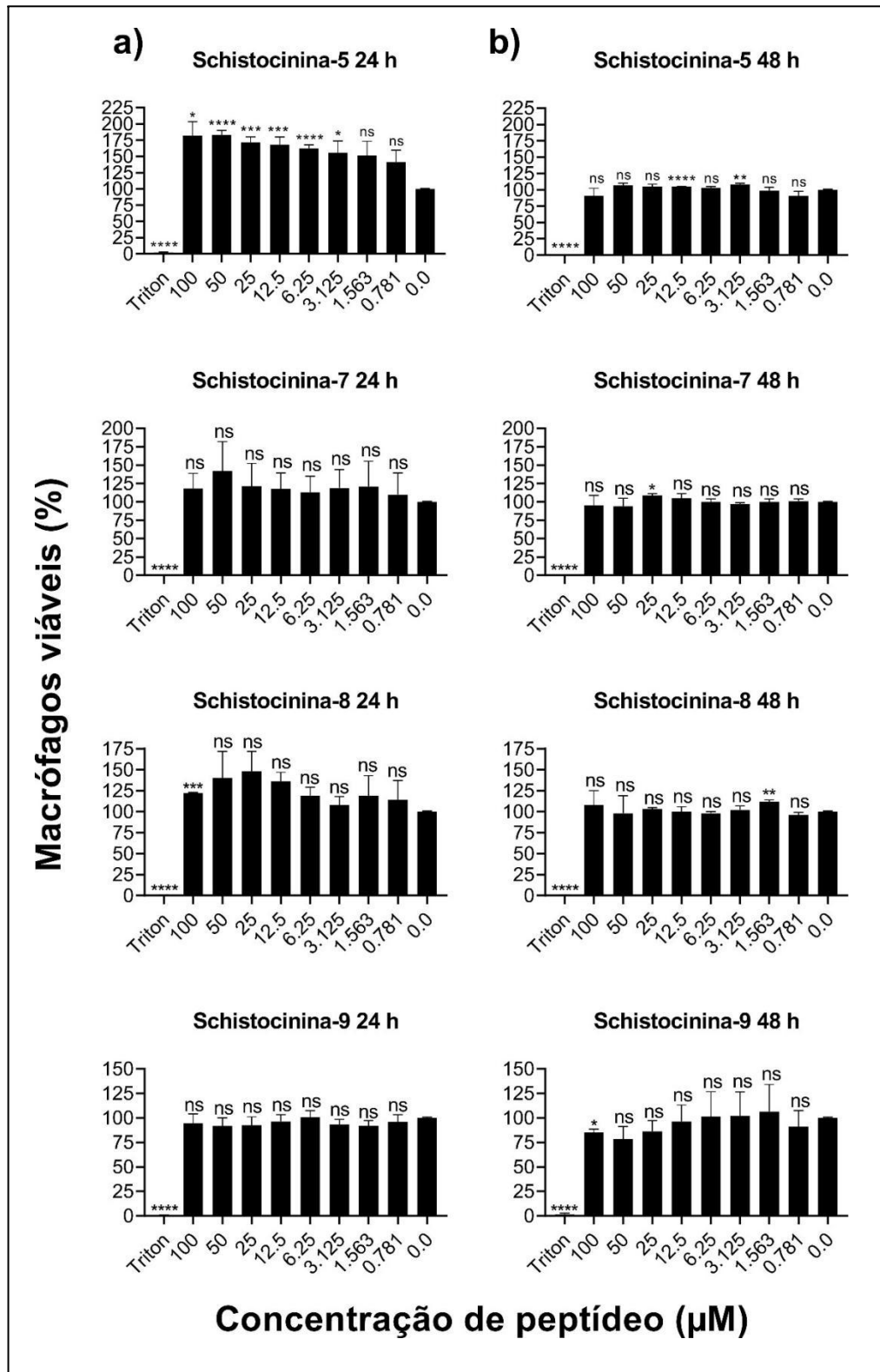




**Fig. 17. Citotoxicidade dos peptídeos Hylaseptina-1, Caspase-3 e D- e L-Fenilseptina.** Os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos ao tratamento com os peptídeos por 24 (a) e 48 (b) horas. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).



**Fig. 18. Citotoxicidade das schistocininas-1 a -4.** Os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos ao tratamento com os peptídeos por 24 (a) e 48 (b) horas. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).

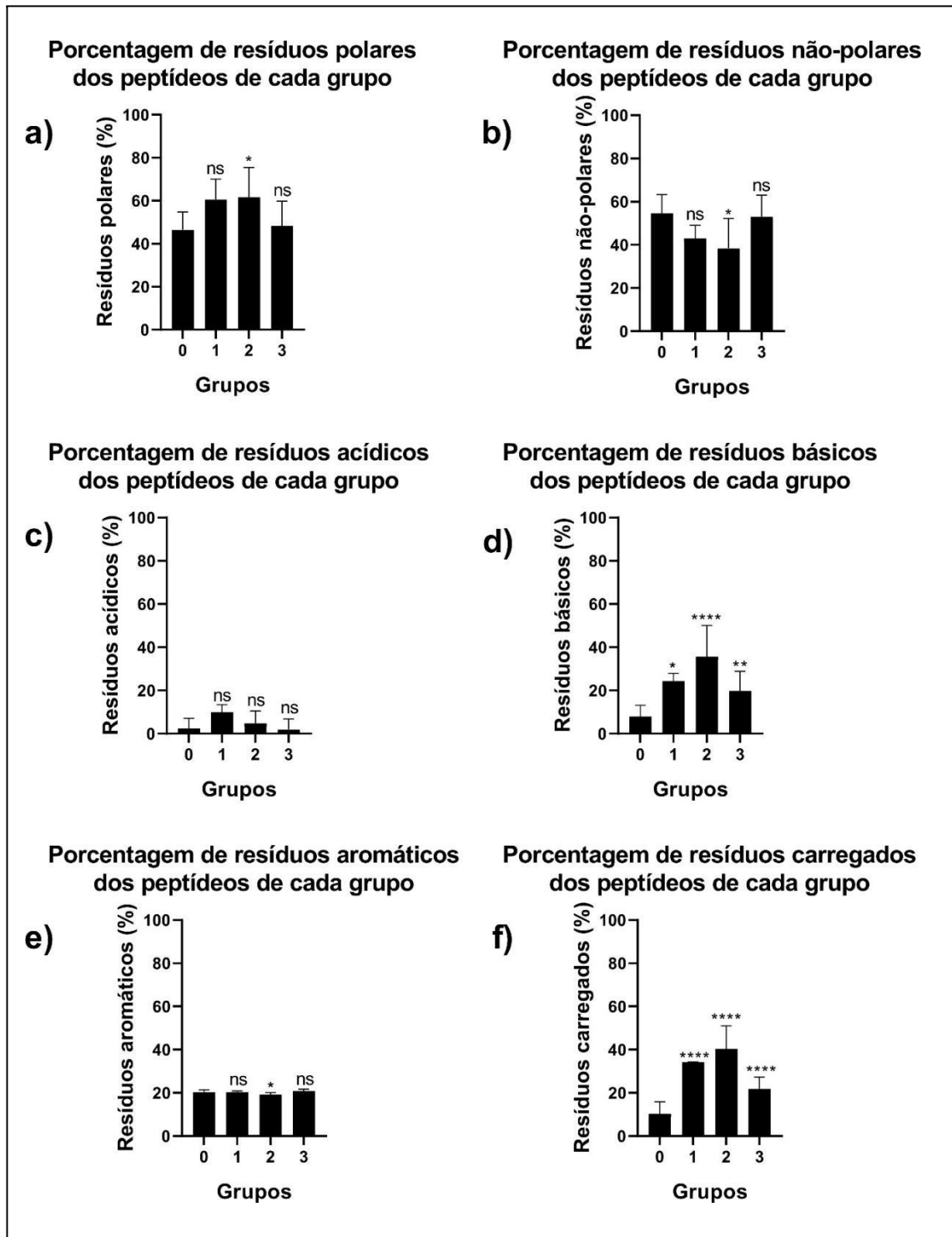


**Fig. 19. Citotoxicidade das schistocininas-5, -7, -8 e -9.** Os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos ao tratamento com os peptídeos por 24 (a) e 48 (b) horas. P-value  $\leq$  0,001: \*\*\*\*; p-value  $\leq$  0,005: \*\*\*; p-value  $\leq$  0,01: \*\*; p-value  $\leq$  0,05: \*; p-value  $>$  0,05: ns (não significativo).

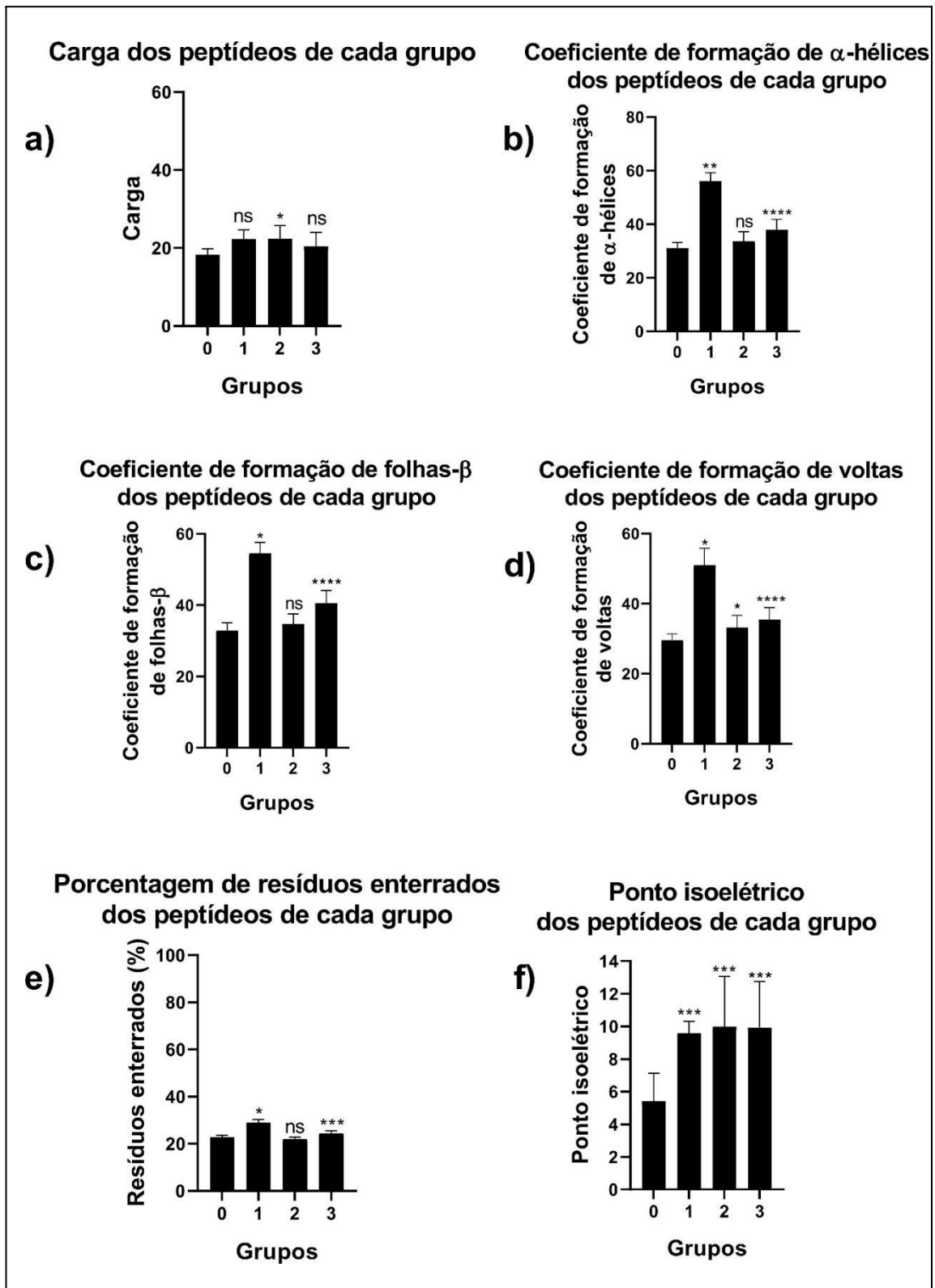
#### **5.4. Diferenças biofísicas significativas no Grupo 0 são indicativos promissores para o desenvolvimento racional de peptídeos não citotóxicos**

Ao realizar a comparação entre os atributos físico-químicos dos grupos, foi possível observar algumas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos valores dos peptídeos do Grupo 0 e os demais. Estas análises foram conduzidas utilizando o Grupo 0 como “grupo controle”, por ser aquele que não contém peptídeos citotóxicos.

Como evidenciado na figura 20, os peptídeos do grupo 0 possuem uma porcentagem menor de resíduos básicos (Fig. 20. d) e carregados (Fig. 20. f) quando comparados aos peptídeos dos outros grupos. Isso sugere que peptídeos citotóxicos, como os inseridos nos grupos 1, 2 e 3, podem possuir uma composição mais rica em resíduos de lisina (K), arginina (R) e histidina (H). No caso dos peptídeos analisados, esta característica se reflete principalmente em relação aos resíduos de arginina, uma vez que apenas 1% do somatório total de resíduos dos peptídeos do grupo 0 correspondem a R, enquanto que para os grupos 1, 2 e 3, a porcentagem total de argininas compondo os peptídeos é de 5, 9 e 7%, respectivamente. Em particular, a arginina é descrita como altamente básica em pH fisiológico (próximo de 7), uma vez que sua cadeia lateral tem a carga positiva estabilizada por ressonância, permanecendo protonada nessa condição (Harms M. J. *et al.*, 2011; Schlippe Y. V. G. *et al.*, 2005). Em condições aquosas, o resíduo R tem a constante de dissociação ( $K_a$ ) mais alta entre os aminoácidos naturais ionizáveis, tornando-o o menos provável de existir em estado neutro em pH fisiológico. A predominância de R nos grupos 1, 2 e 3, quando comparado com o grupo 0, também sugere que os peptídeos citotóxicos são mais básicos do que peptídeos não-citotóxicos.



**Fig. 20. Parte 1: valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo.** (A) Porcentagem de resíduos polares; (B) porcentagem de resíduos não-polares; (C) porcentagem de resíduos ácidos; (D) porcentagem de resíduos básicos; (E) porcentagem de resíduos aromáticos e (F) porcentagem de resíduos carregados. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).



**Fig. 21. Parte 2: Valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo.** (A) carga; (B) coeficiente de  $\alpha$ -hélices; (C) coeficiente de folhas- $\beta$ ; (D) coeficiente de voltas; (E) percentagem de resíduos enterrados e (F) ponto isoelétrico. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).

Quanto às prováveis estruturas secundárias dos peptídeos, foram obtidos os valores dos coeficientes de formação de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e voltas, em que se nota diferenças entre o grupo controle (0) e os grupos 1 e 3 (Fig. 21. b, c e d). O grupo 2, composto apenas por peptídeos citotóxicos para macrófagos, é semelhante ao grupo 0 e, portanto, diferente dos outros grupos (1 e 3) que também são compostos por peptídeos citotóxicos, o que sugere que peptídeos tóxicos para células de mamíferos variam dentro desses aspectos. De qualquer forma, é possível observar que o grupo que contém peptídeos não-citotóxicos (0) possui coeficientes menores.

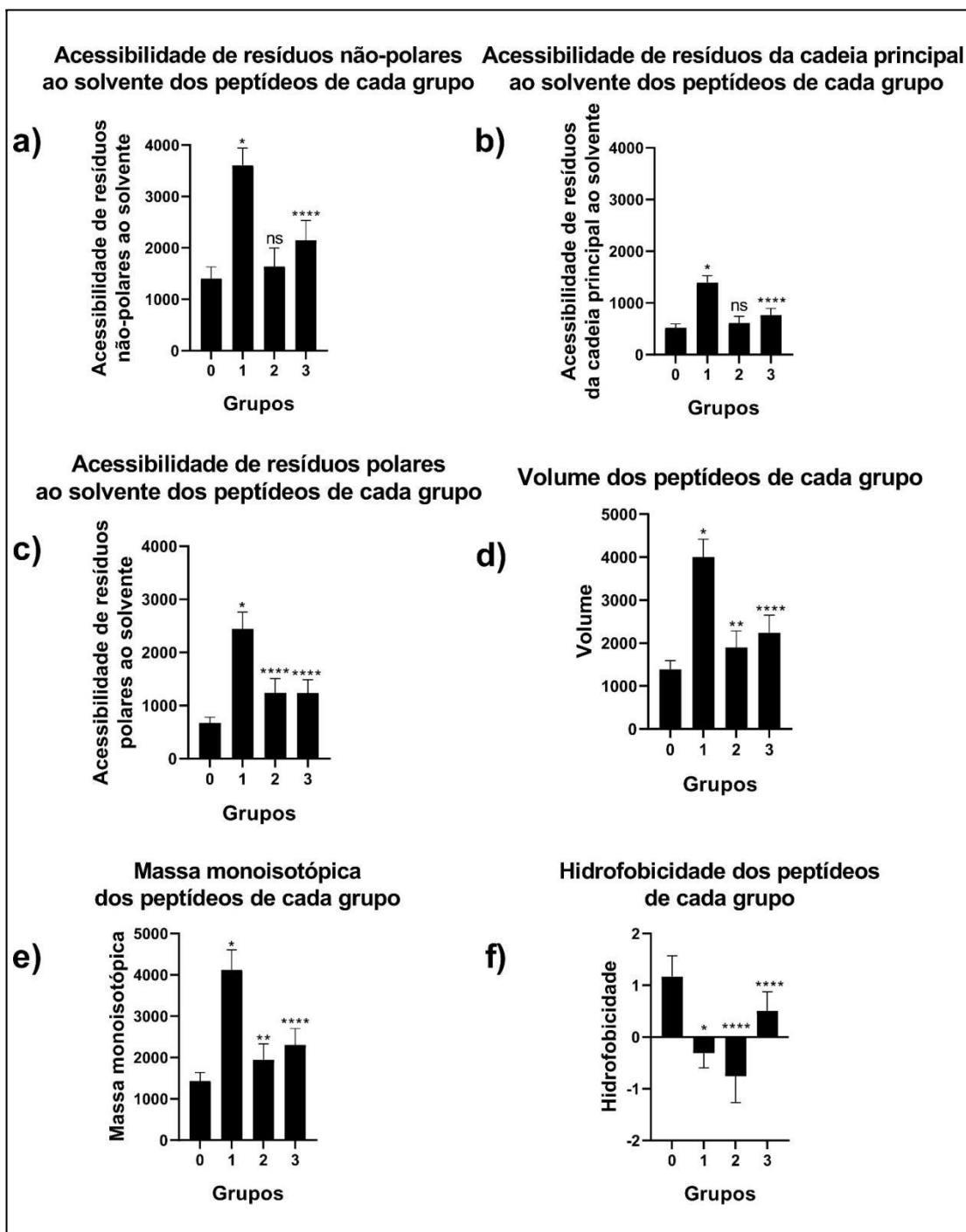
A previsão da estrutura secundária de um peptídeo desempenha um papel crucial não apenas na compreensão de sua configuração estrutural, mas também na elucidação de seus potenciais efeitos biológicos. Ma Z. e colaboradores (2016), por exemplo, concluíram em seu trabalho que existe uma correlação fundamental entre a helicidade de um peptídeo e sua atividade antimicrobiana (Ma Z. *et al.*, 2016). De fato, a grande maioria dos AMPs são descritos na literatura científica como helicoidais, e pouco se sabe sobre a formação de folhas- $\beta$  e voltas. Hadianamrei R. *et al.* (2022) enfatizam a necessidade de se realizar estudos sistemáticos que correlacionam propriedades físico-químicas de peptídeos que formam folhas- $\beta$  com suas atividades e seletividade. Estes autores observaram em um de seus trabalhos que há uma forte correlação entre o conteúdo de folhas- $\beta$  de peptídeos e sua atividade antitumoral contra células HCT116, mas o mesmo não foi observado para células HeLa (Hadianamrei R. *et al.*, 2022). Recentemente, Santos e colaboradores (2023) evidenciaram que o peptídeo Hs10, um fragmento da proteína Complemento C3 humana, exibe a capacidade de interagir com o LPS, transitando de uma forma desestruturada para um segmento de folha- $\beta$ . Adicionalmente, observaram-se alterações na membrana da bactéria *E. coli*. Esses resultados destacam que certos peptídeos catiônicos que adotam a conformação de folhas- $\beta$  podem manifestar atividade antimicrobiana, conforme demonstrado por Santos e sua equipe (Santos M. A. *et al.*, 2023) (Santos M. A. *et al.*, 2023).

De qualquer forma, estudos mais aprofundados no âmbito da biologia estrutural devem ser realizados para se correlacionar mais assertivamente os

parâmetros de estrutura secundária (coeficientes de folhas- $\beta$ ,  $\alpha$ -hélices e voltas) e seus efeitos para macrófagos RAW 264.7.

Adicionalmente, também foram obtidos os valores de ponto isoelétrico (PI) de cada grupo. Os peptídeos de todos os grupos se mostram dispersos quando se trata deste parâmetro, o que é refletido nos grandes desvios observados na figura 21.f. Por consequência, o PI pode não ser um parâmetro físico-químico interessante para comparação, mas, mesmo assim, é um dado que auxilia na caracterização geral de peptídeos citotóxicos e não-citotóxicos.





**Fig. 22. Parte 3: Valores médios dos atributos físico-químicos para cada grupo.** (A) acessibilidade de resíduos não-polares ao solvente; (B) acessibilidade de resíduos da cadeia principal ao solvente; (C) acessibilidade de resíduos polares ao solvente; (D) volume; (E) massa monoisotópica e (F) hidrofobicidade. P-value  $\leq 0,001$ : \*\*\*\*; p-value  $\leq 0,005$ : \*\*\*; p-value  $\leq 0,01$ : \*\*; p-value  $\leq 0,05$ : \*; p-value  $> 0,05$ : ns (não significativo).

Já em relação ao volume e à massa monoisotópica dos peptídeos analisados, os do grupo 0 possuem, em média, valores menores para esses

parâmetros do que os outros grupos (Fig. 22. d e e). Esses dados podem indicar que, entre os peptídeos analisados neste trabalho, os não-citotóxicos para macrófagos murinos são, em média, moléculas menores e provavelmente mais compactas. O volume de um peptídeo pode indicar o grau de enovelamento, ou seja, uma vez que este índice é menor, indica um maior empacotamento (Counterman A. E. e Clemmer D. E., 1999).

Além disso, como evidenciado na figura 22 (a, b e c), os resíduos dos peptídeos do grupo 0 são, em geral, menos acessíveis ao solvente do que os dos outros três grupos. Os resíduos apolares e os da cadeia principal dos peptídeos dos grupos 0 e 2 são igualmente menos acessíveis ao solvente quando comparados aos grupos 1 e 3. Isso significa que peptídeos citotóxicos (grupos 1, 2 e 3) se comportam de maneiras diferentes quanto aos parâmetros físico-químicos em questão, uma vez que o grupo 2 é semelhante ao grupo 0.

Apesar disso, existem diferenças significativas entre os grupos em relação à acessibilidade ao solvente dos resíduos polares dos peptídeos, sendo que o grupo 0 demonstra ter valor médio de acessibilidade menor (Fig. 22. c). Este dado corrobora com o possível enovelamento de peptídeos não-citotóxicos inseridos do grupo 0, uma vez que resíduos polares que deixam de interagir com o solvente começam a formar possíveis agregados ordenados (conjuntos de peptídeos que interagem entre si), e a entropia do sistema também pode direcionar ao seus enovelamentos (Sharp J. S., Becker J. M. e Hettich R. L., 2004).

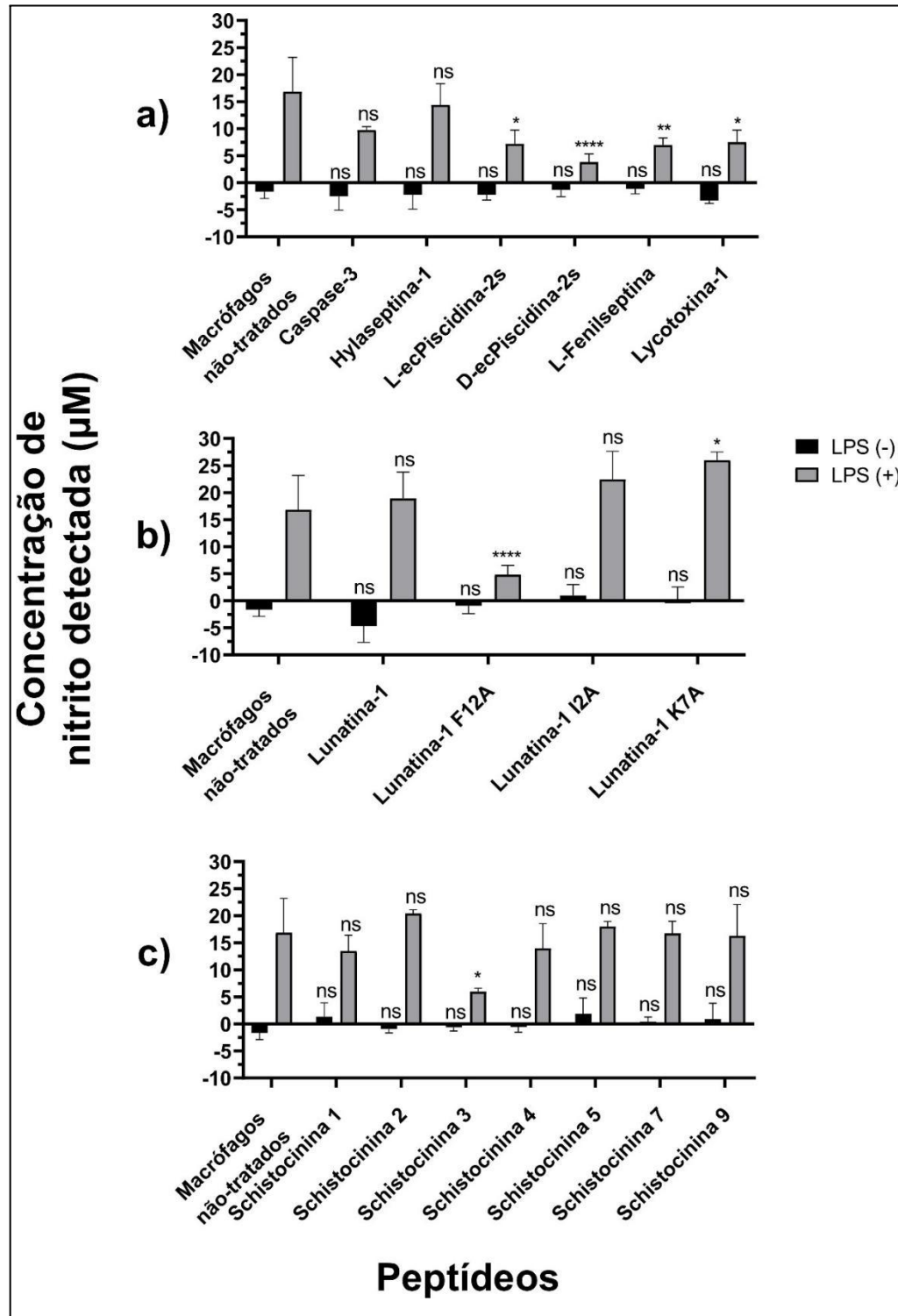
O grupo 0 contém peptídeos mais hidrofóbicos que os outros grupos. Isso se dá pela riqueza de resíduos de A, G, I, L e F neste grupo, que possuem cadeia lateral hidrofóbica. A hidrofobicidade é uma propriedade conhecida importante para a função de um peptídeo, uma vez que é necessária certa hidrofobicidade para acessar e desestruturar a bicamada fosfolipídica das membranas celulares. Alguns estudos relacionados a peptídeos antitumorais indicam que quanto maior a hidrofobicidade, maior a bioatividade contra algumas linhagens tumorais. O aumento da hidrofobicidade também pode aumentar a neutralização de lipopolissacarídeos de bactérias, a permeabilização de membranas e a atividade antibacteriana. No entanto, ainda é necessário estabelecer melhor como a hidrofobicidade afeta a citotoxicidade às células

hospedeiras (Gong H. *et al.*, 2019; Zhang M. *et al.*, 2022). O fato do grupo 0 ter a hidrofobicidade média maior que a dos outros grupos pode indicar que o aumento dessa característica físico-química não aumenta citotoxicidade contra macrófagos murinos, uma vez que os peptídeos deste grupo são não-citotóxicos.

### **5.5. Peptídeos bioativos podem modular a via do óxido nítrico em macrófagos RAW**

Os peptídeos bioativos sintetizados também foram investigados quanto aos seus efeitos imunomodulatórios. Para isso, foi quantificada a concentração de nitrito, um metabólito produto da via do óxido nítrico. Esta via é conhecida importante para o combate de patógenos intracelulares por células fagocíticas como os macrófagos, sendo, portanto, uma via interessante de ser investigada em relação a sua ativação por peptídeos bioativos.

Levando em consideração os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados, para a quantificação de óxido nítrico os macrófagos foram tratados com concentrações não-citotóxicas de cada peptídeo, como descrito anteriormente. Em relação aos peptídeos citotóxicos LyeTx1, L-ecPis2s e D-ecPis2s, foi observado uma diminuição na concentração de nitrito detectável (Fig. 23. a), quando comparado ao grupo controle. Isso indica que esses peptídeos, além de citotóxicos para macrófagos murinos em determinadas concentrações, também se apresentam como potenciais inibidores da via do óxido nítrico. Este fenômeno também foi observado para três peptídeos não-citotóxicos, a L-Phes (Fig. 23. a), a Lun1 F12A (Fig. 23. b) e a Schisn3 (Fig. 23. c). Sobre estes três últimos, pode-se entender que, apesar de não interferirem na atividade mitocondrial e, assim, não levarem à morte celular detectável por ensaio de MTT, eles inibiram uma via importante dos macrófagos, podendo diminuir a sua capacidade de montar uma resposta imune adequada frente a infecções por patógenos intracelulares.



**Fig. 23. Avaliação da ativação da via do óxido nítrico em macrófagos RAW tratados com os peptídeos.** Os macrófagos foram tratados apenas com peptídeo (barras pretas) ou com peptídeos e LPS 10 µg/mL (barras cinzas) por 24 horas. Os peptídeos CAS3, Hsp1, L-ecPis2s, D-ecPis2s, L-Phes e LyeTx1 não provocaram aumento significativo na concentração de nitrito (A). Das lunatinas (B), a aplicação do peptídeo Lun1 K7A aumentou a concentração de nitrito produzido pelas células. Quanto às schistocininas (C), também não foi detectado aumento na concentração de nitrito. P-value ≤ 0,001: \*\*\*\*; p-value ≤ 0,005: \*\*\*; p-value ≤ 0,01: \*\*; p-value ≤ 0,05: \*; p-value > 0,05: ns (não significativo). Os valores mostrados representam a média de três experimentos independentes.

Devido ao fato de a inibição da via do óxido nítrico estar associada à imunossupressão, trabalhos que propõem moléculas que ativam a via são mais comumente realizados do que investigações sobre substâncias que a inibem. Entretanto, é válido ressaltar que o óxido nítrico é um mediador inflamatório, e sua inibição por parte dos peptídeos testados pode estar relacionada com um efeito anti-inflamatório dessas moléculas. Investigações nesse sentido podem despertar interesse biotecnológico para a realização de novas moléculas anti-inflamatórias, devendo ser melhor exploradas.

Em contrapartida, o único peptídeo testado capaz de aumentar a concentração de nitrito nos macrófagos foi a Lun1 K7A. Como as outras lunatinas não alteraram a concentração de nitrito (com exceção da Lun1 F12A, que causou sua diminuição), pode-se inferir que, aparentemente, a substituição da lisina na posição sete por uma alanina foi fundamental para a observação do efeito imunomodulatório desse peptídeo. Esse aumento da concentração de nitrito em relação à concentração basal é interessante quando se busca peptídeos com atividade antimicrobiana, tendo em vista que o óxido nítrico é conhecidamente fundamental para a resposta contra patógenos. Os valores das concentrações de nitrito calculadas para cada peptídeo estão expostos na tabela 2.

Por fim, a relação entre atributos físico-químicos e a atividade imunomodulatória de peptídeos bioativos parece não ser óbvia e deve ser investigada mais profundamente para se chegar a maiores conclusões.

**Tabela. 2. Resumo dos resultados dos ensaios biológicos realizados com cada peptídeo.** A tabela mostra o nome abreviado do peptídeo, sua sequência aminoacídica, o grupo do PCA do qual ele faz parte, os valores calculados de  $CC_{50}$  (em  $\mu M$ ) e os valores das concentrações de nitrito calculadas no ensaio de reação de Griess, em  $\mu M$ . NA: não avaliado.

Peptídeo	Estrutura primária	Grupo	$CC_{50}$ em $\mu M$ (24h)	$CC_{50}$ em $\mu M$ (48h)	Conc. de nitrito calculada ( $\mu M$ )
Schisn1	LYIDDQISCCSTDLCNGMT	3	> 100	> 100	13,48 $\pm$ 2,95
Schisn2	NTDLCNGLTVDNTG	2	> 100	> 100	20,40 $\pm$ 0,72
Schisn3	VTRRSGGIS	0	> 100	> 100	5,99 $\pm$ 0,62
Schisn4	YIMVNILD	0	> 100	> 100	14,00 $\pm$ 4,55
Schisn5	EYIGIFLYIMVNILD	0	> 100	> 100	18,00 $\pm$ 0,91
Schisn7	NYSIHRICVF	0	> 100	> 100	16,74 $\pm$ 2,22
Schisn8	TAGYNYSIHRICVF	0	> 100	> 100	NA
Schisn9	WEYIGIFLYIMVNILD	0	> 100	> 100	16,25 $\pm$ 5,84
Hsp1	GILDAIKAIKAAG	0	> 100	> 100	14,40 $\pm$ 3,94
Cas3	FIGLLKKITNFF	0	> 100	> 100	9,73 $\pm$ 0,66
LyeTx1	IWLTKALKFLGKNLGKHLAK QQLAKL	3	25,78 $\pm$ 4,14	32,65 $\pm$ 4,93	7,52 $\pm$ 2,20
L-Phes	FFFDTLKNLAGKVIGALT	3	> 100	> 100	6,98 $\pm$ 1,33
D-Phes	FFFDTLKNLAGKVIGALT	3	> 100	> 100	NA
L-ecPis2s	FFFHIIKGLFHAGRMIHGL V	3	31,23 $\pm$ 3,08	98,09 $\pm$ 12,95	7,13 $\pm$ 2,51
D-ecPis2s	FFFHIIKGLFHAGRMIHGL V	3	52,84 $\pm$ 7,16	74,89 $\pm$ 1,48	3,81 $\pm$ 1,54
Lun1	FIGLLKTLTSFF	0	> 100	> 100	18,94 $\pm$ 4,88
Lun1 I2A	FAGLLKTLTSFF	0	> 100	> 100	22,45 $\pm$ 5,19
Lun1 G4A	FIGALLKTLTSFF	0	> 100	> 100	NA
Lun1 K7A	FIGLLATLTSFF	0	> 100	> 100	26,01 $\pm$ 1,50
Lun1 F12A	FIGLLKTLTSAF	0	> 100	> 100	4,80 $\pm$ 1,75

### **5.6. Uma estratégia para o desenho racional de novos peptídeos bioativos sem atividade citotóxica pode ser proposta**

O grupo predominantemente composto por peptídeos não-citotóxicos (grupo 0) destaca-se por notáveis diferenças físico-químicas em relação aos demais conjuntos. Essas discrepâncias, incluindo um menor coeficiente de formação de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e voltas, uma reduzida quantidade de resíduos básicos e carregados, além de menor volume, massa e acessibilidade dos resíduos ao solvente, podem ser consideradas como guias valiosas no desenvolvimento de novos peptídeos não-citotóxicos.

É importante salientar que, embora o efeito citotóxico de um peptídeo possa variar conforme a linhagem celular utilizada, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que um peptídeo não-citotóxico para macrófagos murinos RAW deve apresentar as características físico-químicas mencionadas anteriormente. Essas conclusões proporcionam informações valiosas para o desenho racional de peptídeos com potencial aplicação em terapias ou abordagens antimicrobianas.

## 6. Conclusões

Dentre os grupos de peptídeos formados na análise de *clusters* realizada neste trabalho, o grupo 0 não contém nenhum peptídeo citotóxico para macrófagos murinos, sendo, ainda, composto pela maioria dos peptídeos que não foram citotóxicos de acordo com nossos ensaios. Já os outros grupos (1, 2 e 3) são compostos majoritariamente de peptídeos citotóxicos para macrófagos.

O grupo 0 possui algumas características biofísicas que o diferenciam dos outros grupos. Os peptídeos não citotóxicos do grupo 0 tendem a ser menores em volume e massa, indicando serem moléculas mais compactas, o que pode estar relacionado a seus possíveis enovelamentos. Além disso, esses peptídeos possuem resíduos que são menos acessíveis ao solvente, especialmente os resíduos apolares, o que pode contribuir para a sua estabilidade estrutural. O grupo 0 mostra coeficientes de formação de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e voltas menores em comparação com os grupos 1 e 3.

O grupo 2, que também é composto por peptídeos citotóxicos, é semelhante ao grupo 0 nesses aspectos estruturais. A helicidade de um peptídeo é mencionada como correlacionada com a atividade antimicrobiana, sugerindo que as diferenças nas estruturas secundárias podem influenciar a citotoxicidade dos peptídeos. É importante destacar a necessidade de estudos adicionais para correlacionar de forma mais precisa os parâmetros de estrutura secundária com os efeitos dos peptídeos em macrófagos RAW 264.7. Outra diferença notável é em relação à maior hidrofobicidade dos peptídeos do grupo 0 devido à presença de resíduos hidrofóbicos em sua sequência. No entanto, o fato de os peptídeos do grupo 0 serem mais hidrofóbicos do que os peptídeos citotóxicos dos outros grupos sugere que a hidrofobicidade por si só não é suficiente para determinar a citotoxicidade contra macrófagos murinos, ou até mesmo em qualquer outro tipo celular.

Portanto, a não-citotoxicidade dos peptídeos do grupo 0 parece estar relacionada a uma combinação de fatores, incluindo tamanho, compactação, estabilidade estrutural e hidrofobicidade. Essas informações contribuem para uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas que influenciam a atividade



biológica dos peptídeos, permitindo o desenvolvimento de abordagens mais refinadas no design de peptídeos terapêuticos e na compreensão de suas interações com as células hospedeiras.

## Referências Bibliográficas

BAHAR, A. ; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ph6121543>>.

BALLWEBER, L. M.; JAYNES, J. E.; STAMM, W. E.; *et al.* In Vitro Microbicidal Activities of Cecropin Peptides D2A21 and D4E1 and Gel Formulations Containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 34–41, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.46.1.34-41.2002>>.

BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B. ; BOMAN, A. Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2978–2984, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2978-2984.1993>>.

BRAND, G. D.; RAMADA, M.; MANICKCHAND, J. R.; *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS One**, v. 14, n. 8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/2285659>>.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>>.

BROWN, M. B. ; FORSYTHE, A. B. Corrigenda: Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/2286046>>. Acesso em: 2023.

CARDOSO, F. C.; PACÍFICO, R. N. A.; MORTARA, R. A.; *et al.* Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental

protein Sm29 identified through genomic studies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 144, n. 3, p. 382–391, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03081.x>>.

CASTEELS-JOSSON, K.; CAPACI, T.; CASTEELS, P.; *et al.* Apidaecin multipeptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 4, p. 1569–1578, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05801.x>>.

CHAN, W. C. ; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach**. 1. ed. [s.l.]: Practical Approach Series, 2000.

COUNTERMAN, A. E. ; CLEMMER, D. E. Volumes of Individual Amino Acid Residues in Gas-Phase Peptide Ions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 16, p. 4031–4039, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja984344p>>.

DING, C. ; HE, X. K-means Clustering via Principal Component Analysis. **ACM Digital Library**, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/0.1145/1015330.1015408>>.

DONG, N.; WANG, C.; LI, X.; *et al.* Simplified Head-to-Tail Cyclic Polypeptides as Biomaterial-Associated Antimicrobials with Endotoxin Neutralizing and Anti-Inflammatory Capabilities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5904, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20235904>>.

ERVIANA, R.; SAENGGKUN, Y.; RUNGSA, P.; *et al.* Novel Antimicrobial Peptides from a Cecropin-Like Region of Heteroscorpine-1 from *Heterometrus laoticus* Venom with Membrane Disruption Activity. **Molecules**, v. 26, n. 19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules26195872>>.

FANG, F. C. **Nitric Oxide and Infection**. [s.l.]: Springer Science & Business Media, 2002.

GASPAR, D.; VEIGA, A. S. ; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>>.

GOMES, K. S. **Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

GONG, H.; ZHANG, J.; HU, X.; *et al.* Hydrophobic Control of the Bioactivity and Cytotoxicity of de Novo-Designed Antimicrobial Peptides. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 38, p. 34609–34620, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.9b10028>>.

GRAFSKAIA, E. N.; PAVLOVA, E. R.; LATSIS, I. A.; *et al.* Non-toxic antimicrobial peptide Hm-AMP2 from leech metagenome proteins identified by the gradient-boosting approach. **Materials & Design**, v. 224, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111364>>.

GRECO, I.; MOLCHANOVA, N.; HOLMEDAL, E.; *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>>.

GRIMSLEY, Gerald R. ; PACE, C. Nick. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. **Current Protocols in Protein Science**, v. 33, n. 1, 2003.

HADIANAMREI, R.; WANG, J.; BROWN, S.; *et al.* Rationally designed cationic amphiphilic peptides for selective gene delivery to cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 617, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121619>>.

HARMS, M. J.; SCHLESSMAN, J. L.; SUE, G. R.; *et al.* Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 47, p. 18954–18959, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1104808108>>.

HE, J. F.; JIN, D. X.; LUO, X. G.; *et al.* LHH1, a novel antimicrobial peptide with anti-cancer cell activity identified from *Lactobacillus casei* HZ1. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-020-01139-8>>.

HONDA, K.; NOTSU, A. ; ICHIHASHI, H. Fuzzy PCA-Guided Robust  $k$ -Means Clustering. **IEEE Transactions on Fuzzy Systems**, v. 18, n. 1, p. 67–79, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1109/tfuzz.2009.2036603>>.

HOSKIN, D. W. ; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>>.

JAKUBCZYK, A.; KARASÍ, M.; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K.; *et al.* Current Trends of Bioactive Peptides—New Sources and Therapeutic Effect. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 846, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods9070846>>.

JANG, J. H.; KIM, M. Y.; LEE, J. W.; *et al.* Enhancement of the cancer targeting specificity of buforin IIb by fusion with an anionic peptide via a matrix metalloproteinases-cleavable linker. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 895–899, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.02.010>>.

JUNIOR, E. F. C.; GUIMARÃES, C. F. R. C.; FRANCO, L. L.; *et al.* Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity. **Amino Acids**, v. 49, n. 8, p. 1389–1400, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-017-2441-2>>.

KITAMURA, T.; KIMURA, K.; MAKONDO, K.; *et al.* Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase-dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1698–1705, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00125-003-1232-3>>.

KOO, H. B. ; SEO, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. **Peptide Science**, v. 111, n. 5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pep2.24122>>.

KÜCKELHAUS, S. A. S.; DE AQUINO, D. S.; BORGES, T. K.; *et al.* Phylloseptin-1 is Leishmanicidal for Amastigotes of *Leishmania amazonensis* Inside Infected Macrophages. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 13, p. 4856, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17134856>>.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A. ; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>>.

LADNER, C. L.; TURNER, R. J. ; EDWARDS, R. A. Development of indole chemistry to label tryptophan residues in protein for determination of tryptophan surface accessibility. **Protein Science**, v. 16, n. 6, p. 1204–1213, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1110%2Fps.062728407>>.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; *et al.* Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>>.

LIMA, L. S. Lei de Lambert–Beer. **Revista de Ciência Elementar**, v. 1, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.24927/rce2013.047>>.

LU, J.; XU, H.; XIA, J.; *et al.* D- and Unnatural Amino Acid Substituted Antimicrobial Peptides With Improved Proteolytic Resistance and Their Proteolytic Degradation Characteristics. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 563030, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.563030>>.

MA, L.; YE, X.; SUN, P.; *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activity of the EeCentrocin 1 derived peptide EC1-17KV via membrane disruption. **EBioMedicine**, v. 55, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102775>>.

MA, Z.; YANG, J.; HAN, J.; *et al.* Insights into the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Engineered  $\alpha$ -Helical Peptide Amphiphiles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 10946–10962, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00922>>.

MAGALHÃES, M.T. Q. de; BARBOSA, E. A.; PRATES, M. V.; *et al.* Conformational and Functional Effects Induced by D- and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 14, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059255>>.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; *et al.* Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>>.

MENDES, M. ; PALA, A. Type I Error Rate and Power of Three Normality Tests. **Pakistan Journal of Information and Technology**, v. 2, n. 2, p. 135–139, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.3923/itj.2003.135.139>>.

MIJIDDORJ, B.; MATSUO, Y.; SATO, H.; *et al.* A Comparative Study on Interactions of Antimicrobial Peptides L- and D-phenylseptin with 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. **Applied Sciences**, v. 9, n. 13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/app9132601>>.

MUELLER, L. K.; BAUMRUCK, A. C.; ZHDANOVA, H.; *et al.* Challenges and Perspectives in Chemical Synthesis of Highly Hydrophobic Peptides. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 162, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00162>>.

MULDER, K. C. L.; LIMA, L. A.; MIRANDA, V. J.; *et al.* Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides.

**Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00321>>.

MUNHOZ, V. H. O.; FERREIRA, C. S.; NUNES, L. O.; *et al.* Epimers l- and d-Phenylseptin: How the relative stereochemistry affects the peptide-membrane interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1863, n. 11, p. 183708, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183708>>.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F. ; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>>.

NISHIKATA, M.; KANEHIRA, T.; OH, H.; *et al.* Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 174, n. 2, p. 625–630, 1991.

OLIVO, E. A. C. **Efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx-I associado à  $\beta$ -ciclodextrina em biofilmes de bactérias patogênicas periodontais: estudo in vitro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

PAVLICEVIC, M.; MARMIROLI, N. ; MAESTRI, E. Immunomodulatory peptides—A promising source for novel functional food production and drug discovery. **Peptides**, v. 148, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170696>>.

PIRTSKHALAVA, M.; AMSTRONG, A. A.; GRIGOLAVA, M.; *et al.* DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D288–D297, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>>.

POPOV, C.S.F.C.; MAGALHÃES, B. S.; GOODFELLOW, B. J.; *et al.* Host-defense peptides AC12, DK16 and RC11 with immunomodulatory activity isolated from *Hypsiboas raniceps* skin secretion. **Peptides**, v. 113, p. 11–21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.12.007>>.



PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C.B.; *et al.* The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018–13026, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.m310838200>>.

RAJAPAKSHA, D.C.; JAYATHILAKA, E. H. T. T.; EDIRISINGHE, S. L. ; *et al.* Octopromycin: Antibacterial and antibiofilm functions of a novel peptide derived from *Octopus minor* against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* . **Fish and Shellfish Immunology**, v. 117, p. 82–94, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.019>>.

RAJASEKARAN, G.; KUMAR, S. D.; YANG, S.; *et al.* The design of a cell-selective fowlicidin-1-derived peptide with both antimicrobial and anti-inflammatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111623>>.

RAJU, S. V.; SARKAR, P.; KUMAR, P.; *et al.* Piscidin, Fish Antimicrobial Peptide: Structure, Classification, Properties, Mechanism, Gene Regulation and Therapeutical Importance. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 91–107, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10989-020-10068-w>>.

REED, J. F. ; STARK, D. B. Robust alternatives to traditional analysis of variance: Welch  $W^*$ , James J I\*, James J II\*, Brown-Forsythe BF\*. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 26, n. 3, p. 233–237, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0169-2607\(88\)90003-x](https://doi.org/10.1016/0169-2607(88)90003-x)>.

SANTANA, H. F. **Determinação da diversidade peptídica do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

SANTOS, B. P. O. **Caracterização biofísica e estrutural de criptídeos antimicrobianos: Estudo da porção antigênica da proteína SmKI-1 de**

**Schistosoma mansoni**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

SANTOS, B. P. O.; ALVES, E. S. F.; FERREIRA, C. S.; *et al.* Schistocins: Novel antimicrobial peptides encrypted in the *Schistosoma mansoni* Kunitz Inhibitor SmKI-1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129989>>.

SANTOS, D. M.; VERLY, R. M.; PILÓ-VELOSO, D.; *et al.* LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**, v. 39, n. 1, p. 135–144, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0385-x>>.

SANTOS, M. A.; SILVA, F. L.; LIRA, B. O. V.; *et al.* Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1867, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130265>>.

SCHLIPPE, Y. V. ; HEDSTROM, L. A twisted base? The role of arginine in enzyme-catalyzed proton abstractions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, n. 1, p. 266–278, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.018>>.

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277–282, 1974. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90034-7)>.

SHANG, D.; YU, F.; LI, J.; *et al.* Molecular Cloning of cDNAs Encoding Antimicrobial Peptide Precursors from the Skin of the Chinese Brown Frog, *Rana chensinensis*. **Zoological Science**, v. 26, n. 3, p. 220–226, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2108/zsj.26.220>>.

SHIRI, S.; HASANI, F. ; FASIHI-RAMANDI, M. Activity of a Novel Antimicrobial Peptide with Nitric Oxide Induction against some Pathogenic Bacteria. **Journal of**

**1-Applied Biotechnology Reports Original Article**, v. 9, n. 1, p. 531–538, 2022.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.30491/JABR.2021.277169.1368>>.

SOHLENKAMP, C. ; GEIGER, O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 1, p. 133–159, 2015.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>>.

SYAKUR, M. A.; KHOTIMAH, B. K.; ROCHMAN, E. M. S.; *et al.* Integration K-Means Clustering Method and Elbow Method For Identification of The Best Customer Profile Cluster. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 336, p. 012017, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1757-899x/336/1/012017>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>>.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 51–70, 2007.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>>.

WADDELL, W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 48, n. 2, p. 311–314, 1956.

WANG, J.; MA, K.; RUAN, M.; *et al.* A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. **PeerJ**, v. 6, n. e5369, p. e5369, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.5369>>.

WELCH, B. L. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. **Biometrika**, v. 38, n. 3-4, p. 330–336, 1951. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/2332579>>.

WHEELER, L. C.; PERKINS, A.; WONG, C. E.; *et al.* Learning peptide recognition rules for a low-specificity protein. **The Protein Society**, v. 29, n. 11, p. 2259–2273, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pro.3958>>.

WIMLEY, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. 905–917, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cb1001558>>.

WU, Y. ; JIN, M. Sources, Mechanism and Clinical Application of Antimicrobial Peptides. **Advances in Clinical Medicine**, v. 10, n. 08, p. 1729–1942, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.12677/acm.2020.108260>>.

XIAO, X.; LU, H.; ZHU, W.; *et al.* A Novel Antimicrobial Peptide Derived from Bony Fish IFN1 Exerts Potent Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity in Mammals. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/spectrum.02013-21>>.

YAN, L. ; ADAMS, M. E. Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p.2059–2066, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>>.

YEAMAN, M. R. ; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>>.

ZAVALETA, A.; NAVARRO, J. ; MATA, R. C. de la. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 906–909, 1981. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90090-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90090-8)>.

ZHANG, Y.; BHOSLE, A.; BAE, S.; *et al.* Discovery of bioactive microbial gene products in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 606, n. 7915, p. 1–7, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04648-7>>.

ZHUANG, Z. R.; YANG, X. D.; HUANG, X. Z.; *et al.* Three new piscidins from orange-spotted grouper ( *Epinephelus coioides* ): Phylogeny, expression and functional characterization. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 66, p. 240–253, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.011>>.

## Material Suplementar

### S1: Código para Teste de Shapiro-Wilk

```
import numpy as np
import pandas as pd
from scipy.stats import shapiro

# Objetivo : realizar o teste de shapiro-wilk em diferentes níveis
de significância

# Recebe o arquivo excel com os dados a serem analisados
input1 = input('Input file (xlsx): ')
input2 = input('Sheet: ')
data = pd.read_excel(input1, sheet_name=input2, decimal=',')

# Cria um DataFrame a partir dos dados fornecidos
dados = pd.DataFrame(data)

# Seleciona colunas
pep_cols = dados.iloc[:, 1:3]

# Calcula as médias das colunas selecionadas e adiciona como nova
coluna "Means"
dados['Means'] = pep_cols.mean(axis=1, skipna=True)

# Extrai as médias das triplicatas
means = dados['Means'].dropna()

# Realiza o teste de Shapiro-Wilk
shapiro_stat, shapiro_p_value = shapiro(means)

# Define níveis de significância
significance_levels = [0.05, 0.005, 0.001]

# Verifica se os dados são normalmente distribuídos para
diferentes níveis de significância
for alpha in significance_levels:
    if shapiro_p_value > alpha:
        result = 'Distribuição normal: provavelmente SIM'
    else:
        result = 'Distribuição normal: provavelmente NÃO'
```

```
print(f"Para um nível de significância de {alpha}: Os dados
das médias {result}.")
```

## S2: Código para Teste T de Student

```
import numpy as np
import pandas as pd
from scipy.stats import t

# Objetivo: realizar teste T de Student em diferentes níveis de
significância

# Recebe o arquivo excel com os dados a serem analisados (células
tratadas x células não tratadas)
input1 = input('Input file (xlsx): ')
input2 = input('Sheet: ')
input3 = input('Output file: ')
dados = pd.read_excel(input1, sheet_name = input2, decimal = ',')

results = []
for index, row in dados.iterrows():
    concentration = row[0]
    pep_values = [val for val in row[[1, 2, 3]] if not
pd.isna(val)]
    raw_values = [val for val in row[[4,5,6]] if not pd.isna(val)]

    # Calcula as médias
    media_pep = np.mean(pep_values)
    media_raw = np.mean(raw_values)

    # Calcula os desvios-padrão amostrais
    s1 = np.std(pep_values, ddof=1)
    s2 = np.std(raw_values, ddof=1)

    # Calcula o tamanho das amostras
    n1 = len(pep_values)
    n2 = len(raw_values)

    # Calcula estatística t
    t_statistic = (media_pep - media_raw) / np.sqrt((s1**2 / n1) +
(s2**2 / n2))
```

```

# Calcula os graus de liberdade
df = n1 + n2 - 2

# Calcula o valor t crítico para 95%
t_critical = t.ppf(0.975, df) # 0.975 para uma divisão de
0.025 em cada cauda

# Calcula o valor-p
p_value = 2 * (1 - t.cdf(np.abs(t_statistic), df)) # Teste
bilateral

# Verifica se há diferença significativa
cutoff0 = 0.001
cutoff1 = 0.005
cutoff2 = 0.01
cutoff3 = 0.05
dif0 = "Y" if p_value < cutoff0 else "N"
dif1 = "Y" if p_value < cutoff1 else "N"
dif2 = "Y" if p_value < cutoff2 else "N"
dif3 = "Y" if p_value < cutoff3 else "N"

# Adiciona os resultados à lista
results.append([concentration, media_pep, media_raw, s1, s2,
                t_statistic, df, t_critical, p_value, dif0,
dif1, dif2, dif3])

# Cria um DataFrame com os resultados
results_df = pd.DataFrame(results, columns=["Concentration", "Mean
Pep 24", "Mean Pep 48", 'SD pep 24',
                                           'SD pep 48', 'T
Statistic', 'Degrees of freedom', 'T critical (95%)',
                                           "P-Value",
"Significance 0.1%", 'Significance 0.5%',
                                           'Significance 1%',
'Significance 5%'])
results_df.to_excel(input3, index=False)

```



**S3:** Código para plotar e calcular o CC<sub>50</sub>

```

import numpy as np
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.optimize import curve_fit

# Objetivo: plotar a curva de citotoxicidade e calcular o cc50

# Recebe o arquivo excel que contém os dados de citotoxicidade (%
# de células viáveis x concentração do peptídeo)
file = input('Arquivo excel: ')
sheet = input('Planilha: ')
pep = input('Peptídeo: ')
df = pd.read_excel(file, sheet_name=sheet)
dose = df['Concentração [µM]']
viabilidade = df[f'{pep}'] * 100

# Define a função exponencial da curva de citotoxicidade (y=a.b^x)
def exponential(x, A, B, C):
    return A * np.exp(-B * x) + C

# Ajusta a curva exponencial dos dados
#curve_fit é uma função de ajuste de curva que é parte do módulo
#scipy.optimize
params, covariance = curve_fit(exponential, dose, viabilidade,
p0=[100, 0.01, 0],maxfev=2000, method='trf')

# Parâmetros ajustados
A, B, C = params

# Cálculo do CC50 diretamente da equação
CC50 = -np.log(0.5 * A / (A - C)) / B

# Plot dos dados e da curva ajustada
plt.scatter(dose, viabilidade, label='Porcentagem de células
viáveis')
x_range = np.linspace(min(dose), max(dose), 100)
plt.plot(x_range, exponential(x_range, *params), 'r-',
label=f'Curva exponencial ajustada')
plt.ylim(-1, max(viabilidade)+10)
plt.xlabel('Concentração (µM)', fontsize = 14)

```

```

plt.ylabel('Macrófagos viáveis (%)', fontsize = 14)
plt.legend(loc='lower left')
plt.title(f'Curva de citotoxicidade do peptídeo {pep}', fontsize =
16)

# Exibição do gráfico
plt.grid(True)
plt.show()

# Saída da equação da curva ajustada
print(f'Equação da Curva (Exponencial):')
print(f'y = {A:.4f} * e^{-(B:.4f) * x} + {C:.4f}')

# Saída do valor do CC50
print(f'CC50 = {CC50:.2f} µM')

```

#### S4: Código para plotar os cromatogramas

```

import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.ticker import ScalarFormatter

# Objetivo: plotar o cromatograma de cada purificação

# Recebe o arquivo excel com os dados da cromatografia (tempo x
intensidade)
file = input('Nome do arquivo (.xlsx): ')
inp = input('Aba: ')
inp3 = input('Título do gráfico: ')
df = pd.read_excel(file, sheet_name=inp)
tempo = df['R.Time (min)'].values
intensidade = df['Intensity214'].values
intensidade2 = df['Intensity280'].values
gradiente = df['ACN'].values
branco = df['Blank'].values

# Subtrai os valores do branco
intensidade_corrigida = intensidade - branco
intensidade_corrigida2 = intensidade2 - branco

```

```

# Plota os eixos y (intensidade) e x (tempo)
fig, ax1 = plt.subplots(figsize=(10, 6))
ax1.plot(tempo, intensidade_corrigeida, label='214nm',
color='black')
ax1.plot(tempo, intensidade_corrigeida2, label='280nm',
color='red')

ax1.set_xlabel('Tempo (min)', fontsize = 18)
ax1.set_ylabel('Intensidade (mAU)', color='black', fontsize = 18)

ax1.tick_params(axis='y', labelcolor='black')
ax1.tick_params(axis='x', labelcolor='black')

ax1.set_ylim(-1000, max(intensidade_corrigeida) + 2000)
ax1.set_xlim(0, max(tempo))

ax1.set_xticks(np.arange(0, max(tempo), step = 5))
ax1.set_yticks(np.arange(-10000, max(intensidade_corrigeida)+20000,
step=20000))

# Coloca os valores do eixo y em notação científica
formatter = ScalarFormatter(useMathText=True)
formatter.set_powerlimits((0, 0)) #x*10^y
ax1.yaxis.set_major_formatter(formatter)

fig.tight_layout()

# Plota o gradiente de acetonitrila
ax2 = ax1.twinx()
ax2.plot(tempo, gradiente, label='ACN', color='blue')
ax2.set_ylabel('Gradiente de Acetonitrila (%)', color='black',
fontsize = 18)
ax2.tick_params(axis='y', labelcolor='black')

ax2.set_ylim(0, 100)
ax2.set_xlim(0, max(tempo))

ax2.set_yticks(np.arange(0, 101, step=5))

# Coloca as legendas juntas na esquerda superior
lines1, labels1 = ax1.get_legend_handles_labels()
lines2, labels2 = ax2.get_legend_handles_labels()

```

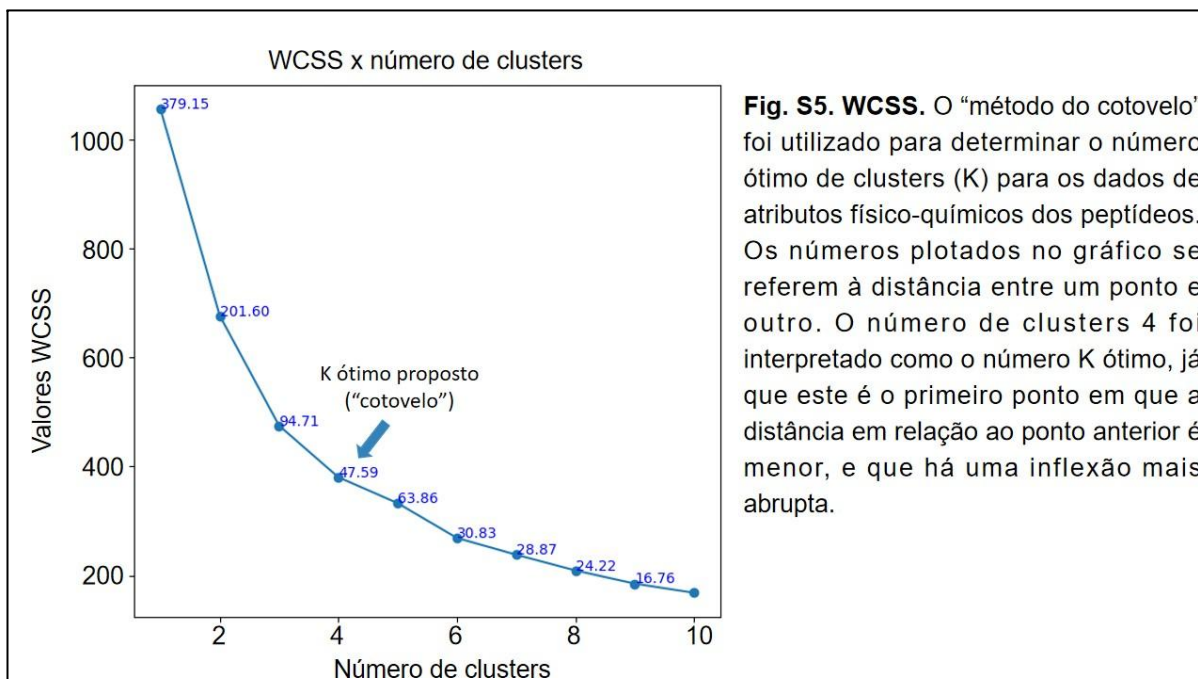
```

lines = lines1 + lines2
labels = labels1 + labels2
ax1.legend(lines, labels, loc='upper left')

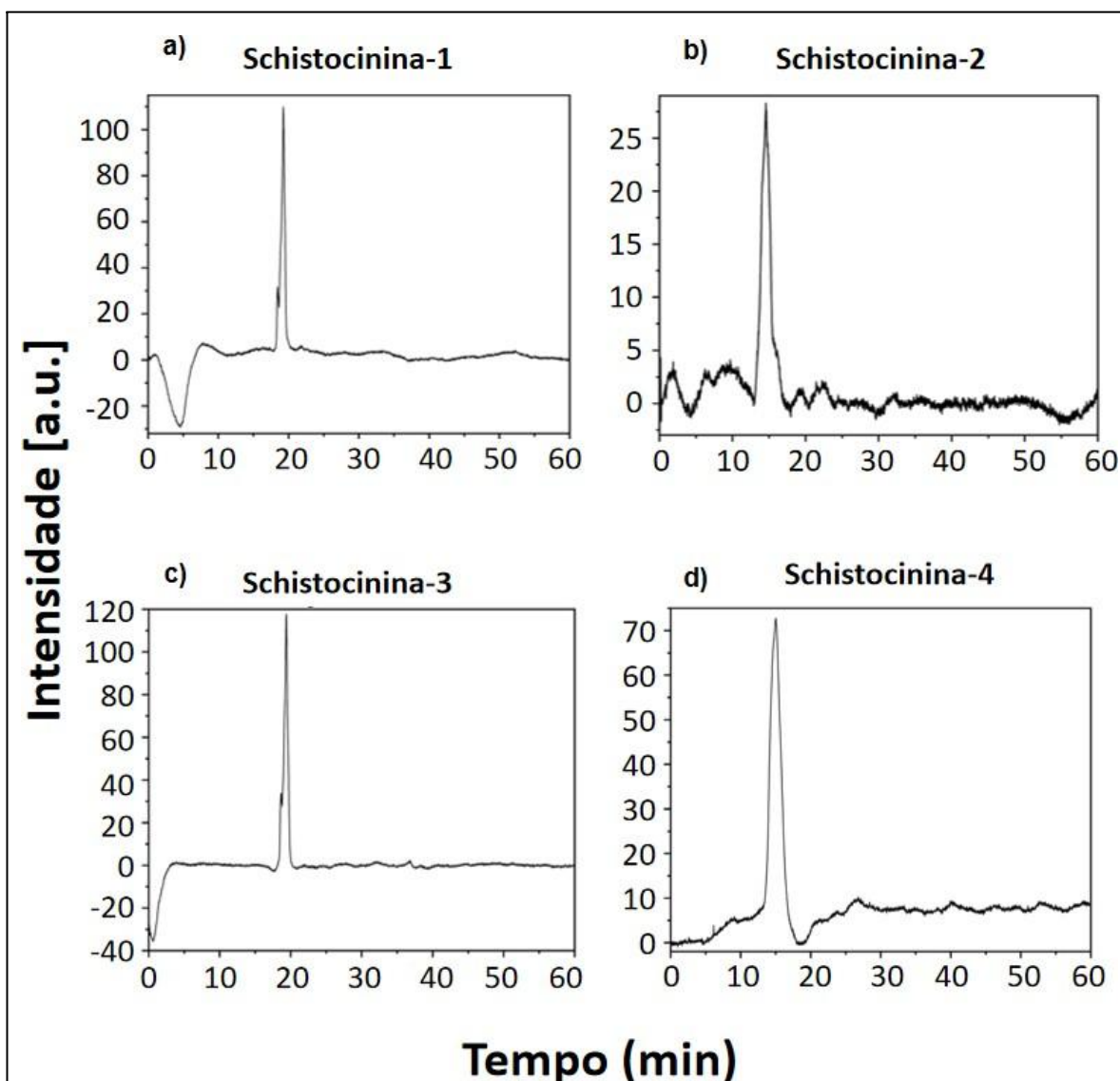
# Configurações gerais do gráfico
plt.title(inp3, fontsize=18, fontweight='bold')
fig.tight_layout()

plt.show()

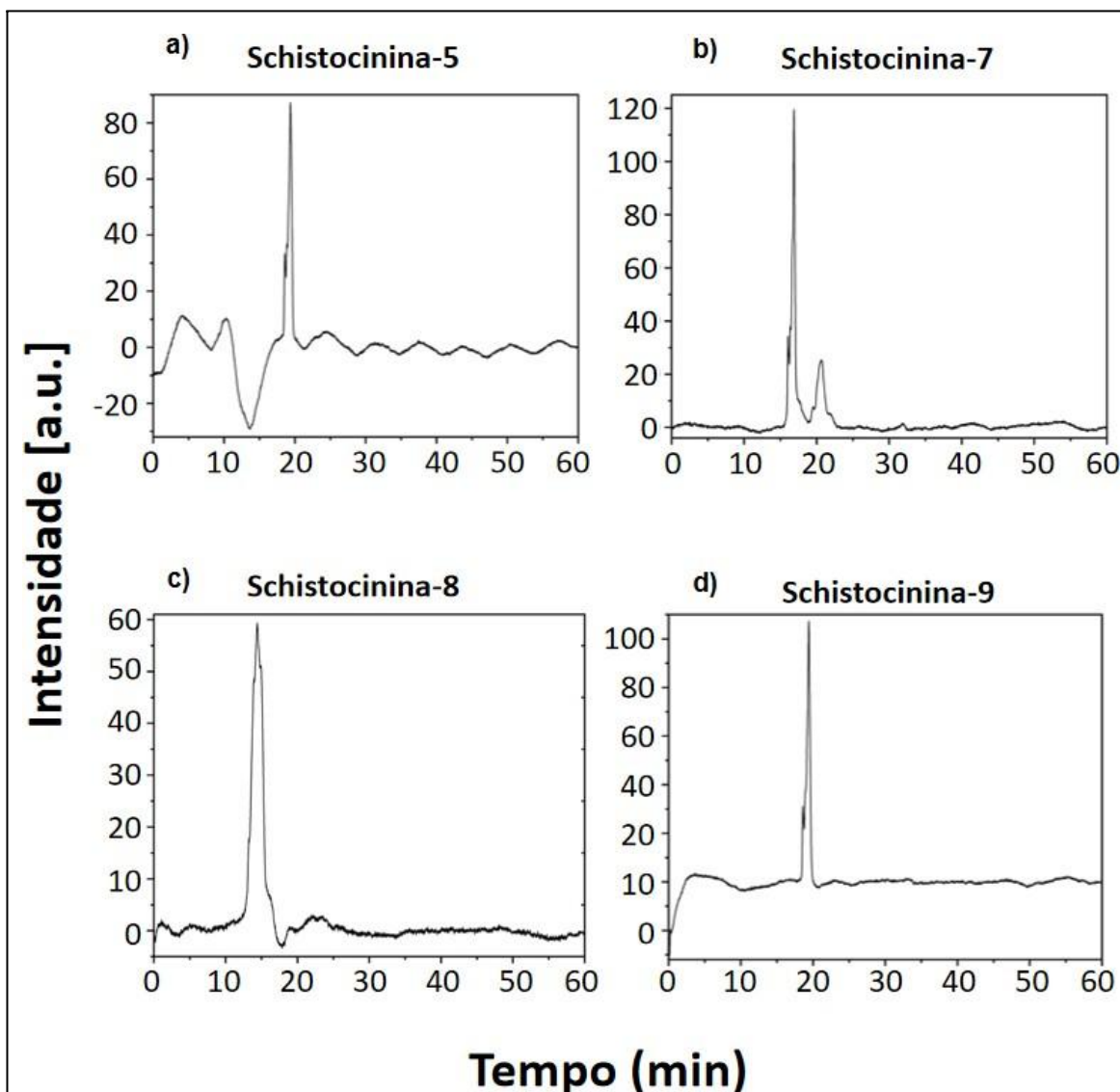
```



**Fig. S5. WCSS.** O “método do cotovelo” foi utilizado para determinar o número ótimo de clusters (K) para os dados de atributos físico-químicos dos peptídeos. Os números plotados no gráfico se referem à distância entre um ponto e outro. O número de clusters 4 foi interpretado como o número K ótimo, já que este é o primeiro ponto em que a distância em relação ao ponto anterior é menor, e que há uma inflexão mais abrupta.

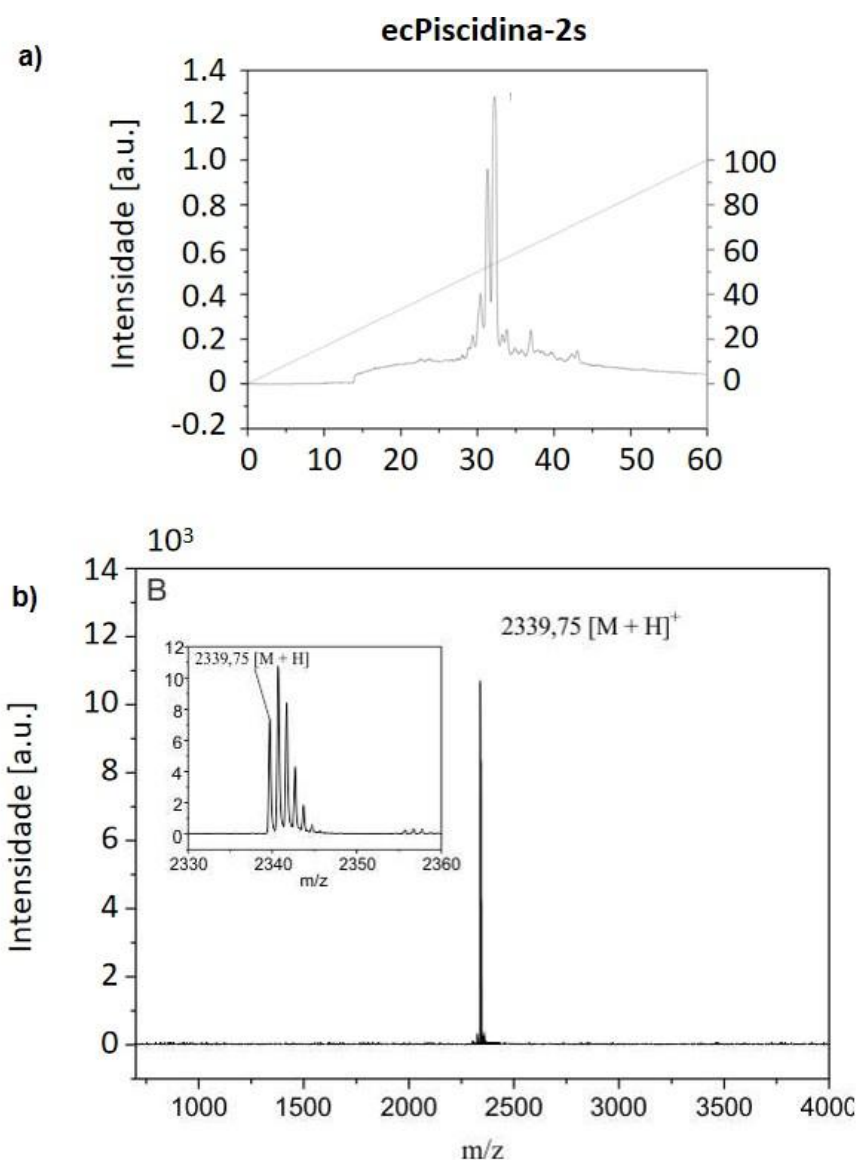


**Fig. S6. Cromatogramas dos peptídeos Schistocininas-1, -2, -3 e -4.** As cromatografias de fase reversa foram realizadas em coluna C18, sob gradiente de acetonitrila (0 a 100%) acidificada com TFA 0,08%. As purificações das schistocininas, bem como sua síntese, foram realizadas pelo colaborador Daniel A. G. R. Michel, estudante de mestrado no programa de pós-graduação em Química Orgânica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB). Dados não publicados.



**Fig. S7. Cromatogramas dos peptídeos Schistocininas-5, -7, -8 e -9.** As cromatografias de fase reversa foram realizadas em coluna C18, sob gradiente de acetonitrila (0 a 100%) acidificada com TFA 0,08%. As purificações das schistocininas, bem como sua síntese, foram realizadas pelo colaborador Daniel A. G. R. Michel, estudante de mestrado no programa de pós-graduação em Química Orgânica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB). Dados não publicados.





**Fig. S8. Purificação e caracterização das piscidinas.** As cromatografias de fase reversa foram realizadas em coluna C18, sob gradiente de acetonitrila (0 a 100%) acidificada com TFA 0,08% (a). A massa foi aferida por espectrometria de massa MALDI ToF/ToF, em modo linear positivo (b). As purificações das piscidinas, bem como sua síntese e análise de espectrometria de massa, foram realizadas pelo colaborador Lúcio Otávio Nunes, técnico em Química no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB - UFVJM). Dados publicados em sua tese “Investigações estruturais e biofísicas da interação peptídeo-membrana: um estudo dos casos hilaseptina P4 e ecPiscidina 2s”.