

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de peptídeos e conjugados peptídeo-fármacos, com atividade antibacteriana e antiparasitária.

Paulo Pitasse Santos

2022



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS E CONJUGADOS PEPTÍDEO-
FÁRMACOS, COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIPARASITÁRIA.**

PAULO PITASSE SANTOS

Sob a orientação do Professor
Marco Edilson Freire de Lima

e co-orientação da Professora
Débora Decotè Ricardo de Lima

com período sanduíche no exterior (Purdue University, IN, USA)
orientado pela Professora
Jean Chmielewski

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Química**, no Programa de Pós-
Graduação em Química, área de
concentração em Química.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P681p Pitasse Santos, Paulo, 1989-
PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS E CONJUGADOS PEPTÍDEO-FÁRMACOS,
COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIPARASITÁRIA /
Paulo Pitasse Santos. - Paraíba do Sul, 2022.
188 f.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Coorientadora: Débora Decotè Ricardo de Lima.
Coorientadora: Jean Chmielewski.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química,
2022.

1. peptídeos de penetração celular. 2. liberação de
fármacos. 3. síntese de peptídeos em fase sólida. 4.
Trypanosoma cruzi. I. Freire de Lima, Marco Edilson,
1965-, orient. II. Decotè Ricardo de Lima, Débora,
1965-, coorient. III. Chmielewski, Jean, 1962-,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

PAULO PITASSE SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

TESE APROVADA EM 10/01/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Marco Edilson Freire de Lima. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Nelilma Correia Romeiro Dr^a. UFRJ

Juliany Cola Fernandes Rodrigues Dr^a. UFRJ

Adriano Defini Andricopulo. Dr. USP-SP

Renata Barbosa Lacerda. Dr^a. PPGQ-UFRRJ



Emitido em 2022

TERMO N° 25/2022 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/01/2022 17:32)

MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matricula: 1058758

(Assinado digitalmente em 11/01/2022 23:09)

RENATA BARBOSA LACERDA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

Dept°CF (12.28.01.00.00.00.47)

Matricula: 1979542

(Assinado digitalmente em 11/01/2022 17:18)

ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 615.855.560-68

(Assinado digitalmente em 11/01/2022 18:22)

NELILMA CORREIA ROMEIRO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 935.373.877-68

(Assinado digitalmente em 11/01/2022 18:50)

JULIANY COLA FERNANDES RODRIGUES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 077.151.437-90

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
25, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **11/01/2022** e o código de verificação: **730ee8fe52**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Gabi, meu amor e minha melhor amiga. Caminhar do seu lado faz o trajeto mais leve. Sou muito grato de dividir a vida com você. Te amo! E obrigado por ser também uma colega de profissão excepcional e por emprestar seus olhos atentos à leitura desta Tese.

Aos meus pais, Célia e Sergio, que foram e continuam sendo um referencial muito forte pra mim. Com vocês eu aprendi a ter a força e determinação para seguir meus sonhos. Sou muito grato em ser seu filho.

Aos meus orientadores Marco Edilson e Débora, com quem divido uma longa trajetória e muito aprendi (e continuo aprendendo) por todos esses anos. Seu apoio, mentoria e amizade foram fundamentais para me tornar o profissional que sou hoje.

À Profa. Jean Chmielewski da Purdue University, que me recebeu e incorporou ao seu grupo de pesquisa por 1 ano intenso de trabalho. Foi um período de muito aprendizado não só pelo lado técnico, mas também pelo exemplo de profissional competente e atenciosa que você é. Agradeço também aos colegas e amigos que conheci e tive o prazer de compartilhar momentos e experiências: Tad, Monessa, Jenny, Vallabh, Reena, Vinay, Corey, Ryan, Michael, Pat e Mike. Especialmente ao Moises, que me recebeu em sua casa na minha primeira semana na gelada West Lafayette, e à Sam, pelos experimentos que contribuíram para a qualidade deste trabalho. Obrigado a todos!

Aos amigos dos laboratórios LaQuiMed (IQ) e LIVV (IV) da UFRRJ. Por todas as risadas, conversas e pela oportunidade de crescer com vocês: Camila, Carol, Renata, Douglas, Afonso, Léo, Raissa, Lucas, Rafael, Bia, Larissa, Thiago. Também à Profa. Rosane pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para participarem da avaliação desta tese e contribuírem com a qualidade final de nosso trabalho.

À CAPES e à FAPERJ pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e no exterior.

À CAPES, ao CNPq e à FAPERJ pelos auxílios financeiros que viabilizaram a execução deste e de outros projetos em andamento em nosso laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

PITASSE-SANTOS, Paulo. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de peptídeos e conjugados peptídeo-fármacos, com atividade antibacteriana e antiparasitária.** 2022. 170p Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Peptídeos são compostos por aminoácidos ligados em sequência e compõem uma classe de moléculas de interesse dentro da química medicinal. Tanto por sua alta seletividade por alvos específicos quanto pela complexidade de suas estruturas, que permitem que sejam aplicados com diferentes funções, tal qual compostos de ação antimicrobiana ou como agentes de penetração celular conjugados a fármacos. Peptídeos e conjugados possuem alto potencial de aplicação em áreas carentes de inovação terapêutica, como no desenvolvimento de antibióticos para o tratamento de bactérias multirresistentes ou de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas. Neste trabalho são propostas três séries de peptídeos anfífilos catiônicos com potencial aplicação como antimicrobianos e como peptídeos de penetração celular. Também se avalia a estratégia de conjugação peptídeo-fármaco com ou sem controle de liberação do fármaco no ambiente intracelular, utilizando peptídeos de interesse dentro da série proposta e o peptídeo helicoidal poliprolina tipo II **P14LRR**, de reconhecida atividade antimicrobiana e de penetração celular. A preparação de peptídeos e conjugados envolveu o emprego de técnicas de síntese orgânica clássica, com otimização de protocolos presentes na literatura, bem como a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida. Os fármacos linezolida (**Lnz**) e benznidazol (**Bzd**) foram utilizados para a estratégia de conjugação. Os conjugados peptídeo-fármaco conectados via espaçador contendo ligação dissulfeto, redutível no meio intracelular, foram avaliados quanto sua à cinética de liberação de fármaco induzido quimicamente. Adicionalmente os peptídeos e conjugados foram avaliados sobre *Escherichia coli* quanto à sua atividade antimicrobiana e possíveis mecanismos de ação. O desenho das séries permitiu traçar uma relação estrutura atividade, de modo que o peptídeo **Ac-YGRLLRRL-NH₂** se mostrou o mais promissor para esta aplicação (MIC = 2 µM). Foi avaliada também a atividade contra formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, de modo que o peptídeo **Ac-YGRLLRRLRRLRRL-NH₂** apresentou alta efetividade na inibição da infecção do parasito in vitro (EC₅₀ = 299 ± 86 nM). Foram realizados ainda experimentos para a avaliação do potencial de penetração celular do peptídeo **FI-YGRLLRRL-NH₂** e do conjugado **Lnz-FI-P14LRR**, ambos marcados com sonda de fluoresceína. Através de técnicas de citometria e de microscopia confocal foi possível constatar o acúmulo dos compostos no meio intracelular e, no caso de **Lnz-FI-P14LRR**, indicativos de sua colocalização em nível subcelular com lisossomos.

Palavras-chave: peptídeos de penetração celular, liberação de fármacos, síntese de peptídeos em fase sólida, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

PITASSE-SANTOS, Paulo. **Planning, synthesis and biological assessment of the of peptides and peptide-drug conjugates, bearing antibacterial and antiparasitic activity.** 2022. 170p Thesis (Doctorate in Chemistry, Organic Chemistry). Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Peptides are composed of amino acids linked in sequence and comprise a class of molecules of interest within medicinal chemistry. Both for their high selectivity for specific targets and for the complexity of their structures, which allow them to be applied for different purposes, such as antimicrobials or cell penetrating agents conjugated to drugs. Peptides and conjugates are potentially applicable on areas lacking therapeutic innovation, such as the development of new antibiotics for the treatment of multidrug-resistant bacteria or new chemotherapeutic agents for the treatment of Chagas disease. In this work they are proposed three series of cationic amphiphilic peptides with potential application as antimicrobials and cell penetrating peptides. The peptide-drug conjugation strategy with or without control of drug release in the intracellular environment is also evaluated, using peptides of interest within the proposed series and the type II polyproline helix **P14LRR**, which has been reported as an antimicrobial and cell penetrating peptide. The synthesis of peptides and conjugates involved the use of classical organic synthesis techniques, with optimization of protocols found in the literature, as well as the solid phase peptide synthesis methodology. The drugs linezolid (**Lnz**) and benznidazole (**Bzd**) were used for the conjugation strategy. Peptide-drug conjugates connected via a spacer containing a disulfide bond, reducible in the intracellular medium, were evaluated for their chemically induced drug release kinetics. Additionally, the peptides and conjugates were evaluated against *Escherichia coli* for their antimicrobial activity and insights on mechanisms of action. The design of the series made it possible to trace a structure-activity relationship and the peptide **Ac-YGRLLRLL-NH₂** was identified to be the most promising for this application (MIC = 2 μ M). The activity against amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* was also evaluated. The peptide **Ac-YGRLLRLLRLLRLLRLL-NH₂** showed high effectiveness on inhibiting parasite infection *in vitro* (EC₅₀ = 299 \pm 86 nM). Experiments were also carried out to evaluate the cell penetration potential of the **Fl-YGRLLRLL-NH₂** peptide and the **Lnz-Fl-P14LRR** conjugate, both labeled with a fluorescein probe. They were used flow cytometry and confocal microscopy techniques to verify the accumulation of compounds in the intracellular environment and, in the case of **Lnz-Fl-P14LRR**, also an indicative of its colocalization at the subcellular level with lysosomes.

Keywords: cell penetrating peptides, drug delivery, solid phase peptide synthesis, *Trypanosoma cruzi*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aminoácidos, ligações peptídicas, peptídeos e proteínas	1
Figura 2. Estruturas dos aminoácidos proteínogênicos.....	2
Figura 3. A – Estrutura zwitteriônica dos aminoácidos. B – Aminoácidos carregados em pH fisiológico.....	3
Figura 4. Estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias em peptídeos e proteínas.....	3
Figura 5. A. Imagem representativa da luz circularmente polarizada para a direita. B. Gráficos de CD característicos para estruturas peptídicas com estruturas secundárias em alfa-hélice (azul), folha-beta (vermelho) e aleatório (verde) (adaptado de WEI et al., 2014; YANG et al., 2019).....	4
Figura 6. Panorama histórico e mercado de peptídeos terapêuticos (adaptado de MUTTENTHALER et al., 2021).....	5
Figura 7. Tecnologias farmacêuticas modernas para a utilização de peptídeos terapêuticos.....	6
Figura 8. Tipos de peptídeos anfifílicos catiônicos por tipo de estrutura (adaptado de MOOKHERJEE et al., 2020).....	7
Figura 9. Vistas lateral (A) e frontal (B) da hélice do PAC magainina II, destacando-se os resíduos de caráter catiônico (azul) e hidrofóbico (verde). C , esquema para a interação preferencial entre PACs e células de patógenos em vez de células eucarióticas (adaptado de LEI et al., 2019).....	8
Figura 10. Modelos propostos como mecanismos de ação de PACs sobre a membrana de patógenos: A – carpete; B – barril; C – poros toroidais; D – imersão; E – eletroporação (adaptado de CHAN et al., 2006).....	9
Figura 11. Número de publicações por ano encontradas na base de dados <i>Web of Science</i> com os termos de busca “ <i>peptide drug conjugate</i> ”	10
Figura 12. Estruturas de CPFs em estágio avançado de estudos clínicos (AEZS-108, brimapitide) ou com aprovação para utilização terapêutica (¹⁷⁷ Lu-DOTATATE).....	11
Figura 13. Modos de ação propostos para penetração celular por peptídeos (adaptado de XIE et al., 2020).....	13
Figura 14. Exemplo de conectores autoimolativos e mecanismos de liberação para espaçadores contendo ligação dissulfeto (A) e grupo para-aminobenzil (B).....	15
Figura 15. A – Representação dos ângulos diedro (ϕ , ψ e ω) ao redor das ligações do esqueleto poliprolina. B – Hélice poliprolina tipo I (PPI): vista lateral (cima) e vista frontal (baixo). C – Hélice poliprolina tipo II (PPII): vista lateral (cima) e vista frontal (baixo). D – sinais característicos das hélices PPI (vermelho) e PPII (azul) por espectroscopia de dicroísmo circular (adaptado de MORADI et al., 2010; RUGGIERO et al., 2016; TSAI et al. 2021).....	16
Figura 16. A – Representação dos aminoácidos P _L e P _R a partir de modificações da hidroxiprolina. B – Espectro de dicroísmo circular mostrando a formação de hélices PPI. C – Vista frontal da hélice P11LRR ilustrando as regiões de caráter hidrofóbico (rosa) e hidrofílico (azul) obtidas. D – Estruturas dos peptídeos P8LRR e P11LRR marcados com sondas fluorescentes no <i>N</i> -terminal (adaptado de FILLON et al., 2005)...	17
Figura 17. Composição mostrando as atividades de peptídeos P_nLRR quanto à sua capacidade: A – de penetração celular (adaptado de FILLON et al., 2005); B – antimicrobiana <i>in vitro</i> (adaptado de KURIAKOSE et al., 2013) e C – antimicrobiana <i>in vivo</i> (adaptado de THANGAMANI et al, 2015).....	18
Figura 18. A – Estrutura do conjugado entre P14LRR e o fármaco Canamicina com ou sem a possibilidade de liberação do fármaco a partir de redução da ligação dissulfeto	

em ambiente intracelular. Resultados da avaliação <i>in vitro</i> de células infectadas com bactérias de P14LRR , Canamicina e dos conjugados: B – a 10 µM contra <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Brucella abortus</i> e <i>Shigella flexneri</i> ; C – a 10 µM e 5 µM contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (adaptado de BREZDEN et al., 2016).....	19
Figura 19. Desenvolvimento de antibióticos ao longo da história (adaptado de STEPHENS et al., 2020).....	20
Figura 20. Estimativas do total de óbitos por causa de morte em 2016 e projeções do número de óbitos associados a BMR para o ano de 2050 (adaptado de O'NEILL, 2016)..	21
Figura 21. Fármacos adicionados e removidos pelo CLSI da lista de recomendação para o tratamento de bactérias ESKAPE (adaptado de MULANI et al., 2019).....	22
Figura 22. Estrutura da daptomicina, lipopeptídeo aprovado para o tratamento por infecções por bactérias gram-positivas, incluindo-se BMR.....	23
Figura 23. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares. Adaptado de <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html).....	26
Figura 24. Estrutura do benznidazol, fármaco de utilidade clínica reconhecida na fase aguda da doença de Chagas.....	27
Figura 25. Propostas de mecanismos de ação de PACs sobre tripanossomatídeos (adaptado de MCGWIRE e KULKARNI, 2010).....	29
Figura 26. Mecanismo de sialização realizado pelo <i>T. cruzi</i> para evadir o sistema imune do hospedeiro, resultando em uma carga residual superficial negativa (adaptado de FREIRE-DE-LIMA et al., 2012).....	30
Figura 27. Esquema geral para a SPFS, idealizada por Robert B. Merrifield (1963).....	31
Figura 28. Proposta mecanística para a desproteção Fmoc do <i>N</i> -terminal da cadeia peptídica covalentemente ligada à resina polimérica.....	32
Figura 29. Exemplos de reagente de acoplamento aplicáveis à SPFS.....	33
Figura 30. Proposta mecanística para reação de acoplamento mediada pelo reagente ativador de carboxila HBTU em presença de DIPEA.....	33
Figura 31. Resinas poliméricas com cadeia cruzada e efeito de <i>swelling</i> em SPFS.....	34
Figura 32. Grupos protetores mais comumente utilizados na proteção de cadeias laterais de aminoácidos para a SPFS pela metodologia Fmoc.....	36
Figura 33. Estrutura geral dos PACs das séries P₁ , P₂ e P₃ , evidenciando o padrão de repetição de resíduos de aminoácidos em nível de estrutura primária.....	39
Figura 34. Visualização em modelos 3D (preparados pelo autor no programa Spartan 14) para estruturas representativas das cadeias peptídicas das séries P₁ (alfa-hélice), P₂ (folha-beta) e P₃ (alfa-hélice), evidenciando a ordenação das cadeias laterais dos aminoácidos em vista A) frontal e B) em perspectiva.....	40
Figura 35. Estratégia de conjugação peptídeo-fármaco, utilizando espaçador contendo ligação dissulfeto redutível no ambiente intracelular e com potencial de liberação do fármaco na sua forma original, a partir de ataque intramolecular.....	41
Figura 36. Estratégia de conjugação peptídeo-fármaco, envolvendo o benznidazol modificado com grupo carboxila, e com controle da estereoquímica do carbono benzílico.....	42
Figura 37. A. Estratégia de conjugação com hélices poliprolina P14LRR , via <i>N</i> -terminal. Visão frontal (B) e em perspectiva (C) de modelos tridimensionais da estrutura de P14LRR, evidenciando as cadeias laterais catiônicas (azul) e hidrofóbicas (rosa).....	42

Figura 38. Estrutura dos aminoácidos Fmoc-P _L -OH e Fmoc-P _R (Boc) ₂ -OH, obtidos sinteticamente a partir da Cbz-Hyp-OH. Em detalhe, as quantidades de etapas reacionais e rendimentos encontrados por FILLON et al. (2005).....	68
Figura 39. Síntese do aminoácido Fmoc-P _L -OH a partir de 2,0 g de Cbz-Hyp-OH. a. i) NaH (3,5 eqv), PM 3 Å, THF, -40°C; ii) 3-bromo-2-metil-propeno (4,0 eqv), -40°C, depois T.A., 18 h (88%). b. i) H ₂ , Pd/C, MeOH, T.A., 6 h ii) FmocOSu (1,1 eqv), NaHCO ₃ (3,0 eqv), acetona/água 1 : 1, T.A., 18 h (74%). Rendimento global: 2,0 g (65%).....	69
Figura 40. Síntese do aminoácido Fmoc-P _R (Boc) ₂ -OH descrita por FILLON et al. (2005) (I) e por DIETSCHKE et al. (2020) (II). I a. i) NaH ii) acrilonitrila (70%); b. BnBr, K ₂ CO ₃ (85%); c. CoCl ₂ , Boc ₂ O, NaBH ₄ (70%); d. i) H ₂ , Pd/C; ii) FmocOSu (60%); e. i) TFA; ii) TEA, <i>N,N'</i> -bis(tert-butoxicarbonil)- <i>N''</i> -trifililguanidina (75%). Rendimento global: 19%. II f. i) NaH; ii) acrilonitrila (80%); g. i) H ₂ , Pd/C ii) FmocOSu (quant.); h. i) H ₂ , PtO ₂ , AcOH, MeOH; ii) <i>N,N'</i> -bis-Boc-1-guanilpirazole, TEA (62%). Rendimento global: 50%.....	70
Figura 41. Síntese do aminoácido Fmoc-P _R (Boc) ₂ -OH proposta neste trabalho (a partir de 2,0 g de Cbz-Hyp-OH): a. i) NaH (3,5 eqv), PM 3 Å, THF, -40°C; ii) brometo de 3-(Boc-amino)-propila (4,0 eqv), -40°C, 5 h, depois T.A., 18 h (92%); b. i) H ₂ , Pd/C, MeOH, T.A., 6 h ii) FmocOSu (1,1 eqv), NaHCO ₃ (3,0 eqv), acetona/água 1 : 1, T.A., 18 h (72%); c. i) TFA/DCM 1:1, T.A. 2 h; ii) <i>N,N'</i> -bis-Boc-1-guanilpirazol, TEA, DCM, -0°C, depois T.A. 18 h (90%). Rendimento global: 2,9 g (60%).....	71
Figura 42. Conversão da linezolida na tioamida correspondente, utilizando reagente de Lawesson.....	72
Figura 43. Proposta mecanística para tionilação, utilizando reagente de Lawesson (JESBERGER et al., 2003).....	72
Figura 44. Espectros de I RMN ¹ H (400 MHz) e II ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ de TLnz (8) , confirmando a tionilação seletiva na porção amida da linezolida.....	73
Figura 45. Proposta mecanística para a formação de imidas, a partir de tioamidas, por dessulfuração/acilação, em presença de carbonato de prata.....	74
Figura 46. Esquema reacional para a síntese de Lnz-DTBA por dessulfuração/acilação mediada por carbonato de prata. Foram obtidos também os subprodutos linezolida e (Lnz) ₂ DTBA.....	75
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para Lnz-DTBA (10)	76
Figura 48. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) para Lnz-DTBA (10)	76
Figura 49. Esquema para a SPFS aplicada a este trabalho.....	77
Figura 50. Esquema para a síntese do conjugado peptídeo-fármaco Lnz-P1-2 , via SPFS.....	78
Figura 51. Estrutura dos conjugados entre peptídeos e o fármaco linezolida sintetizados neste trabalho.....	79
Figura 52. Resumo das tentativas de síntese de Bzd-DTBA (38) e Bzd-PSBA (39) . As setas tracejadas representam reações que falharam. Comentários sobre as observações feitas, quanto aos resultados das tentativas mal sucedidas, aparecem em caixas próximas a cada situação.....	80
Figura 53. Esquema para a síntese de conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, via metodologia SPFS.....	81
Figura 54. Estrutura do conjugado Bzd-P1-2 e o cromatograma de CLAE-FR analítico, representativo dos materiais brutos, após a síntese sob condições padrão de SPFS, utilizando tanto a <i>L</i> -Phg quanto a <i>D</i> -Phg.....	82
Figura 55. Esquema para a síntese de conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, via metodologia SPFS, com controle da estereoquímica do produto.....	82

Figura 56. Estruturas dos conjugados Bzd(S)-P₁₋₂ e Bzd(R)-P₁₋₂ e o cromatograma de CLAE-FR analítico, representativo dos materiais brutos após a síntese de Bzd(S)-P₁₋₂ , com detalhe do cromatograma obtido para Bzd(R)-P₁₋₂ , sob as mesmas condições.....	83
Figura 57. Estruturas dos conjugados peptídeo-fármaco com o benznidazol, sintetizados neste trabalho.....	83
Figura 58. Exemplo de cromatogramas de CLAE-FR para o peptídeo P ₁₋₂ obtidos durante a purificação em escala semipreparativa (A) e para o produto puro em escala analítica (B).....	84
Figura 59. Espectro de CD de P ₁₋₂ em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 2×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.....	87
Figura 60. Espectro de CD de P ₁₋₃ em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 5×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.....	87
Figura 61. Espectro de CD de P ₁₋₄ em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 5×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.....	88
Figura 62. Espectro de CD de P ₂₋₃ em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho).....	88
Figura 63. Esquema para a liberação de linezolida a partir de conjugados peptídeo-fármaco, em meio aquoso, a partir da redução química da ligação dissulfeto do espaçador por ação de DTT.....	89
Figura 64. Gráficos de liberação de linezolida ao longo do tempo, após a adição de DTT em conjugados conectados por espaçador contendo ligação dissulfeto.....	90
Figura 65. A. Cromatogramas de íons totais (CLUE-EM-ESI+), obtidos para a reação de liberação de linezolida a partir de Lnz-DTBA (10) , em presença de DTT. B. Proposta de atribuição dos sinais observados no cromatograma de íons totais para as espécies químicas envolvidas durante a reação.....	91
Figura 66. Reação enzimática de hidrólise do galactosídeo CPRG por β -Gal e liberação do corante vermelho de clorofenol, quantificável por absorbância no UV (570 nm).....	93
Figura 67. Gráficos de monitoramento (UV 570 nm) da atividade enzimática da β -Gal no sobrenadante da cultura de <i>E. coli</i> , na presença de diferentes PACs.....	94
Figura 68. Reação de redução do sal de MTT por redutases mitocondriais para formação da formazana de MTT, detectável por medida de absorbância. (UV 570 nm)...	95
Figura 69. Atividade hemolítica de PACs das séries P ₁ , P ₂ e P ₃	96
Figura 70. Gráficos das medidas médias de fluorescência, obtidos por citometria de fluxo de células J774A.1 tratadas com FI-P₁₋₂ em comparação com FI-P14LRR . ^a = adição de 1 mg/mL de azul de tripan imediatamente antes à análise.....	98
Figura 71. Gráficos das medidas médias de fluorescência, obtidos por citometria de fluxo de células J774A.1 tratadas com FI-P₁₋₃ e FI-P₁₋₄ , em comparação com FI-P14LRR . ^a = adição de 1 mg/mL de azul de tripan, imediatamente antes à análise.....	99
Figura 72. Imagens de microscopia confocal de células J774-A1 tratadas com FI-P₁₋₂ (verde), corante Hoechst 33342 (núcleo celular, azul) e A) LysoTracker™ (vermelho, lisossomos) ou B) MitoTracker™ (vermelho, mitocôndrias). Em ambos os casos as imagens são mostradas para os canais azul, vermelho e verde, individualmente, e para os 3 canais em sobreposição.....	100
Figura 73. Liberação de β -Gal e perfil hemolítico pelo tratamento com Lnz-P₁₋₂	101
Figura 74. Comparação da extensão da cadeia do conjugado Lnz-P₁₋₂ com outros peptídeos da Série P₁	102

Figura 75. Viabilidade celular de células J774A.1 após tratamento com P1-2 e respectivos os conjugados peptídeo-fármaco com benznidazol.....	103
Figura 76. Experimento de liberação de β -Gal promovida por Lnz-P14LRR e FI-P14LRR , conduzido pela Dra. Samantha Zeiders na Purdue University, West Lafayette, IN, EUA.....	104
Figura 77. Resultados de toxidez sobre células de mamíferos: J774A.1, após 24 h, por metodologia MTT, e hemácias humanas, por liberação de hemoglobina, conduzido pela Dra. Samantha Zeiders.....	105
Figura 78. Experimento para verificar a internalização do conjugado Lnz-FI-P14LRR em células J774A.1 por citometria de fluxo, conduzido pela Dra. Samantha Zeiders.....	106
Figura 79. Imagens de microscopia confocal, obtidas a partir de células tratadas com Lnz-FI-P14LRR (verde), Hoescht 33342 (azul), e A) MitoTracker™ (vermelho), ou B) LysoTracker™ (vermelho). Cada situação está dividida para mostrar os canais verde, azul e vermelho separadamente, e com os 3 canais em sobreposição.....	107
Figura 80. Viabilidade de amastigotas de <i>T. cruzi</i> (Tulahuen C2C4 LacZ) e de células LLC-MK2, após 96 h de tratamento com os compostos indicados.....	108
Figura 81. Viabilidade de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Tulahuen C2C4 LacZ), após 24 h de tratamento quantificada pelo método MTT.....	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos de reconhecida atividade de penetração celular (XIE et al., 2020).	12
Tabela 2. Exemplos de conectores aplicáveis à conjugação com PPCs de diferentes mecanismos de degradação no ambiente intracelular (adaptado de BÖHME e BECK-SICKINGER, 2015).....	14
Tabela 3. Sequências de aminoácidos de PACs com atividade sobre diferentes espécies e estágio de desenvolvimento de tripanossomatídeos.....	28
Tabela 4. Exemplos de conectores utilizados em resinas adequadas à metodologia Fmoc de SPFS (adaptado de DA'SAN, 2018).....	35
Tabela 5. Peptídeos produzidos por SPFS ou por técnicas convencionais (C) em solução (adaptado de BRAY, 2003).....	37
Tabela 6. Proposta de atribuição de sinais de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz), observados para a linezolida (7), em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.....	71
Tabela 7. Valores de CIM para os peptídeos das séries P₁ , P₂ e P₃ contra <i>E. coli</i>	93
Tabela 8. Resultados de citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1 tratados com PACs.....	95
Tabela 9. Citotoxicidade de peptídeos da série P₁ contendo sonda fluorescente sobre J774A.1.....	97
Tabela 10. Valores de CIM contra <i>E. coli</i> e CE ₅₀ contra J774A.1 para Lnz-P₁-2 e situações correlatas.....	101
Tabela 11. Valores de CIM (<i>E. coli</i>) e CE ₅₀ (J774A.1) para conjugados peptídeo-benznidazol.....	102
Tabela 12. Valores de CIM (<i>E. coli</i>) para conjugados peptídeo-linezolida.....	104
Tabela 13. Valores de CE ₅₀ para toxidez sobre tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	109
Tabela 14. Valores de CE ₅₀ para inibição da infectividade de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e de citotoxicidade em células LLC-MK2.....	110

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AcOH	ácido acético
CCA	cromatografia em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CD	dicroísmo circular
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CE ₅₀	concentração efetiva em 50%
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CLUE-EM	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas
COMU	hexafluorofosfato de (1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminox)dimetilamino-morfolino-carbênio
CPF	conjugado peptídeo-fármaco
CPRG	vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo
DC	doença de Chagas
DCM	diclorometano
DMEM	dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DTBA	ácido 4,4'-ditiodibutírico/4,4'-ditiodibutiril
DTT	ditiotreitól
E2	eliminação de segunda ordem
eqv.	equivalentes
ESI+	ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo
EtOAc	acetato de etila
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HATU	hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridínio 3-óxido
Hz	Hertz
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
<i>J</i>	constante de acoplamento (Hz)
m/z	razão massa-carga
MALDI-ToF	ionização por dessorção a laser assistida por matriz sólida analisada por tempo de voo
MeOH	metanol
MHB	meio Mueller Hinton
Mlt	melitina
MTT	brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio
OD ₅₉₅	densidade óptica a 595 nm
PAC	peptídeo anfifílico catiônico
PBS	solução tampão de fosfato
PPC	peptídeos de penetração celular
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SFB	soro fetal bovino
S _N 2	substituição nucleofílica de segunda ordem
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida

TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
TIPS	triisopropilsilano
TSA	ágar tríptico de soja
TSB	meio tríptico de soja
UV	ultravioleta
δ	deslocamento químico (ppm)
λ	comprimento de onda (nm)
μM	micromolar ($\mu\text{mol/L}$)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Peptídeos e a Química Medicinal.....	1
1.2 Peptídeos Catiônicos Anfífilos com Atividade Antimicrobiana.....	6
1.3 Conjugados Peptídeo-Fármaco e Peptídeos de Penetração Celular.....	10
1.4 Hélices Poliprolina Tipo II Anfífilas: uma Breve Linha do Tempo.....	15
1.5 Cepas Bacterianas Multirresistentes: Peptídeos e a Necessidade de Inovação Terapêutica.....	20
1.6 Peptídeos e Doenças Tropicais Negligenciadas: o caso da Doença de Chagas.....	24
1.7 Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.....	30
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivos Gerais.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
2.2.1 Planejamento de peptídeos anfífilos catiônicos com potencial atividade antimicrobiana e de penetração celular.....	38
2.2.2 Planejamento de conjugados peptídeo-fármaco.....	40
2.2.3 Síntese de peptídeos, conjugados e intermediários.....	43
2.2.4 Caracterização e análise química de peptídeos, conjugados e intermediários..	43
2.2.5 Avaliação biológica de toxidez e capacidade de penetração em células de mamíferos.....	43
2.2.6 Avaliação da atividade antibacteriana.....	43
2.2.7 Avaliação da atividade contra o <i>T. cruzi</i>	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Métodos, Reagentes, Instrumentos e Análises: Parte Química.....	45
3.2 Protocolos de Síntese do Aminoácido Protegido Fmoc-PL-OH.....	46
3.2.1 O-alquenação de Cbz-Hyp-OH.....	46
3.2.2 Hidrogenação e proteção Fmoc.....	47
3.3 Protocolos de Síntese do Aminoácido Protegido Fmoc-PR(Boc) ₂ -OH.....	48
3.3.1 O-(Boc-amino)alquenação de Cbz-Hyp-OH.....	48
3.3.2 Troca do grupo protetor Cbz por Fmoc na porção amino.....	49
3.3.3 Guanilação da porção propilamino.....	51
3.4 Protocolos de Síntese de Conjugado Linezolida-Espaçador Via Conector Imida.....	52
3.4.1 Síntese do intermediário tionilado TLnz.....	52
3.4.2 Dessulfuração/N-acilação da tioamida.....	52
3.5 Síntese do Ácido 2-Nitroimidazolil-Acético.....	53
3.6 Protocolo de Síntese de Peptídeos e Híbridos em Fase Sólida (SPFS).....	54
3.7 Acoplamento de Aminoácidos Fmoc-Phg-OH em SPF.....	55
3.8 Adição do Grupo (2-Nitroimidazolil)-Acetil ao N-terminal em SPFS.....	55
3.9 Acetilação do N-terminal em SPFS.....	55
3.10 Acoplamento de Lnz-DTBA ao N-terminal em SPFS.....	56
3.11 Desproteção Seletiva de Resíduo de Lys(Mtt) em SPFS.....	56
3.12 Adição de Sonda de Fluoresceína em SPFS.....	56
3.13 Desligamento da Resina e Desproteção das Cadeias Laterais Após SPFS.....	56
3.14 Purificação e Análise de Pureza por CLAE-FR.....	57
3.15 Aferição da Concentração das Soluções Estoque por UV-Vis.....	60
3.16 Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	61

3.17 Testes de Liberação do Fármaco Linezolida em Ambiente Redutor.....	61
3.18 Métodos, Reagentes, Instrumentos e Análises: Ensaios Biológicos.....	62
3.19 Cultivo de Células de Linhagem de Mamífero.....	62
3.20 Determinação do Perfil Citotóxico em Células de Linhagens de Mamíferos.....	62
3.21 Determinação do Perfil Hemolítico em Hemácias Humanas.....	63
3.22 Determinação da Concentração Inibitória Mínima Contra <i>E. coli</i>	63
3.23 Ensaio de Liberação de β -Galactosidase em <i>E. coli</i>	63
3.24 Cultivo <i>In Vitro</i> de Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
3.25 Determinação do Perfil Inibitório do Crescimento em Amastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
3.26 Determinação do Perfil de Toxidez em Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	65
3.27 Determinação do Perfil Inibitório da Infectividade em Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	65
3.28 Determinação do Perfil Citotóxico em Células LLC-MK2.....	66
3.29 Ensaios de Quantificação de Fluorescência por Citometria de Fluxo.....	66
3.30 Experimentos de Imagem em Células Vivas por Microscopia Confocal.....	66
3.31 Análise Estatística	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1 Síntese de Aminoácidos Fmoc-PL-OH e Fmoc-PR(Boc) ₂ -OH.....	68
4.2 Síntese do Conjugado Linezolida-Espaçador.....	71
4.3 Construção de Cadeias Peptídicas por SPFS.....	76
4.4 Síntese de Conjugados Peptídeo-Fármaco Utilizando SPFS.....	78
4.5 Síntese de Híbridos Peptídeo-Benzimidazol com Controle da Estereoquímica.....	79
4.6 Purificação, Caracterização e Preparo de Soluções-Estoque de Peptídeos e Conjugados Peptídeo-Fármaco.....	84
4.7 Caracterização da Estrutura Secundária de Peptídeos por Dicroísmo Circular.....	85
4.8 Cinética de Liberação de Linezolida de Conjugados Peptídeo-Fármaco.....	89
4.9 Atividade Antibacteriana de Peptídeos das Séries P₁ , P₂ e P₃	92
4.10 Atividade de Peptídeos das Séries P₁ , P₂ e P₃ Sobre Células de Mamíferos.....	95
4.11 Penetração Celular de Peptídeos da Série P₁	97
4.12 Atividade Antibacteriana e Citotóxica de Conjugados Entre Fármacos e a Sequência de P₁₋₂	100
4.13 Atividade Antibacteriana <i>In Vitro</i> e Penetração em Células da Linhagem J774.A1 Conjugado Lnz-P14LRR	103
4.14 Atividade anti- <i>T. cruzi</i> de Peptídeos e Conjugados.....	107
5. CONCLUSÕES.....	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
7. ANEXOS.....	126
7.1 Espectros de Caracterização de Produtos e Intermediários.....	126
7.1.1 Intermediário 2	126
7.1.2 Fmoc-PL-OH (3)	128
7.1.3 Intermediário 4	130
7.1.4 Intermediário 5	132
7.1.5 Fmoc-PR(Boc) ₂ -OH (6)	133
7.1.6 Linezolida.....	135
7.1.7 Intermediário TLNz (8)	137
7.1.8 Lnz-DTBA (10)	139
7.1.9 Ácido 2-nitroimidazolil-acético (13).....	142

7.1.10 P_1-1 (14).....	144
7.1.11 P_1-2 (15).....	145
7.1.12 P_1-3 (16).....	146
7.1.13 P_1-4 (17).....	147
7.1.14 P_2-1 (18).....	148
7.1.15 P_2-2 (19).....	149
7.1.16 P_2-3 (20).....	150
7.1.17 P_2-4 (21).....	151
7.1.18 P_3-1 (22).....	152
7.1.19 P_3-2 (23).....	153
7.1.20 P_3-3 (24).....	154
7.1.21 P_3-4 (25).....	155
7.1.22 $FI-P_1-2$ (26).....	156
7.1.23 $FI-P_1-3$ (27).....	157
7.1.24 $FI-P_1-4$ (28).....	158
7.1.25 $Lnz-P_1-2$ (29).....	159
7.1.26 $Bzd(S)-P_1-2$ (30).....	160
7.1.27 $Bzd(R)-P_1-2$ (31).....	161
7.1.28 $FI-P14LRR$ (32).....	162
7.1.29 $Lnz-P14LRR$ (33).....	163
7.1.30 $Lnz-FI-P14LRR$ (34).....	164
7.1.31 $Bzd(S)-P14LRR$ (35).....	165
7.1.32 $Bzd(R)-P14LRR$ (36).....	166
7.2 Espectros de Dicroísmo Circular.....	167

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos e a Química Medicinal

Peptídeos e proteínas compõem uma importante classe de biomoléculas vitais para o funcionamento das de todas as formas de vida conhecidas, desde protistas, passando por vegetais até vertebrados. Suas estruturas são variadas e complexas, compostas por resíduos de aminoácidos ligados em cadeia. Os alfa-aminoácidos, componentes de peptídeos e proteínas, são unidades monoméricas que contêm um grupo amino ligado ao carbono alfa a um grupo ácido carboxílico. As chamadas ligações peptídicas se tratam de ligações amida entre o grupo ácido carboxílico com o grupo alfa-amino de um aminoácido subsequente na cadeia, que ocorrem mediante perda de uma unidade de água. Convencionalmente, sequências peptídicas são representadas do resíduo *N*-terminal para o resíduo *C*-terminal da cadeia. Ambos, peptídeos e proteínas, compartilham estas características estruturais, o que os difere são os comprimentos. Não há um consenso quanto à classificação, mas peptídeos são estruturas menores, compostas de no máximo 50–100 resíduos de aminoácidos, enquanto proteínas são estruturas maiores, compostas de centenas ou até milhares de resíduos de aminoácidos (**Figura 1**) (NELSON e COX, 2018; SOLOMONS et al, 2018).

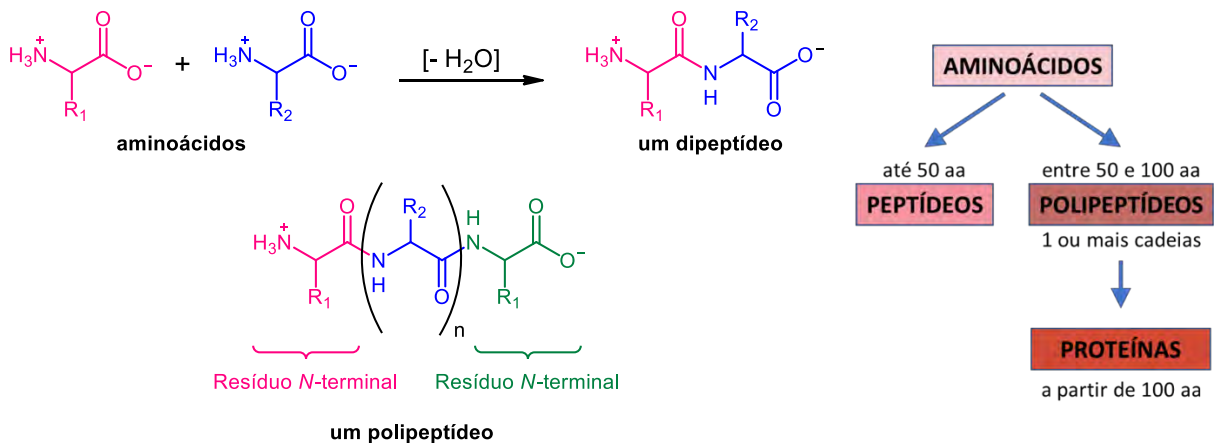


Figura 1. Aminoácidos, ligações peptídicas, peptídeos e proteínas.

Apesar de haver mais de 700 aminoácidos naturais conhecidos, apenas 20 são utilizados pelas células para a síntese de proteínas (**Figura 2**). Todos possuem um grupo amino ligado ao carbono alfa-carbonílico e, à exceção da glicina que não possui carbono assimétrico, são aminoácidos da série L. Os aminoácidos proteinogênicos podem ser classificados quanto à

natureza da sua cadeia lateral, ligada ao carbono alfa-carbônico, como apolar, polar, aromático, ácido ou básico. (NELSON e COX, 2018; SOLOMONS et al, 2018).

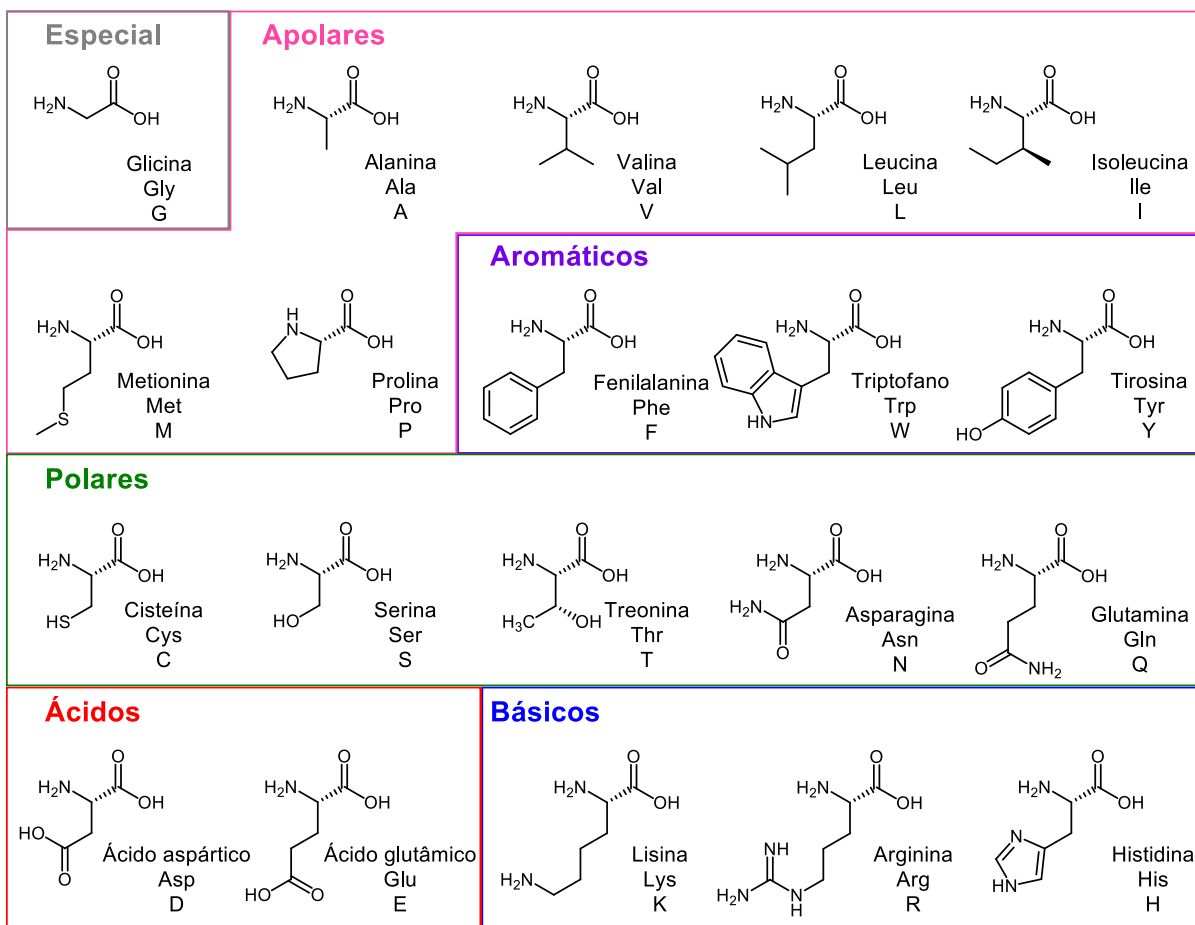


Figura 2. Estruturas dos aminoácidos proteínogênicos.

Aminoácidos, por possuírem simultaneamente grupos ácido e básico em sua estrutura, se apresentam em solução aquosa na forma de íons dipolares de carga neutra, chamados *zwitterions* (**Figura 3. A**). No caso de aminoácidos com cadeias laterais básicas ou ácidas, como a lisina e o ácido glutâmico, por exemplo, esta porção da molécula encontra-se ionizada em condições fisiológicas, meio aquoso em pH 7,2 – 7,4 (**Figura 3. B**). As cargas referentes às cadeias laterais dos aminoácidos são também observadas quando estes se encontram compondo uma cadeia peptídica. Deste modo, as estruturas de peptídeos e proteínas podem apresentar uma carga residual em pH fisiológico, calculadas a partir do balanço de cargas dos aminoácidos de cadeias laterais ionizáveis, componentes de suas estruturas (NELSON e COX, 2018; SOLOMONS et al, 2018).

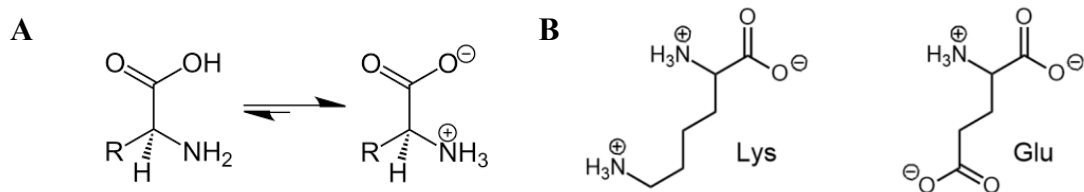


Figura 3. **A** – Estrutura *zwitteriônica* dos aminoácidos. **B** – Aminoácidos lisina (básico) e ácido glutâmico (ácido) carregados em pH fisiológico.

As cadeias peptídicas apresentam diferentes níveis de organização estrutural: estrutura primária, referente à sequência de aminoácidos que compõem a cadeia; estrutura secundária, referente à organização conformacional em torno da cadeia peptídica; e estrutura terciária, referente ao enovelamento da estrutura global da proteína. Há ainda a estrutura quaternária, que diz respeito à associação de unidades proteicas diferentes, formando estruturas supramoleculares mais complexas e com funções biológicas bem definida (**Figura 4**) (CAREY, 2011; NELSON e COX, 2018).

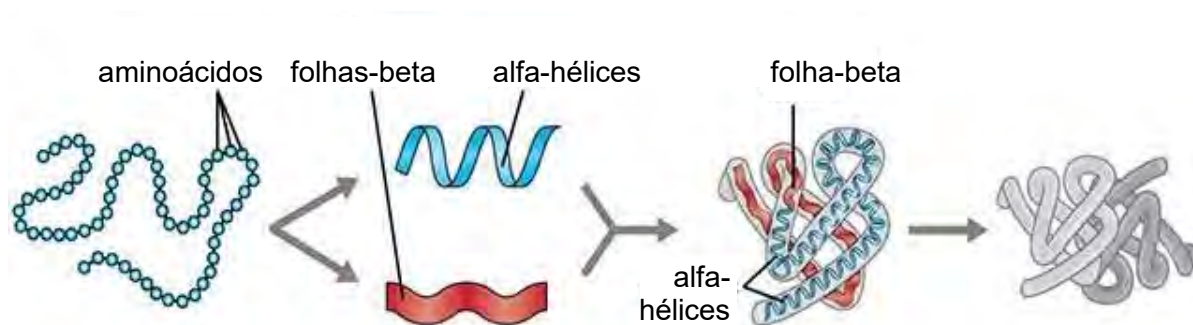


Figura 4. Estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias em peptídeos e proteínas.

Peptídeos normalmente possuem uma complexidade muito menor que proteínas ao nível de estrutura terciária, devido a suas cadeias serem menores. No entanto, é de extrema relevância a caracterização da estrutura secundária de peptídeos em solução, uma vez que ela afeta a disposição geométrica das cadeias laterais dos aminoácidos ao redor da cadeia peptídica. Neste sentido, a espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica muito útil na caracterização de peptídeos em solução. O método se baseia na incidência sobre a amostra de luz polarizada circularmente tanto para a direita, com sentido de giro horário (conforme mostrado na **Figura 5. A**), quanto para a esquerda, no sentido anti-horário. O sinal de CD é registrado como a diferença entre as absorvâncias da luz polarizada para a esquerda e para a direita, ocasionada devido ao caráter quiral dos aminoácidos ligados na sequência peptídica. A faixa de comprimento de onda analisada em CD vai tipicamente de 190–250 nm, abrangendo, portanto, regiões de absorção referentes a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, características das ligações amida

na cadeia peptídica. Destas interações é possível obter padrões de CD característicos para sequências peptídicas, conforme suas estruturas secundárias (**Figura 5. B**) (JUBAN et al., 1997; GREENFIELD, 2006). Para estruturas alfa-helicoidais notam-se 3 sinais característicos: um máximo em 191–193 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e um duplo mínimo em 208 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Já as folhas-beta apresentam um máximo em 198 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e um mínimo em 215 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (SREERAMA e WOODY, 2004).

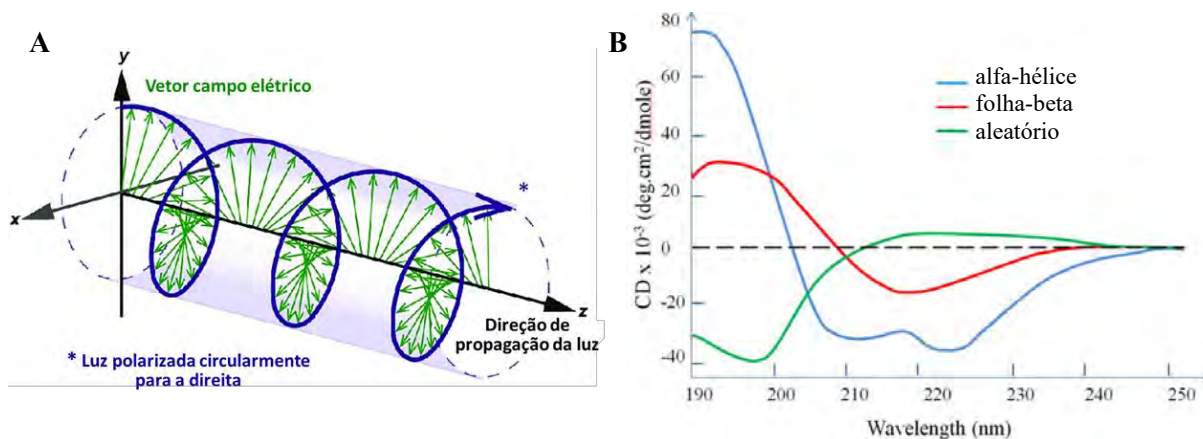


Figura 5. A. Imagem representativa da luz circularmente polarizada para a direita. **B.** Gráficos de CD característicos para estruturas peptídicas com estruturas secundárias em alfa-hélice (azul), folha-beta (vermelho) e aleatório (verde) (adaptado de WEI et al., 2014; YANG et al., 2019).

Os peptídeos estão presentes como alternativas terapêuticas desde 1922, com a introdução da insulina para o tratamento de pacientes diabéticos, feito que rendeu o prêmio Nobel a seus descobridores, Frederic G. Banting e John J. R. Macleod, em 1923 (BANTING et al., 1922). Por anos a utilização de peptídeos como fármacos dependeu de extrações realizadas a partir de matrizes naturais, uma vez que, a esta altura, suas estruturas eram consideradas demasiado complexas para serem acessadas sinteticamente com a tecnologia disponível na época. Com o avanço das técnicas de síntese química e de biotecnologia os peptídeos foram ganhando espaço no mercado farmacêutico. Nas décadas de 1960–70 apenas 5 peptídeos para fins terapêuticos foram aprovados. Entre as décadas de 1980–90 este número subiu para 29. E entre os anos 2000–19 foram realizadas 52 adições de peptídeos terapêuticos ao mercado farmacêutico mundial. O mercado global de medicamentos, que se estima movimentar um total de US\$ 1,2 trilhão anualmente, já conta com uma fatia de 5% do faturamento atribuída a fármacos baseados em peptídeos, o que representa cerca de US\$ 60 bilhões anuais (MUTTENTHALER et al., 2021). A **Figura 6** mostra uma composição da linha do tempo do desenvolvimento de peptídeos para aplicações deferentes terapêuticas, com destaque para os

gráficos ilustrando as fatias de mercado de medicamentos (caixa a.); e para a evolução na aprovação de novos fármacos baseados em peptídeos ao longo dos anos (caixa b.) (MUTTENTHALER et al., 2021).

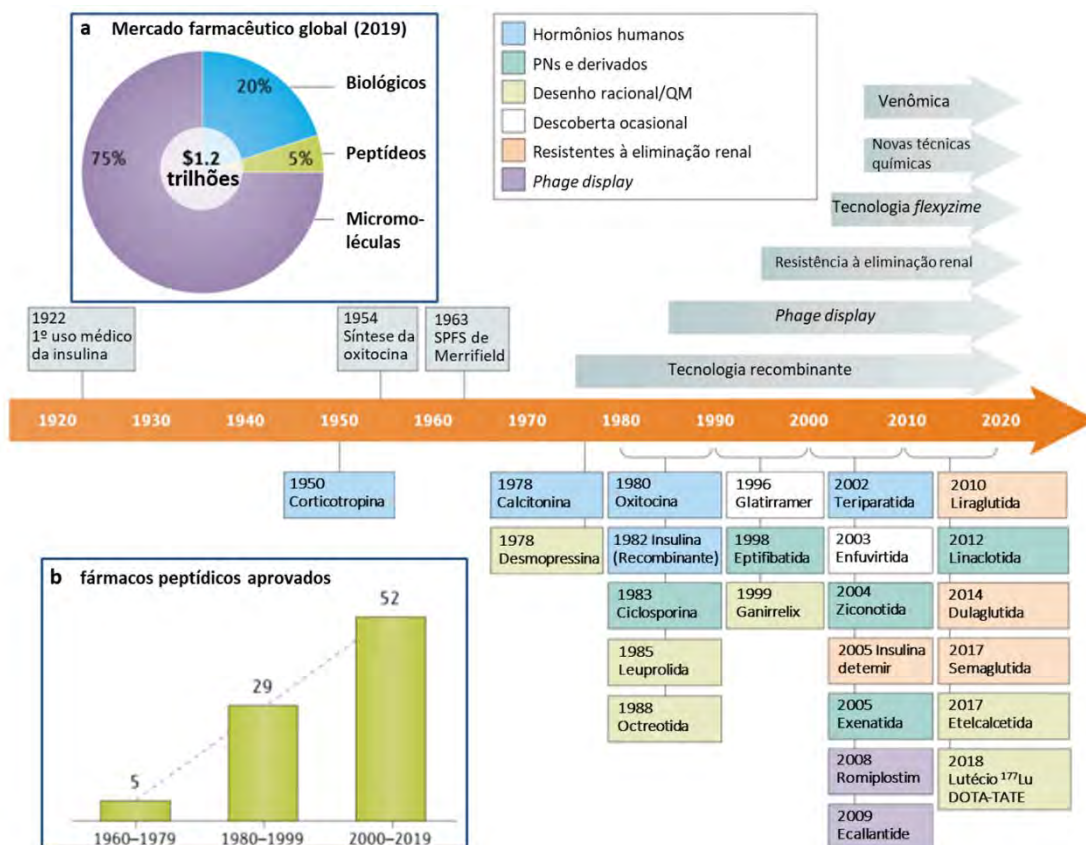


Figura 6. Panorama histórico e mercado de peptídeos terapêuticos (adaptado de MUTTENTHALER et al., 2021).

Além do avanço na tecnologia para a obtenção e produção de peptídeos para aplicação medicinal, os importantes desenvolvimentos na área da farmacotécnica foram fundamentais para o aumento da participação dos peptídeos na terapêutica atual. Sequências peptídicas apresentam, tipicamente, baixa biodisponibilidade para a administração por via oral. O ambiente proteolítico do trato gastrointestinal e a baixa absorção, devido a seu tamanho e polaridade são fatores importantes neste sentido. Muito embora preconize-se que novos fármacos sejam administráveis por via oral, no caso dos peptídeos a necessidade de novas rotas de administração levou ao desenvolvimento de alternativas confortáveis e eficientes para a entrega destas macromoléculas bioativas. Contudo, apenas 6% dos peptídeos já aprovados são de administração por via oral, sendo ainda sua principal forma de administração a via injetável, somando 78%, subdivididos em classes específicas (**Figura 7**) (ZHANG et al., 2020). Uma alternativa dentro desta linha com boa receptividade, especialmente entre pacientes diabéticos,

são os aplicadores automáticos, onde o próprio paciente ajusta a dose utilizando um *dial* e faz a própria aplicação do medicamento, utilizando agulhas siliconadas (p.ex. 4 x 0,23 mm), que permitem a administração por via subcutânea, com o mínimo de dor (BANGSTAD et al., 2007). Outra opção injetável são os adesivos com microagulhas para aplicação transdérmica. Esta opção é totalmente indolor e se baseia na utilização de adesivos contendo microagulhas de 25 – 900 µm de comprimento. As agulhas podem ser recobertas com o fármaco ou constituída de um material biodegradável, permitindo a liberação lenta do princípio ativo (KIRKBY et al., 2020). Uma alternativa à rota injetável é a administração por inalação, através da utilização de dispositivos atomizadores para a formação de aerossóis. Esta via de aplicação é de grande interesse para a administração de fármacos de natureza peptídica, com ação no sistema nervoso central (ONOUE et al., 2008). A própria via oral vem recebendo atenção crescente, com novas tecnologias sendo desenvolvidas no sentido de se aumentar a biodisponibilidade de macromoléculas por esta via, que é a mais confortável, simples e segura. Entre as técnicas já em utilização e em desenvolvimento estão o encapsulamento, utilizando nanopartículas de poliácido lático, lipossomos, microemulsões, além de mecanismos de estimulação da absorção intestinal, o qual pode ser combinado com outras estratégias (BROWN et al., 2020; DUBEY et al., 2021).

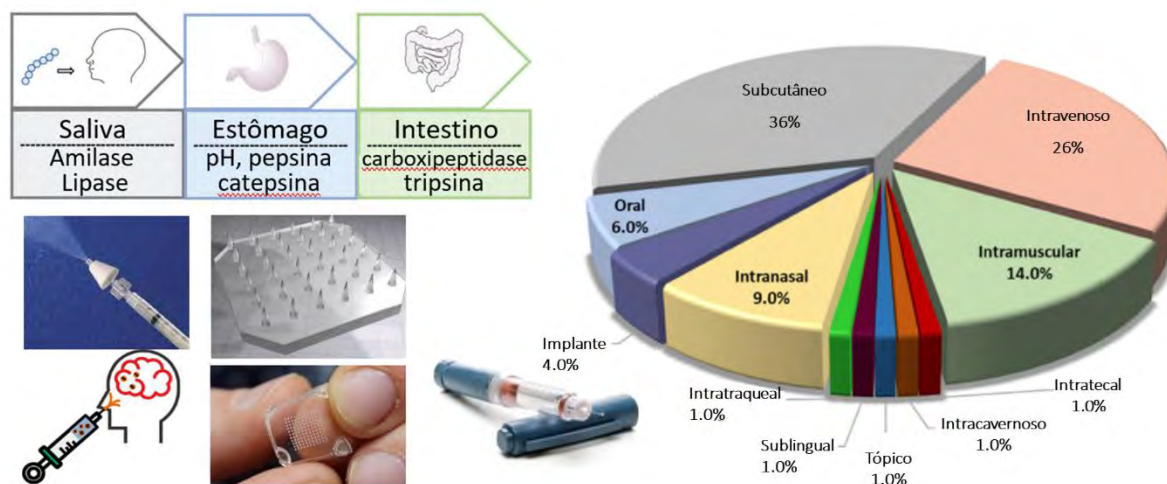


Figura 7. Tecnologias farmacêuticas modernas para a utilização de peptídeos terapêuticos (adaptado de BROWN et al., 2020; DUBEY et al., 2021).

1.2. Peptídeos Catiônicos Anfífilos com Atividade Antimicrobiana

Peptídeos anfífilos catiônicos (PACs) ocorrem naturalmente nas células com a função de defesa dos organismos contra patógenos em geral. Existem mais de 2600 estruturas de PACs

catalogadas, provenientes de fontes naturais (WANG et al., 2016). Comumente referenciados como peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro, estas estruturas são tipicamente sequências curtas, contendo até 50 resíduos de aminoácidos, de caráter anfifílico, destacando-se regiões de caracteres bem definidos: catiônico e hidrofóbico. Os PACs de origem natural geralmente fazem parte do sistema imunológico inato do organismo, sendo encontrados em vertebrados, invertebrados, vegetais e fungos. Apresentam variados níveis de organização, quanto às suas estruturas secundárias e terciárias, como ilustrado na **Figura 8** (MOOKHERJEE et al., 2020).

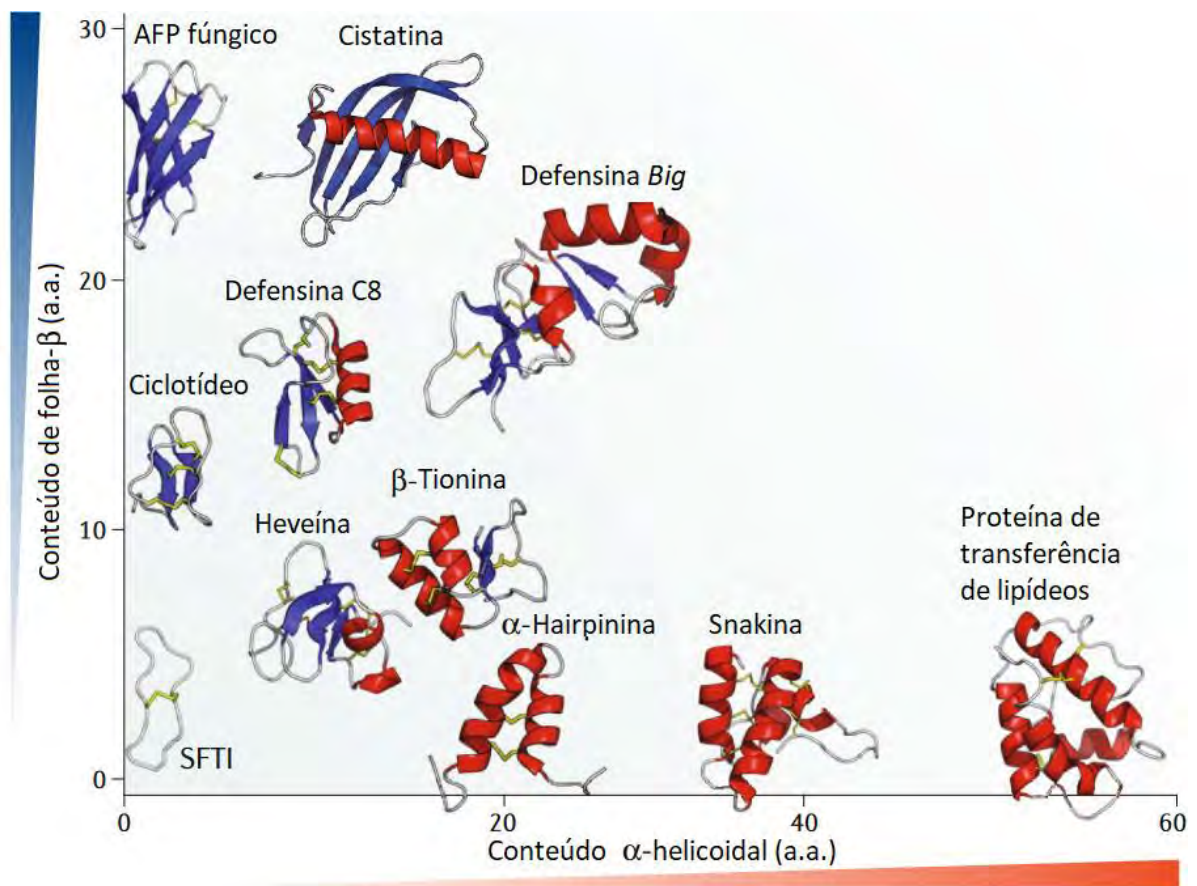


Figura 8. Tipos de peptídeos anfifílicos catiônicos por tipo de estrutura (adaptado de MOOKHERJEE et al., 2020).

O caráter anfifílico dos PACs está intimamente ligado a seus modos de ação típicos. Sua estrutura é rica em resíduos de aminoácidos básicos, que se encontram protonados em pH fisiológico, e, portanto, estão carregados positivamente. Os resíduos de aminoácidos catiônicos se localizam, continuamente, ao longo da superfície molecular dos PACs, da mesma forma que resíduos de caráter hidrofóbico. Sendo assim, formam-se regiões bem definidas de caráter catiônico ou lipofílico. Um exemplo deste tipo de organização é facilmente observado no PAC de origem natural magainina II, encontrado na pele de rãs *Xenopus laevis*. Sua sequência primária, **GIGKFLHSAKKFGKLAFVGGIMQS**, é rica em resíduos de aminoácidos básicos

(sublinhados). A magainina II assume conformação α -helicoidal, conforme mostrado na **Figura 9. A** (vista lateral) e **B** (vista frontal), de modo que os resíduos de aminoácidos de caráter catiônico (cor azul) ocupam uma face específica ao redor da hélice, enquanto os hidrofóbicos (verde) ocupam outra face. As membranas celulares de seres eucarióticos são compostas, em sua maior parte, por fosfolipídeos de natureza *zwitteriônica*. Já as membranas de patógenos, como as bactérias, são ricas em fosfolipídeos contendo grupos ácidos, que se encontram carregados negativamente em pH fisiológico (**Figura 9. C**). Desta forma, os PACs apresentam uma maior afinidade pela membrana de patógenos, devido a atrações do tipo eletrostáticas, que são tipicamente menos pronunciadas na interação com células de seres eucarióticos (LEI et al., 2019).

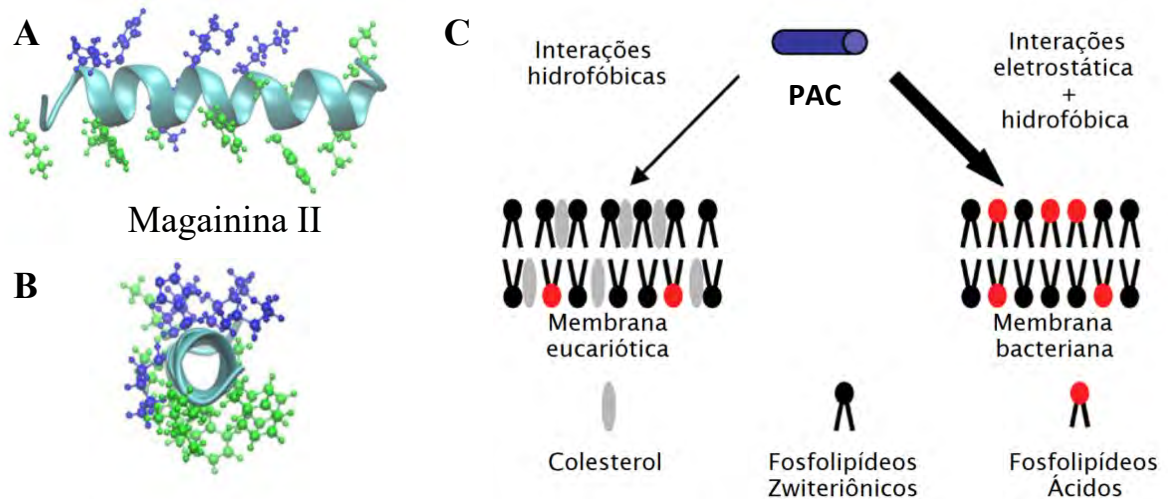


Figura 9. Vistas lateral (A) e frontal (B) da hélice do PAC magainina II, destacando-se os resíduos de caráter catiônico (azul) e hidrofóbico (verde). C, esquema para a interação preferencial entre PACs e células de patógenos em vez de células eucarióticas (adaptado de LEI et al., 2019).

A partir da aproximação entre os PACs e os patógenos, pode ocorrer a desestabilização da membrana destes, levando à morte celular por necrose; ou ainda os PACs podem permear a membrana, atingindo alvos intracelulares específicos. Alguns modelos de interação entre PACs com a membrana de patógenos são mostrados na **Figura 10**. O modo de interação carpete pressupõe um recobrimento da membrana, sem que haja necessariamente a inserção de peptídeos na bicamada fosfolipídica, ou a formação de poros, de modo similar à ação de um detergente. A partir do acúmulo de PACs, ocorre o deslocamento dos fosfolipídeos e a curvatura da membrana, em níveis que prejudicam sua permeabilidade seletiva e a plasticidade celular, chegando ao ponto de haver o desprendimento de segmentos de fosfolipídeos, que permanecem

aderidos aos peptídeos catiônicos. O modelo de interação barril se caracteriza pela inserção de estruturas de PACs perpendicularmente à membrana, de modo a formar estruturas supramoleculares ao longo da membrana, gerando poros. Este modelo se assemelha ao modelo de formação de poros toroidais, onde os fosfolípidos tem uma afinidade maior pelos PACs e formam-se poros com estruturas híbridas peptídeo-fosfolípídeo. Outras propostas mecanísticas preveem a formação de poros transitentes. A imersão propõe que, a partir do acúmulo de peptídeos em uma face da membrana, formem-se agregados que permeiam a membrana, causando sua desestabilização. Já o modelo por eletroporação propõe o acúmulo de cargas positivas, até que haja uma diferença de potencial de cerca de 0,2 V entre as superfícies interna e externa da membrana, ocasionando assim o surgimento de poros por ação eletrostática (CHAN et al., 2006; GIULIANI et al., 2007; TRAVKOVA et al., 2017).

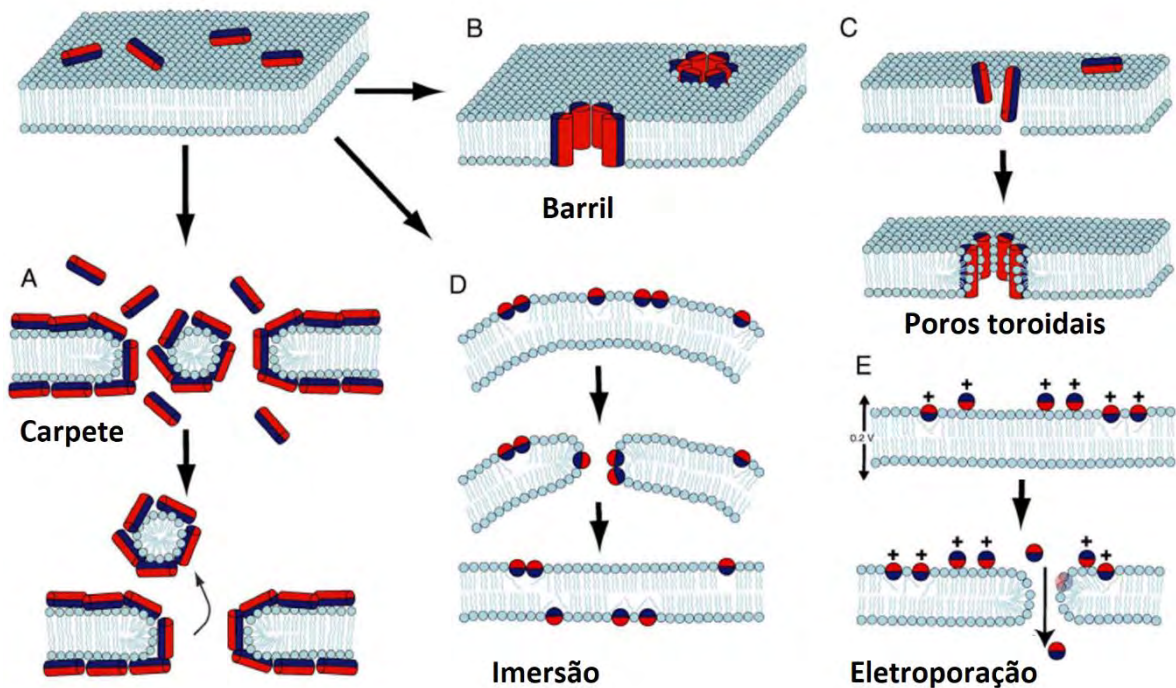


Figura 10. Modelos propostos como mecanismos de ação de PACs sobre a membrana de patógenos: A – carpete; B – barril; C – poros toroidais; D – imersão; E – eletroporação (adaptado de CHAN et al., 2006).

Propõe-se ainda que alguns PACs sejam capazes de permear a membrana, sem que haja dano significativo à sua função de permeabilidade seletiva, e atuem sobre alvos intracelulares como a síntese e duplicação de material genético, síntese e enovelamento de proteínas e inibição da respiração celular, por exemplo (GIULIANI et al., 2007).

1.3. Conjugados Peptídeo-Fármaco e Peptídeos de Penetração Celular

A conjugação de peptídeos e fármacos em uma única molécula é uma estratégia que vem ganhando destaque em química medicinal nos últimos anos. Uma busca na base de dados *Web of Science*, utilizando os termos “*peptide drug conjugate*”, de 2001 a 2021, retornou 6406 resultados, dos quais 2867 (44,8%) foram publicados nos últimos 5 anos (**Figura 11**). O crescente interesse de cientistas da área de química medicinal pelos conjugados peptídeo-fármacos (CPFs) é justificado tanto pelo avanço das técnicas de síntese química, quanto pelo potencial que a conjugação peptídeo-fármaco pode fornecer em relação à solubilidade em meio aquoso, especificidade por alvos, baixa imunogenicidade e boa penetrabilidade em células e tecidos (YAVARI et al., 2018).

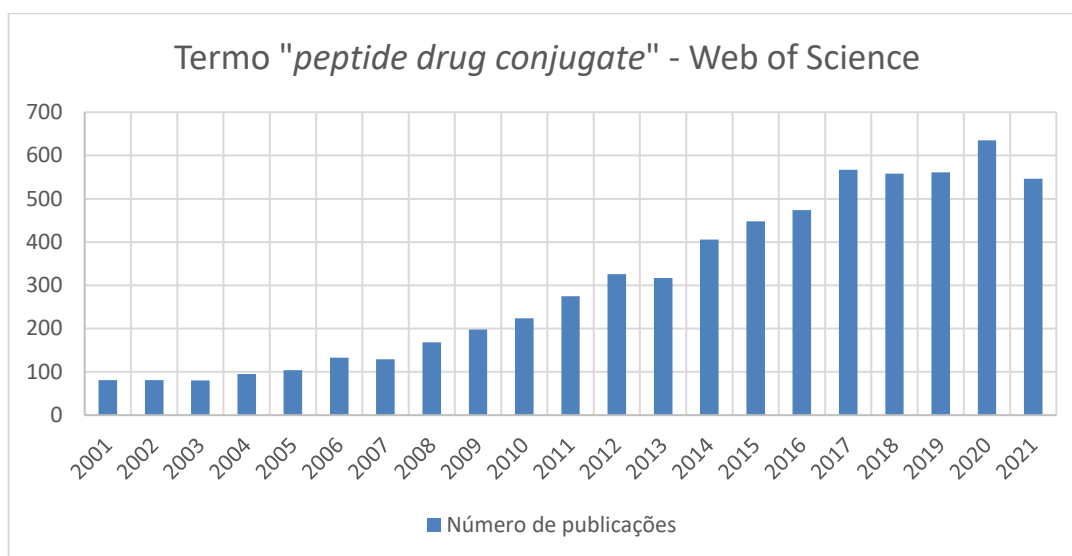


Figura 11. Número de publicações por ano encontradas na base de dados *Web of Science* com os termos de busca “*peptide drug conjugate*”.

Diversos estudos clínicos, em diferentes estágios, estão em curso, avaliando a utilização de CPFs para aplicação terapêutica (HABAULT e POYET, 2019; LANGEL, 2019; VHORA et al., 2019). Um exemplo é o AEZS-108 (AEterna Zentaris), um CPF entre o fármaco doxorubicina e uma sequência peptídica, agonista do receptor do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que é superexpresso em alguns tipos de cânceres. Os dados mais recentes indicam que o AEZS-108 se encontra em estudos clínicos de fase II para o tratamento de câncer de próstata, resistente a taxanos (STEVEN et al., 2017), e de fase III para o tratamento de câncer do endométrio (MILLER et al., 2014). O conjugado Brimapitide (Xigen SA), entre o peptídeo penetrador celular TAT e um inibidor de JNK-1 se encontra em fase III de estudos clínicos para o tratamento de perda de audição (STAECKER et al., 2019). O fármaco ^{177}Lu -

DOTATATE (Novartis) é um CPF aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA, EU, 2017), e pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA, 2018), para o tratamento de tumores neuroendócrinos, câncer de pâncreas e alguns tipos de cânceres do trato gastrointestinal. Sua estrutura é baseada em uma sequência peptídica agonista de receptores de somatostatina, conjugada com ao agente radioterápico ^{177}Lu , emissor de partículas β . (HENNRICH e KOPKA, 2019). As estruturas de AEZS-108, brimapitide e ^{177}Lu -DOTATATE são mostradas na **Figura 12**.

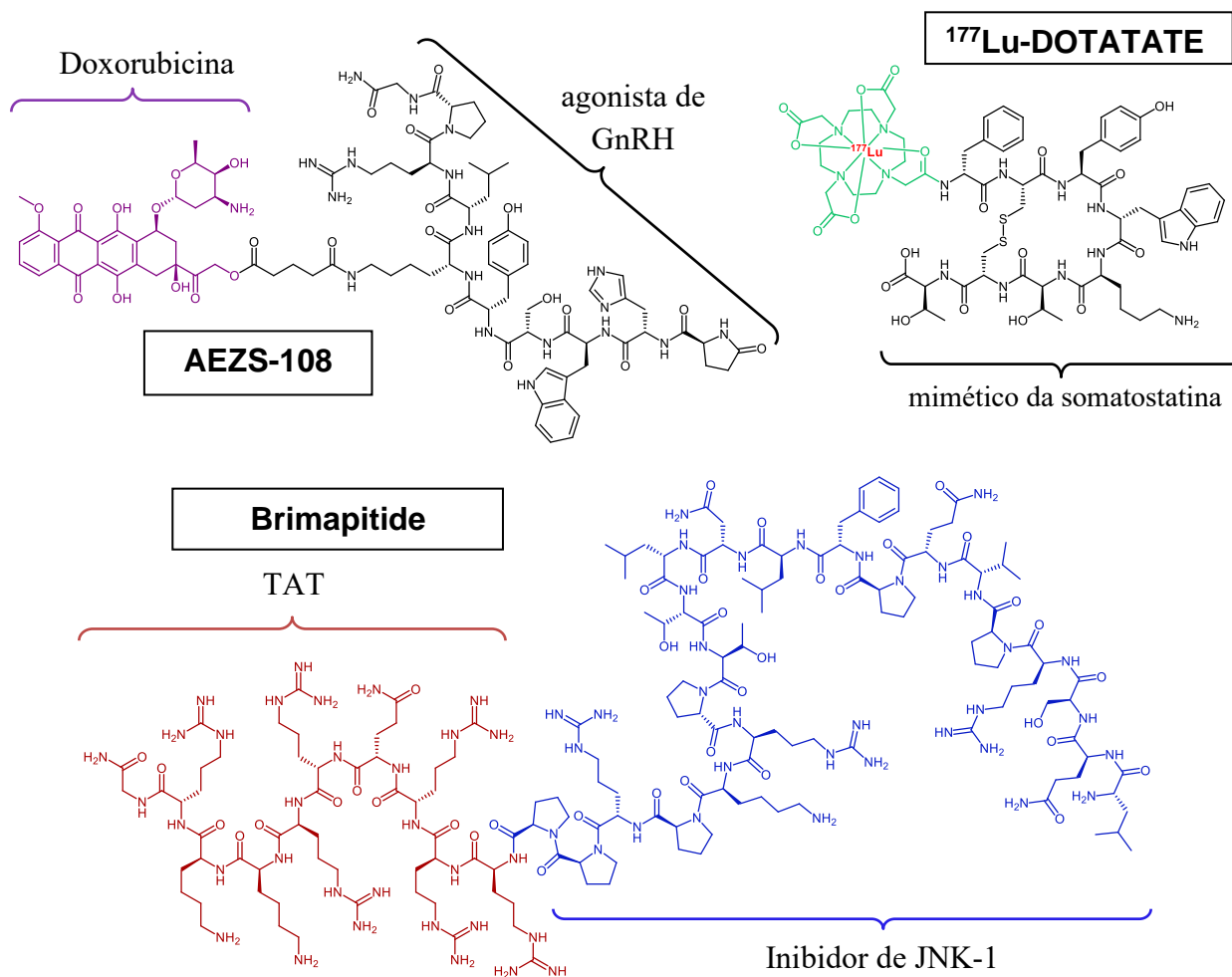


Figura 12. Estruturas de CPFs em estágio avançado de estudos clínicos (AEZS-108, brimapitide) ou com aprovação para utilização terapêutica (^{177}Lu -DOTATATE).

Dentro da estratégia conjugação com fármacos e moléculas bioativas, os peptídeos de penetração celular (PPCs) são uma classe de moléculas de destaque. São conhecidas hoje diversas sequências peptídicas com essa característica, como exemplificado na **Tabela 1**. Destacam-se os PPCs quanto à sua característica catiônica, com sequências ricas em arginina; anfífilicas, com regiões bem definidas, hidrofóbica ou hidrofílica; e PPCs hidrofóbicos, ricos em aminoácidos de cadeias laterais hidrofóbicas. Sabe-se também que a ordem dos

aminoácidos, além de suas estruturas secundárias, é importante para a atividade dos PPCs, principalmente em se tratando de sequências catiônicas ou anfífilas, sendo de segunda importância para sequências de caráter hidrofóbico (XIE et al., 2020).

Tabela 1. Peptídeos de reconhecida atividade de penetração celular (XIE et al., 2020).

Peptídeo	Sequência	Comprimento	Origem
<i>PPCs catiônicos</i>			
TAT	RKKRRQRRR	9	Derivado de proteína
R8	RRRRRRRR	8	Sintético
DPV3	RKKRRRESRKKRRRES	16	Derivado de proteína
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	16	Derivado de proteína
<i>PPCs anfífilos</i>			
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	18	Derivado de proteína
ARF	(19-31) RVRVFVHPRLT	13	Derivado de proteína
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV	27	Quimérico
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	27	Derivado de proteína
<i>PPCs hidrofóbicos</i>			
Bip4	VSALK	5	Derivado de proteína
C105Y	CSIPPEVKFNPFVYLI	16	Derivado de proteína
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	26	Derivado de proteína
gH625	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	20	Derivado de proteína

A capacidade dos PPCs em permear membranas é interessante em estratégias de conjugação que visam facilitar o transporte de cargas bioativas para o ambiente intracelular. A penetração nas células pode ocorrer de diferentes modos, quer seja translocando-se diretamente a bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática; quer seja induzindo o fenômeno de endocitose (GESTIN et al., 2017). No primeiro caso, o transporte é independente de energia da célula, e os PPCs interagem com a célula via forças intermoleculares não covalentes. As propostas de interação entre os peptídeos e a superfície celular para permeação da membrana se assemelham às discutidas na **Seção 1.2** (pág. 6), para explicar a atividade microbicida de PACs, podendo os PPCs ainda induzir curvaturas na membrana, gerando micelas invertidas que adentram o citoplasma (GAO et al., 2019). Por esta razão, PPCs que dependem primariamente deste tipo de mecanismo para realizar a penetração celular, comumente apresentam toxidez à célula. PPCs hidrofóbicos ou anfífilos, ou conjugados transportando cargas de caráter lipofílico, são mais propensos a penetrar as células via mecanismos de translocação direta (**Figura 13**) (KARDANI et al., 2019).

Os principais mecanismos de penetração celular por vias endocíticas envolvem interações com receptores caveolinas, a entrada em vesículas recobertas por clatrina, e a macropinocitose. Caveolinas são proteínas recorrentes em invaginações de caráter lipofílico nas membranas celulares, denominadas cavéolas, que reconhecem componentes no meio extracelular de caráter hidrofóbico, carregados negativamente e peptídeos acetilados. A partir

do reconhecimento, ocorre o recrutamento de proteínas dinaminas, de ação ATP-dependente, que promovem o fechamento da vesícula e sua consequente internalização para o citosol (HU et al, 2018). A endocitose mediada por clatrina se assemelha ao processo descrito mediado por caveolina. Além da interação com outra classe de receptores superficiais celulares, uma das principais diferenças entre os processos é que clatrininas não se localizam tipicamente em invaginações na membrana. Desta forma, a partir do recrutamento de dinaminas, o mecanismo envolve a invaginação e depois a formação de uma vesícula contendo material extracelular. Este mecanismo é o principal associado à penetração de PPCs ricos em arginina (KAWAGUCHI et al., 2016; KAKSONEN e ROUX, 2018). Mecanismos adicionais de endocitose, independentes de caveolina e clatrina, ainda podem ocorrer em células especializadas, como os macrófagos. A macropinocitose é um mecanismo de endocitose independente de interação com receptor que, acredita-se, ocorra em todos os tipos de células. É um movimento natural, supostamente induzido pela ação de fatores de crescimento e estimulação de actina (REDKA et al., 2018). Devido às dimensões das protusões que são geradas, acredita-se que este seja o principal mecanismo de entrada de PPCs, associados a cargas de grande peso molecular (XIE et al., 2020).

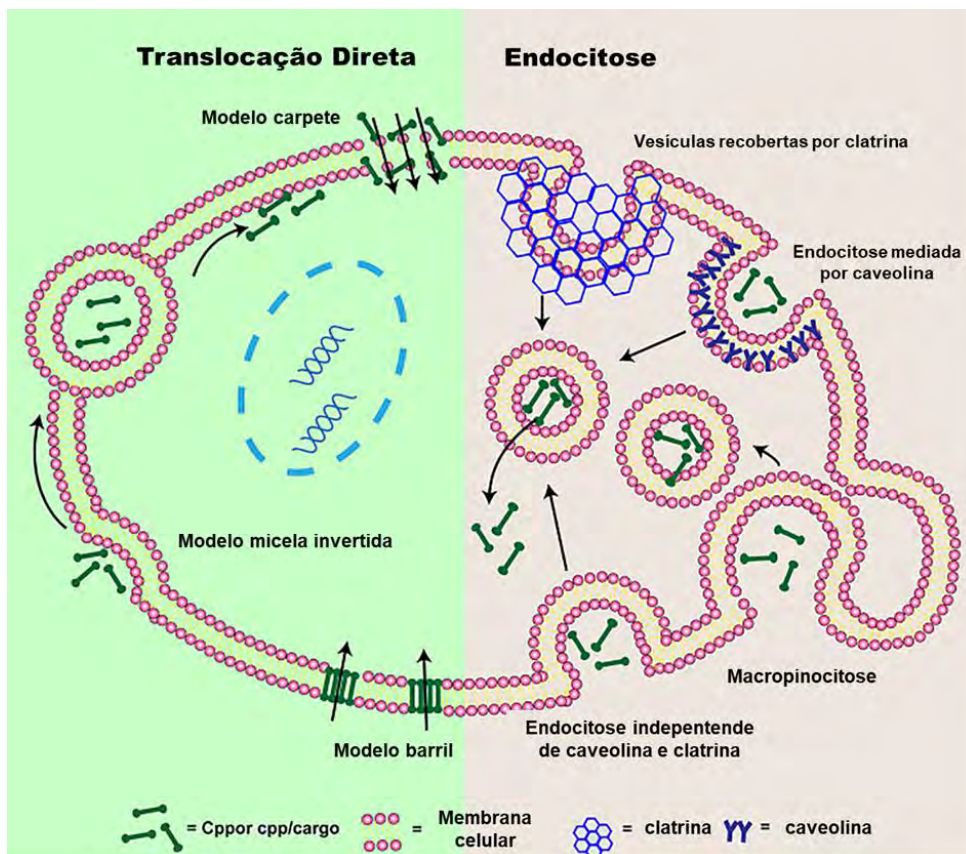


Figura 13. Modos de ação propostos para penetração celular por peptídeos (adaptado de XIE et al., 2020).

Além da utilização de PPCs para promover a entrada no ambiente intracelular, é interessante que a conjugação do peptídeo ao fármaco, ou carga bioativa, ocorra por intermédio de uma cadeia espaçadora degradável no meio intracelular. Desta forma, há uma maior probabilidade de o fármaco ser liberado da estrutura do CPF, aumentando as chances deste atingir seu alvo e realizar sua função terapêutica. Diversos conectores degradáveis, aplicáveis à estratégia de conjugação com PPCs, se encontram descritos na literatura, apresentando variados mecanismos de degradação, conforme exemplificado na **Tabela 2** (BÖHME e BECK-SICKINGER, 2015).

Tabela 2. Exemplos de conectores aplicáveis à conjugação com PPCs de diferentes mecanismos de degradação no ambiente intracelular (adaptado de BÖHME e BECK-SICKINGER, 2015).

Tipos de conector	Estruturas, condições e produtos de clivagem	
<u>Dependente de pH</u> Hidrazona		pH ácido →
<i>Cis</i> -aconitil		pH ácido →
<u>Redutível</u> Dissulfeto		redução →
Azo		redução →
<u>Enzimático</u> Val-Cit		proteases →
β -Glucoronida		glicosidase →
Éster		pH ácido esterases →
Carbamato		citocromo P450 esterases →

Dentro do desenho molecular de CPFs é interessante se considerar a inclusão de porções autoimolativas na cadeia espaçadora. Dessa forma, a partir da degradação promovida no meio intracelular, a porção fármaco-espaçador liberada passa por um processo intramolecular de eliminação, liberando, em seguida, o fármaco em sua forma original, ou com menos segmentos remanescentes de sua conjugação com os CPFs. Dois exemplos são mostrados a seguir, na **Figura 14**. Em **A**, a partir da redução de uma ligação dissulfeto, o grupo tiol resultante ligado realiza um ataque intramolecular 1,5, via mecanismo de substituição nucleofílica em carbono acílico, gerando um produto de ciclização, resultando na eliminação da molécula do fármaco. Em **B**, a partir da hidrólise enzimática da ligação amida, o grupo para-aminobenzil resultante passa por uma reação de eliminação em cascata do grupo azaquinona-metídio, com liberação de CO₂ e da molécula de fármaco. Nota-se, em ambos os casos, a necessidade de um grupo X de caráter nucleofílico na estrutura do fármaco (X = O, NH, NR), tanto para viabilizar a conjugação com o espaçador, quanto para funcionar como um bom grupo abandonador no momento da liberação (GNAIM e SHABAT, 2014; DENG et al., 2020).

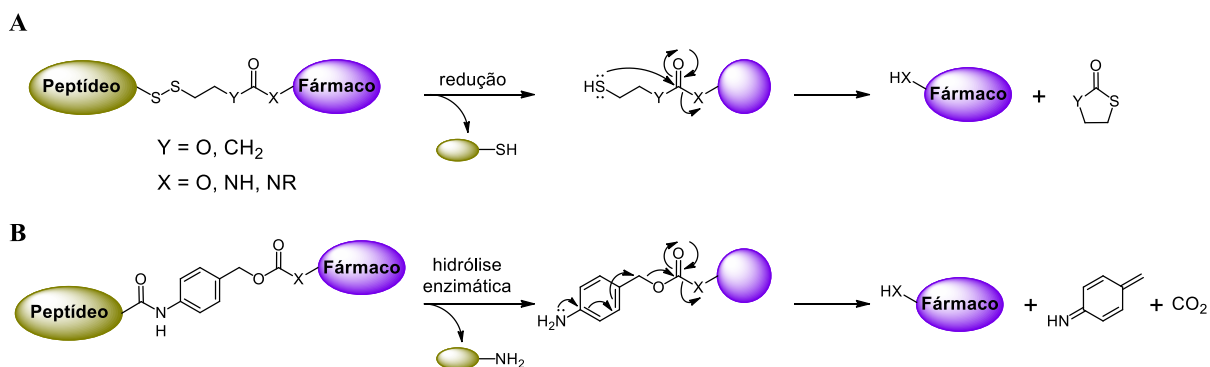


Figura 14. Exemplo de conectores autoimolativos e mecanismos de liberação para espaçadores contendo ligação dissulfeto (**A**) e grupo para-aminobenzil (**B**).

1.4. Hélices Poliprolina Tipo II Anfílicas: Uma Breve Linha do Tempo

Sequências peptídicas ricas em prolina apresentam, em nível de suas estruturas secundárias, padrões de organização diferentes dos padrões alfa-hélice e folha-beta, mais comumente observados em sequências formadas pelos demais aminoácidos. Por possuir uma cadeia cíclica de 5 membros, os ângulos-diedro que podem ser assumidos ao redor das ligações químicas, constituintes dos resíduos de prolina, são limitados por fatores conformacionais. Em decorrência dessa limitação, as sequências peptídicas deste tipo formam estruturas únicas e recebem a denominação de poliprolina tipo I (PPI) ou tipo II (PPII). Nas hélices PPI os ângulos diedros ao redor das ligações do arcabouço dos resíduos de aminoácidos são de $(\phi, \psi) = (-75^\circ,$

160°) e as ligações peptídicas são do tipo *cis* ($\omega = 0^\circ$). Hélices PPI são mais compactas (6,31 Å por volta), e possuem giro do esqueleto peptídico para a direita. Já as hélices PPII possuem ângulos diedro de $(\phi, \psi) = (-75^\circ, 146^\circ)$ e as ligações peptídicas são do tipo *trans* ($\omega = 180^\circ$), como na maioria dos aminoácidos. Hélices PPII são mais estendidas (9,60 Å por volta), possuem giro do esqueleto peptídico para a esquerda e padrão de repetição a cada 3 aminoácidos. O espectro de dicroísmo circular para hélices PPI e PPII também assume padrões característicos diferentes dos observados para alfa-hélices, folhas-beta e aleatório. PPI se caracteriza por um sinal negativo em 200 nm e um positivo forte em 215 nm. Já hélices PPII, tipicamente, apresentam um sinal negativo em 205 nm e um sinal positivo, menos intenso, em 228 nm (**Figura 15**) (MORADI et al., 2010; RUGGIERO et al., 2016; TSAI et al. 2021).

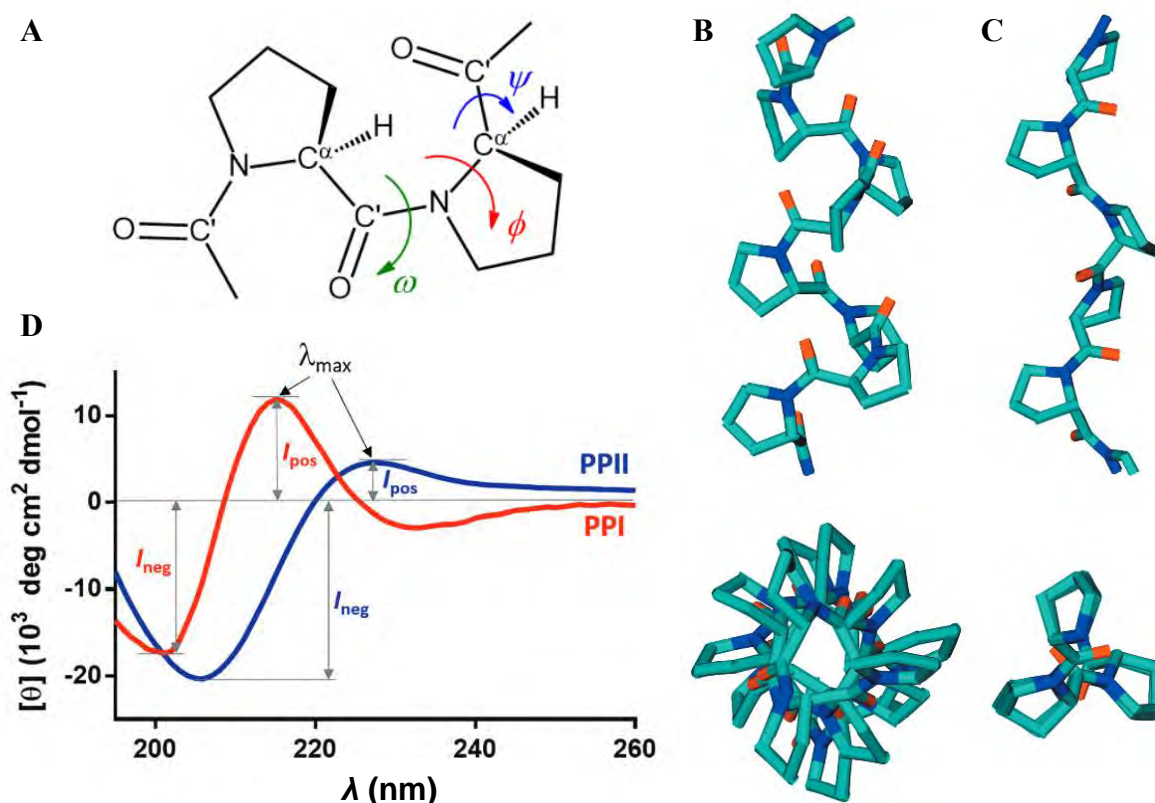


Figura 15. A – Representação dos ângulos diedro (ϕ , ψ e ω) ao redor das ligações do esqueleto poliprolina. B – Helice poliprolina tipo I (PPI): vista lateral (cima) e vista frontal (baixo). C – Helice poliprolina tipo II (PPII): vista lateral (cima) e vista frontal (baixo). D – sinais característicos das hélices PPI (vermelho) e PPII (azul) por espectroscopia de dicroísmo circular (adaptado de MORADI et al., 2010; RUGGIERO et al., 2016; TSAI et al. 2021).

A partir das características únicas das hélices poliprolina, o grupo da Profa. Jean Chmielewski (Purdue University, IN-USA) propôs estruturas peptídicas baseadas em unidades do aminoácido hidroxiprolina *O*-alquiladas. Os aminoácidos foram modificados para conter cadeias miméticas dos aminoácidos leucina (P_L) e arginina (P_R) (**Figura 16. A**). O intuito deste

desenho molecular foi de avaliar a atividade antimicrobiana e de penetração celular simultaneamente. Uma vez que hélices poliprolina apresentam maior rigidez conformacional, e as cadeias laterais dos aminoácidos, hidrofóbicas ou hidrofílicas, ocupariam regiões mais bem definidas ao longo e ao redor da molécula. Verificou-se, por espectroscopia de dicroísmo circular, que os esqueletos de peptídeos **P_nLRR** se comportavam como hélices PPII (**Figura 16. B**). Desta forma, a hélice completaria 1 volta a cada 3 resíduos de aminoácido. A partir da construção do peptídeo, envolvendo aminoácidos catiônicos [*C*] e hidrofóbicos [*H*] do tipo [*CCH*]_{*n*}, cria-se um padrão de repetição de aminoácidos hidrofóbicos ou hidrofílicos, ao longo da extensão da cadeia peptídica, projetados com ângulos diedro de aproximadamente 120° (**Figura 16. C**). Para se avaliar parâmetros de penetração celular destas estruturas foi padronizado que estas sequências seriam marcadas com sondas fluorescentes no *N*-terminal, como mostrado na **Figura 16. D** (FILLON et al., 2005).

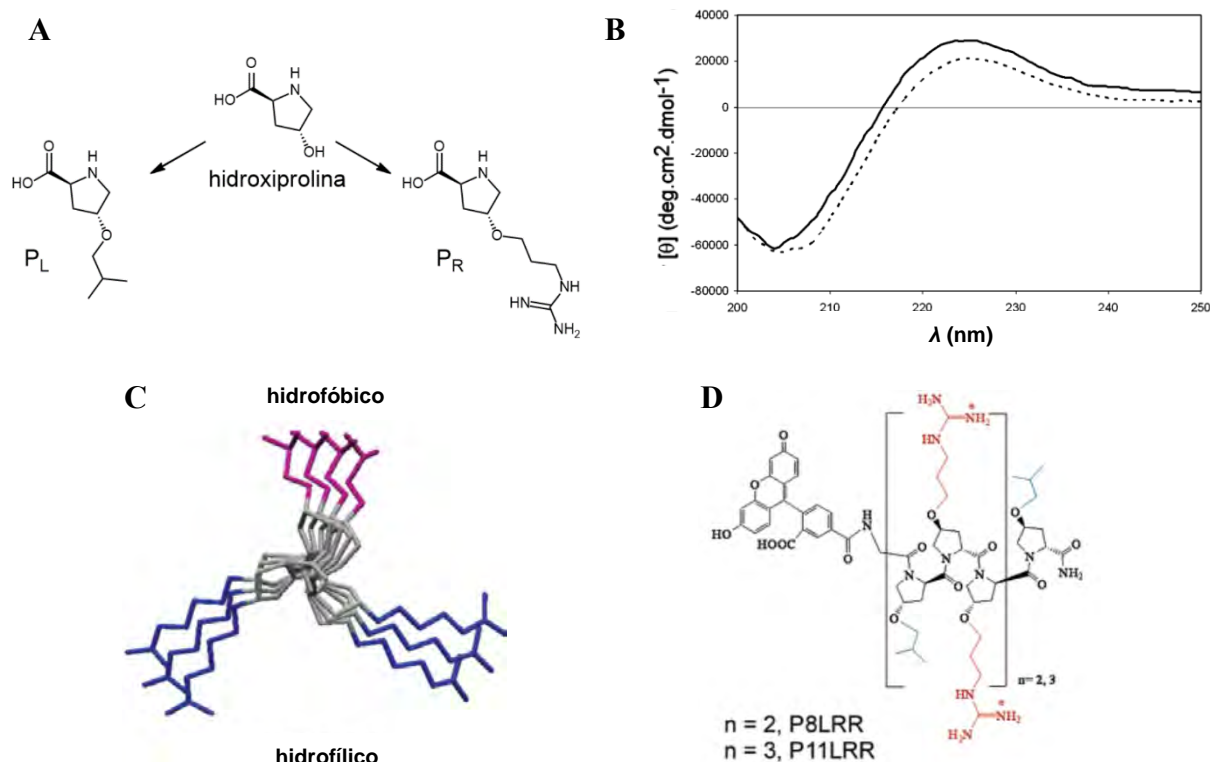


Figura 16. **A** – Representação dos aminoácidos P_L e P_R a partir de modificações da hidroxiprolina. **B** – Espectro de dicroísmo circular mostrando a formação de hélices PPI. **C** – Vista frontal da hélice **P11LRR** ilustrando as regiões de caráter hidrofóbico (rosa) e hidrofílico (azul) obtidas. **D** – Estruturas dos peptídeos **P8LRR** e **P11LRR** marcados com sondas fluorescentes no *N*-terminal (adaptado de FILLON et al., 2005).

Desde a sua descrição em 2005, diversos trabalhos do grupo da Profa. Jean Chmielewski apresentaram discussões quanto modificações de parâmetros das cadeias de peptídeos

poliprolina, incluindo variações na cadeia lateral (FILLON et al., 2005; GEISLER e CHMIELEWSKI, 2009; NEPAL et al., 2018), comprimento da cadeia peptídica (KURIAKOSE et al., 2013; NEPAL et al., 2015), modificações quanto ao caráter hidrofóbico, além da formação de dímeros (GEISLER e CHMIELEWSKI, 2011; HERNANDEZ-GORDILLO et al., 2014). O conjunto de resultados obtidos pelo grupo mostra a relevância dos peptídeos desta classe, evidenciando sua capacidade de penetração em diferentes tipos celulares, bem como sua atividade antimicrobiana frente a variadas cepas bacterianas resistentes às terapias convencionais, ou não. O peptídeo **P17LRR** chegou a ser, inclusive, avaliado *in vivo* em camundongos quanto à sua atividade antibacteriana por via tópica, em modelo de infecção cutâneo (THANGAMANI et al, 2015). A **Figura 17** traz uma composição em **A** da habilidade de penetração celular de **P11LRR**, em comparação com o PPC TAT (**RKKRRQRRR**) (FILLON et al., 2005); em **B** da atividade antimicrobiana e hemolítica *in vitro* de **P11LRR** e **P14LRR**, em comparação com sequências peptídicas correlatas, contendo aminoácidos naturais (KURIAKOSE et al., 2013); e em **C** do efeito do tratamento tópico, em modelo de infecção *in vivo*, em pele de camundongo, mostrando a redução de uma ferida infectada com *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina (MRSA USA300) (THANGAMANI et al, 2015)..

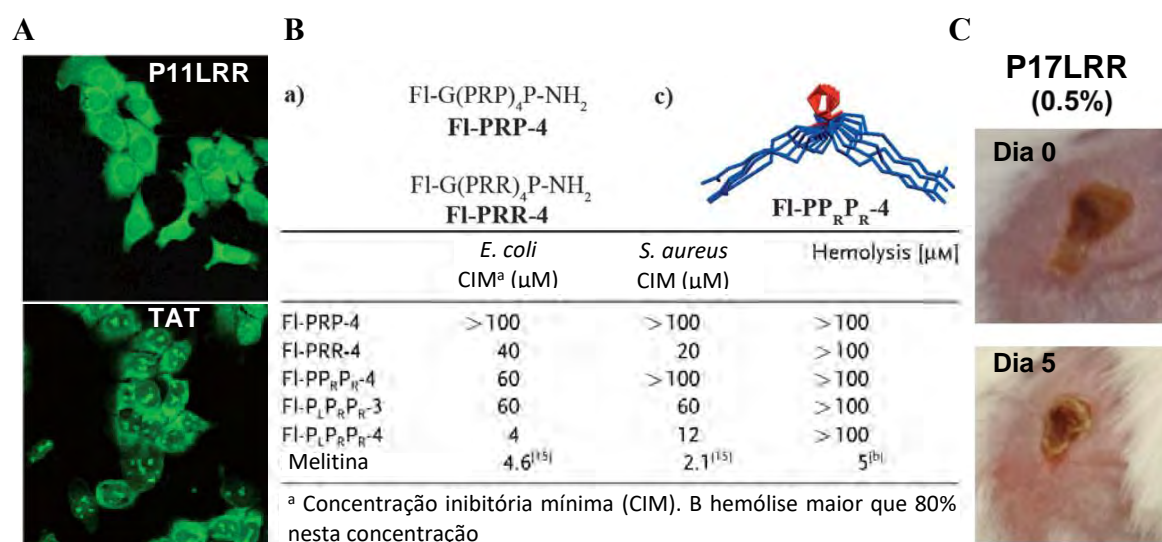


Figura 17. Composição mostrando as atividades de peptídeos **P_nLRR** quanto à sua capacidade: **A** – de penetração celular (adaptado de FILLON et al., 2005); **B** – antimicrobiana *in vitro* (adaptado de KURIAKOSE et al., 2013) e **C** – antimicrobiana *in vivo* (adaptado de THANGAMANI et al, 2015).

A partir das características de atividade antimicrobiana e de penetração celular observadas, foi proposta a síntese de um conjugado peptídeo-fármaco entre o peptídeo **P14LRR** e o antibiótico aminoglicosídico de amplo espectro canamicina. Devido a seu caráter polar, a

Canamicina apresenta reduzido alcance a bactérias localizadas no interior de células, ou que compõem biofilmes estabelecidos. A conjugação peptídeo-fármaco ocorreu por meio do emprego de conectores, contendo ou não ligação dissulfeto redutível, para avaliar o efeito que o mecanismo de liberação do fármaco teria no ambiente intracelular. Observou-se que o conjugado **P14KanS**, contendo conector autoimolativo, no ambiente intracelular se mostrou mais efetivo que peptídeo (**P14LRR**) e fármaco (Canamicina) isolados, ou em co-tratamento, e também em comparação ao conjugado com conector não degradável (**P14KanC**). Os experimentos foram realizados utilizando-se células J774A.1 infectadas com diversas espécies bacterianas (**Figura 18**) (BREZDEN et al., 2016). Adicionalmente, **P14KanS** apresentou eficácia contra biofilmes, superior à de **P14LRR** e canamicina, bem como de outros antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas (vancomicina e linezolida) (MOHAMED et al., 2017).

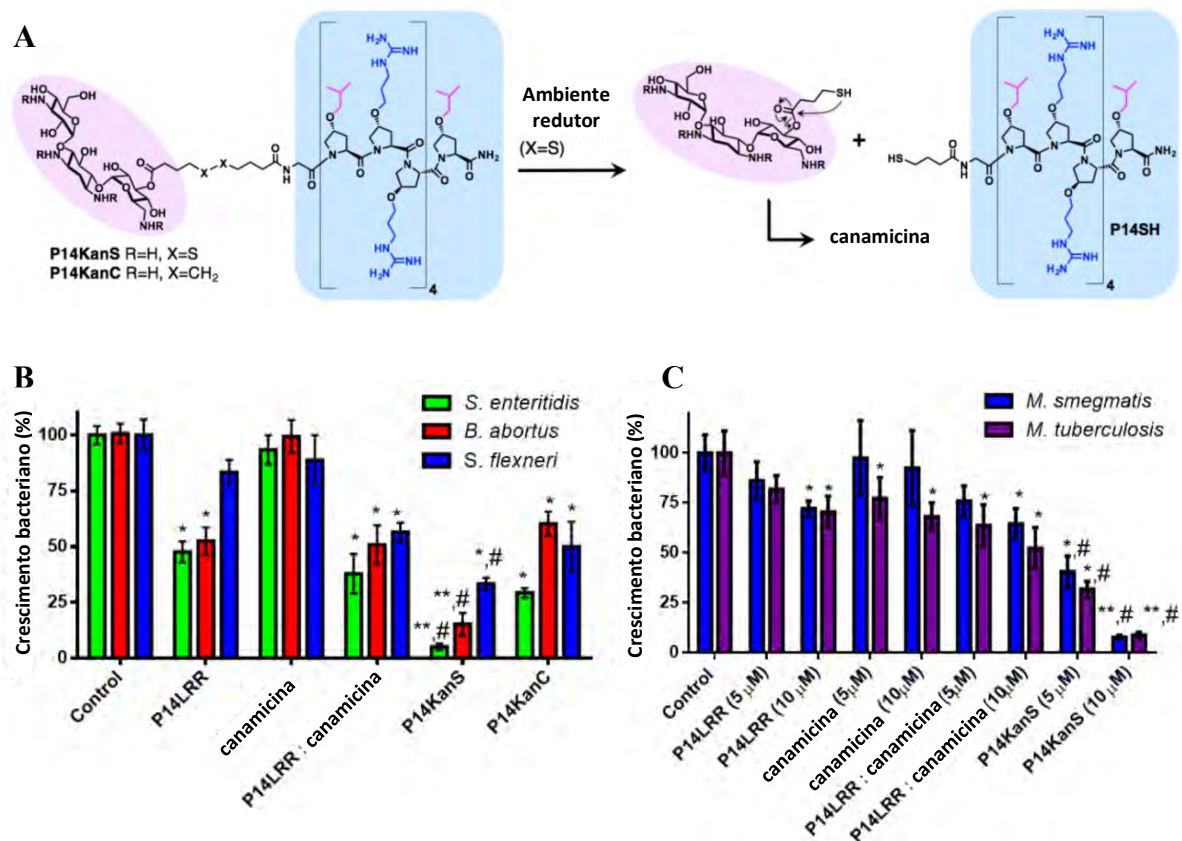


Figura 18. A – Estrutura do conjugado entre **P14LRR** e o fármaco Canamicina com ou sem a possibilidade de liberação do fármaco a partir de redução da ligação dissulfeto em ambiente intracelular. Resultados da avaliação *in vitro* de células infectadas com bactérias de **P14LRR**, Canamicina e dos conjugados: B – a 10 µM contra *Salmonella enteritidis*, *Brucella abortus* e *Shigella flexneri*; C – a 10 µM e 5 µM contra *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis* (adaptado de BREZDEN et al., 2016).

1.5. Cepas Bacterianas Multirresistentes: Peptídeos e a Necessidade de Inovação Terapêutica

A descoberta da penicilina, em 1928, foi um divisor de águas na terapêutica de infecções bacterianas e um marco na história da humanidade. Desde então, dezenas de novos antibióticos foram desenvolvidos, tanto a partir da estrutura e modo de ação da penicilina, quanto explorando diferentes classes e alvos terapêuticos, nos anos que se seguiram. Hoje, no entanto, observa-se uma profunda defasagem em inovação terapêutica no desenvolvimento de novos antibióticos, tendo os avanços mais significativos na área ocorrido durante a “Era de Ouro” do desenvolvimento de antibióticos, entre as décadas de 1960 e 1980. Cabe frisar que boa parte do desenvolvimento recente em descobertas de antibióticos se baseia em modificações estruturais de fármacos antigos, que, portanto, compõem famílias derivadas de um antibiótico predecessor. A **Figura 19** mostra uma linha do tempo do desenvolvimento de novos antibióticos (superior), em comparação aos primeiros casos de desenvolvimento de resistência bacteriana (inferior) (LYDDIARD et al., 2016; STEPHENS et al., 2020).

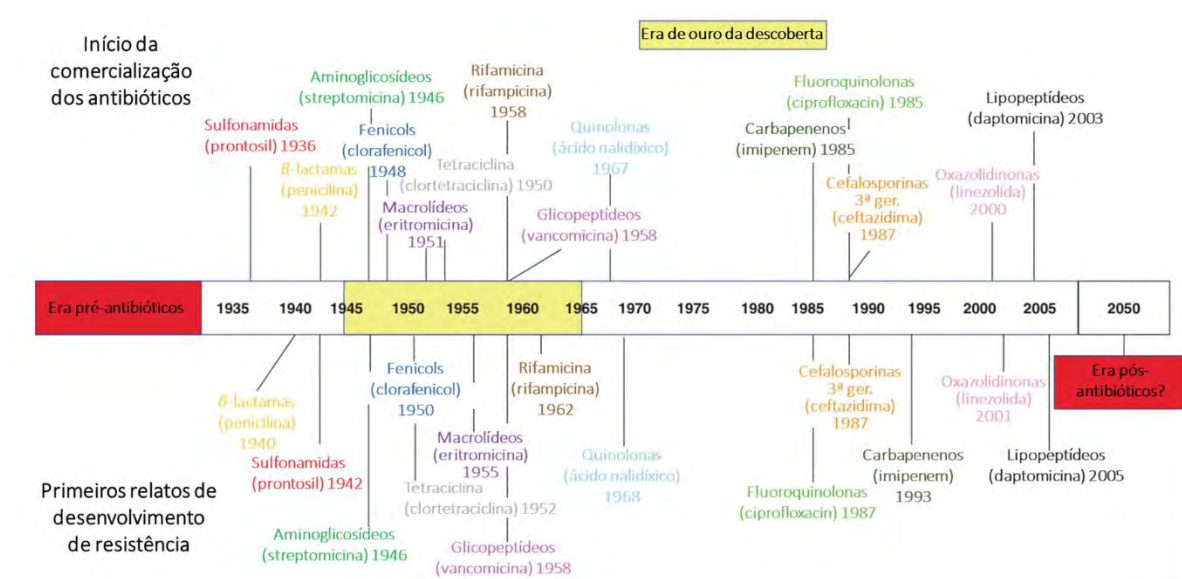


Figura 19. Desenvolvimento de antibióticos ao longo da história (adaptado de STEPHENS et al., 2020).

Somam-se a este quadro o aumento indiscriminado na prescrição médica de antibióticos, de sua utilização na agropecuária e do reduzido interesse das indústrias farmacêuticas em investimentos na descoberta de novas classes de antibióticos, resultando no desenvolvimento de cepas bacterianas multirresistentes às terapias disponíveis na atualidade. Hoje, estima-se que as infecções por bactérias multirresistentes (BMR) já respondam por um total de 700.000 óbitos anuais no mundo, e projeções apontam que esta será a principal causa

de morte em 2050, chegando a 10 milhões de óbitos por ano (**Figura 20**) (O'NEILL, 2016). A crise sanitária causada pela pandemia de Covid-19 levou à adoção de políticas de saúde pública desastrosas, o que incluiu, por exemplo, o estímulo por órgãos oficiais à utilização de medicamentos sabidamente ineficientes para o tratamento da doença, dentre os quais antibióticos (HALLAL e VICTORA, 2021). Sendo assim, é de se esperar um agravamento ainda mais acelerado em relação ao desenvolvimento de cepas bacterianas multirresistentes (CLANCY e NGUYEN, 2020; PELFRENE et al., 2021).

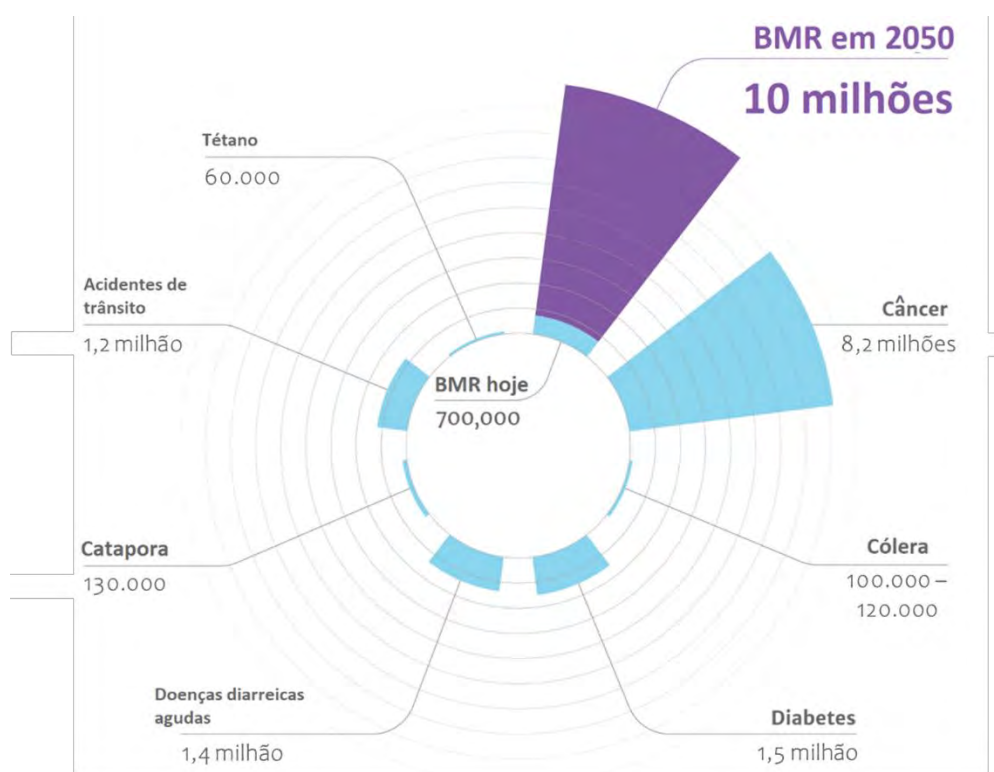


Figura 20. Estimativas do total de óbitos por causa de morte em 2016 e projeções do número de óbitos associados a BMR para o ano de 2050 (adaptado de O'NEILL, 2016).

Bactérias apresentam altas taxas de replicação celular e taxas consideráveis de erro durante este processo, que resultam no desenvolvimento de mutações que, ao serem selecionadas na presença de antibióticos, dão origem a cepas resistentes (TIPPIN et al. 2004). Os processos mais comuns que levam ao desenvolvimento de resistências estão associados a mutações nas proteínas-alvo, inativação enzimática de fármacos, desenvolvimento de proteínas de efluxo molecular, bem como a troca de material genético, com a consequente transferência da resistência entre bactérias. Há ainda a resistência a fármacos associada a estados fisiológicos específicos, como a formação de biofilmes e a manutenção da infecção em ambiente intracelular, causando redução de efetividade dos antibióticos, mesmo sobre cepas suscetíveis

(NIKAIDO, 2009). Argumenta-se que o desenvolvimento de novos antibióticos deva ser orientado por um conjunto ideal de características físico-químicas e bioquímicas, que incluem atuação como pró-fármaco, acumulação em ambiente intracelular, atuação antimicrobiana de amplo espectro, necessidade de baixas doses para se atingir efeito terapêutico desejado, capacidade de penetração em microambientes de difícil acesso, e atuação em múltiplos alvos, não correlacionados (GAJDÁCS, 2019).

O termo “ESKAPE” é a uma sigla que representa 6 espécies de bactérias especialmente preocupantes dentro do contexto de BMR: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp.* Estas espécies vêm, ao longo dos últimos anos, desenvolvendo resistência às alternativas terapêuticas disponíveis, de modo que muitos fármacos foram removidos como opções para seus tratamentos, desde então. Dentre os novos fármacos aprovados, muitos já estão associados ao desenvolvimento de resistência bacteriana, principalmente por se tratar de gerações novas de fármacos antigos, não representando efetivamente uma inovação terapêutica. A **Figura 21** mostra um quadro com os antibióticos cuja recomendação foi incluída ou removida da lista do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, EUA). A cor vermelha indica fármacos removidos; verde, novos fármacos adicionados; e amarelo, novos fármacos, mas que já apresentam casos de resistência reportados (MULANI et al., 2019).

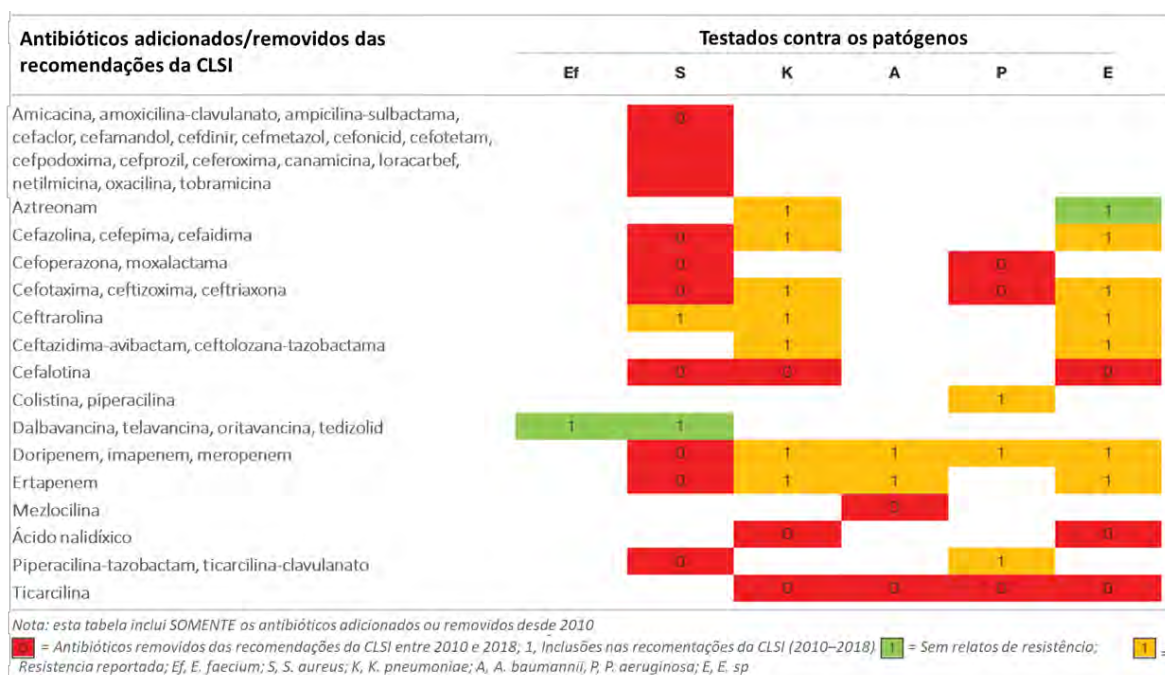


Figura 21. Fármacos adicionados e removidos pelo CLSI da lista de recomendação para o tratamento de bactérias ESKAPE (adaptado de MULANI et al., 2019).

Neste ínterim, os peptídeos e conjugados peptídeo-fármaco se apresentam como uma opção atraente de inovação terapêutica na área dos fármacos antibacterianos. Os mecanismos de ação de peptídeos de reconhecida ação bactericida, como os PACs, diferem dos mecanismos de ação dos demais antibióticos disponíveis atualmente. Ademais, peptídeos de penetração celular podem ser utilizados em conjugação com deferentes micromoléculas, visando a atuação em infecções por bactérias persistentes e suscetíveis (DESLOUCHES et al., 2020). Um dos maiores desafios no desenvolvimento de antibióticos baseados em peptídeos está na extrapolação da atividade exibida por eles *in vitro* para o modelo de infecção *in vivo*. Cadeias peptídicas, comumente, são facilmente reconhecidas por proteases e degradadas em ambiente biológico, resultando em baixos tempos de meia vida plasmática. A utilização de aminoácidos não canônicos, como aminoácidos da série *D*, ciclização de peptídeos, além de modificações nas cadeias laterais, são algumas das estratégias empregadas no sentido de se mitigar este problema (GOODWIN et al., 2012). De fato, a adição mais recente à terapêutica antibacteriana se trata de um lipopeptídeo aniônico. De cadeia cíclica, contendo resíduos de D-Asp, D-Ala e D-Ser, e modificado com grupo caproil na porção *N*-terminal, o fármaco daptomicina (**Figura 22**) é aprovado para o tratamento de bactérias gram positivas, incluindo-se BMRs. Seu mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas sabe-se que ocorre interação com componentes fosfatidilglicerol na membrana celular, com a participação de íons Ca^{+2} , para promover a sua oligomerização. Como consequência, a membrana bacteriana é desestabilizada, ocorrendo a formação de poros, e a consequentemente perda de material intracelular, resultando na morte da bactéria (JUNG et a., 2004; POGLIANO et al, 2012).

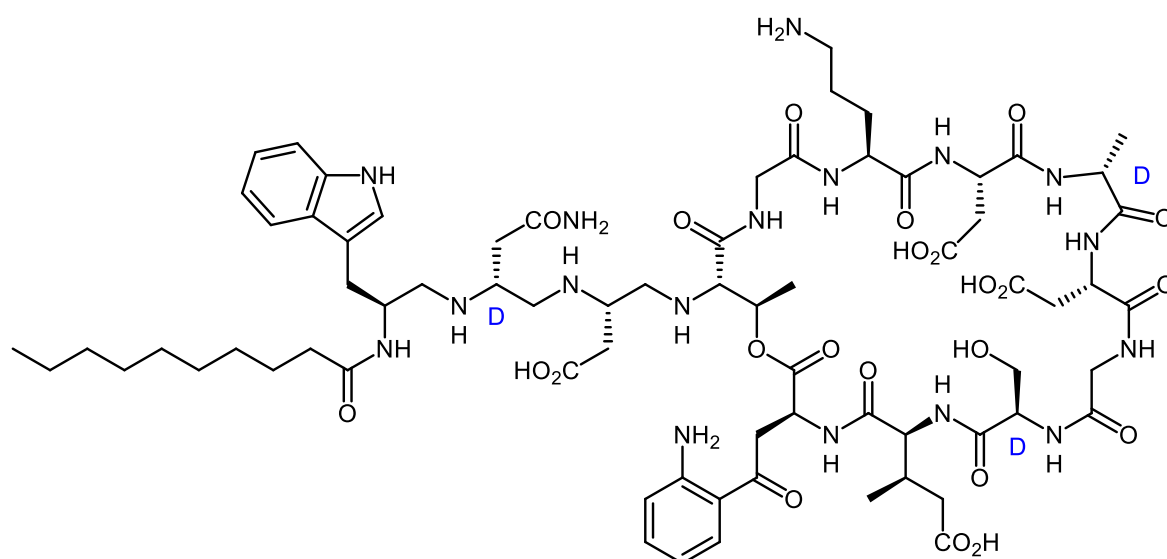


Figura 22. Estrutura da daptomicina, lipopeptídeo aprovado para o tratamento por infecções por bactérias gram-positivas, incluindo-se BMR.

1.6. Peptídeos e Doenças Tropicais Negligenciadas: o Caso da Doença de Chagas

A Organização Mundial da Saúde categoriza como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) um conjunto de 20 doenças prevalentes em países em desenvolvimento, de clima tropical, que afligem principalmente populações residentes em regiões rurais ou com pouca infraestrutura sanitária. Em comum, estas doenças compartilham o desinteresse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de terapias eficazes e seguras para seu tratamento, uma vez que representam um mercado consumidor pouco atraente, devido ao baixo poder aquisitivo da população afetada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013; MOLYNEUX et al, 2021). Dentre as DTNs figuram parasitoses cujos agentes etiológicos são protozoários da família dos tripanossomatídeos: a leishmaniose, causada por espécies do gênero *Leishmania sp.*; a doença do sono, ou tripanossomíase africana, causada pelo *Trypanosoma brucei*; e a doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causada pelo *Trypanosoma cruzi*. As três doenças possuem algumas características em comum. Os ciclos de vida dos agentes etiológicos envolvidos nessas doenças são complexos, com todos apresentando diferentes estágios de desenvolvimento e parasitando hospedeiros vertebrados e invertebrados. Estes últimos servem, nos três casos, como vetores: os mosquitos-palha (flebotomíneos) para a leishmaniose, as moscas tsé-tsé (*Glossina sp.*), para o caso da tripanossomíase africana, e os barbeiros (triatomíneos), no caso da doença de Chagas. Além do mais, diversos alvos terapêuticos e características fenotípicas são comuns, ou similares, entre estes três agentes etiológicos. Estas características permitem, muitas vezes, que os avanços nas pesquisas direcionadas a uma destas doenças tenham potencial para serem estendidos ao tratamento das demais (NUSSBAUM et al., 2010).

A doença de Chagas foi descrita pelo médico sanitário e cientista brasileiro, Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, em 1909, desde a identificação do vetor, do agente etiológico, formas de transmissão, hospedeiros e manifestações clínicas. Carlos Chagas publicou seu trabalho no primeiro volume da revista do Instituto de Manguinhos (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz) (CHAGAS, 1909). A importância e qualidade desse trabalho garantiram a ascensão do cientista na instituição, sendo promovido a Chefe de serviço, em março de 1910, além de ser reconhecido pela Academia Nacional de Medicina como Membro Titular Extranumerário, já que não se dispunha de lugares vagos naquele momento. Na solenidade de posse, Dr. Chagas proferiu a primeira conferência sobre a doença. É Patrono da Cadeira No. 86, da Secção de Ciências Aplicadas à Medicina (disponível em: <https://www.anm.org.br/carlos-justiniano-ribeiro-das-chagas>). Além da transmissão vetorial,

sabe-se hoje que o parasito pode ser também transmitido por transfusão de sangue, transplante de órgãos, por via vertical placentária, pela amamentação por e via oral, através do consumo de alimentos in natura, provenientes de regiões endêmicas, especialmente a pasta de açaí e a caldo de cana-de-açúcar, cujas preparações envolvem o risco de maceração de insetos infectados com o *T. cruzi*, junto com o alimento, mecanismo este denominado transmissão à distância (PEREIRA e NAVARRO, 2013).

Em seu ciclo natural, a infecção pelo *T. cruzi* se dá por via vetorial. Insetos triatomíneos infectados com o parasito defecam ao realizar seu repasto sanguíneo, excretando formas tripomastigotas metacíclicas, a forma infectiva do parasito. O barbeiro recebe esse nome por ter o hábito de realizar sua picada no rosto. Por ter hábito noturno, o hospedeiro se encontra, normalmente, dormindo quando o inseto se alimenta, o que faz com que instintivamente coce o local da picada, carreando as fezes contaminadas até a ferida, ou também mucosas, permitindo que o parasito ganhe a corrente sanguínea. Uma vez que formas tripomastigotas infectam uma célula, o *T. cruzi* se diferencia em amastigotas, formas replicativas intracelulares no hospedeiro vertebrado. O parasito se multiplica por fissão binária dentro da célula, até causar sua morte. Os parasitos então se diferenciam em tripomastigotas e rompem a membrana celular, sendo liberados novamente na corrente sanguínea, prontos para infectar novas células, repetindo-se o ciclo (LIDANI et al., 2019). Esse processo caracteriza a fase aguda da doença de Chagas, que se estende pelos primeiros meses após a infecção, quando se pode observar uma alta carga parasitária na corrente sanguínea do hospedeiro. A fase aguda geralmente se manifesta assintomática, ou causa sintomas moderados não específicos, como um inchaço no local da picada (chagoma), febre, dispnéia, mialgia, cefaleia, aumento dos linfonodos, e, em alguns casos, o sinal de Romaña (edema inflamatório bipalpebral unilateral) (REY, 2001; ANDRADE et al., 2014). Quando um barbeiro não infectado pelo *T. cruzi* se alimenta do sangue de um hospedeiro que se encontra na fase aguda da doença de Chagas, o triatomíneo adquire parasitos na forma tripomastigota sanguínea, que por sua vez se diferenciam em epimastigotas na porção anterior do tubo digestivo do inseto, se multiplica por fissão binária e se diferencia novamente em tripomastigotas metacíclicos, na porção posterior do tubo digestivo (BRENER E ANDRADE, 1979). O ciclo infectivo descrito é ilustrado na **Figura 23**.

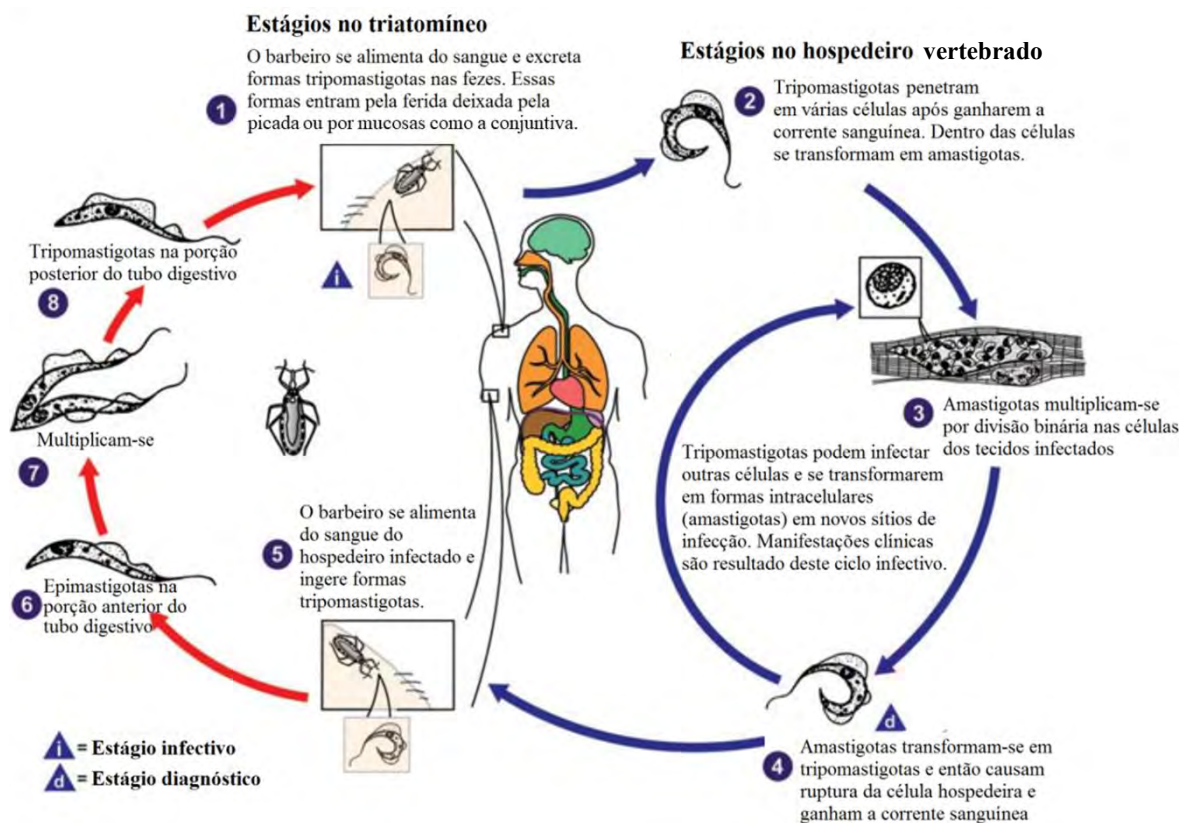
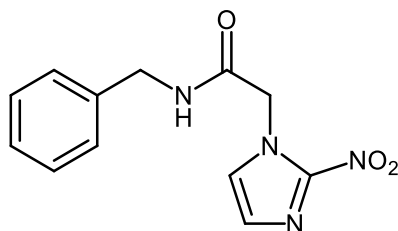


Figura 23. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares. Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html).

Após a fase aguda da doença de Chagas, a carga parasitária no sangue reduz drasticamente e a população de *T. cruzi* no hospedeiro passa a permanecer na forma amastigota (intracelular), caracterizando a fase crônica da doença. Os indivíduos infectados passam, então, por longos períodos sem manifestar sintomas. Quando a doença de Chagas na fase crônica enfim se manifesta, observam-se quadros de megacólon, megaesôfago e, mais frequentemente, cardiomegalia, ou seja, com o comprometimento de órgãos vitais do indivíduo. A doença de Chagas é endêmica em toda a América Latina continental, e estima-se que 5,7 milhões de pessoas nesta região estejam contaminadas com o *T. cruzi*, com uma taxa de contaminação de 50.000 novos casos por ano e 10.000–14.000 mortes causadas anualmente em decorrência de complicações da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; ECHEVERRÍA, 2020). Estes números, entretanto, representam uma fração de um quadro epidemiológico potencialmente mais grave. O fluxo migratório de populações a partir da América Latina para outras partes do mundo, associado com as mudanças climáticas que podem viabilizar a adaptação de vetores em áreas não endêmicas, podem ser importantes fatores de dispersão da doença de Chagas (MEDONE et al., 2015; LIDANI et al., 2019; DE SOUZA et al., 2021). As manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas podem ocorrer por muitos anos e

são consideradas graves. Mesmo que não causem a morte imediata dos pacientes, comumente causam uma importante redução na sua capacidade cardiorrespiratória, afetando sua qualidade de vida e sua capacidade de trabalho, ocasionando, conseqüentemente, um grande impacto econômico e social (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011).

Apesar de ser conhecida há 112 anos e de sua relevância, o único fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas é o derivado nitro-heterocíclico benznidazol (**Figura 24**), Além de ineficaz na fase crônica da doença, esta substância apresenta elevada toxidez aos pacientes nas doses terapêuticas utilizadas, estando associado a severos efeitos adversos. Estes incluem, como por exemplo anorexia e perda de peso, náusea e vômito, excitação nervosa, insônia, depressão psíquica, convulsões, vertigem, dores de cabeça, sonolência, perda de equilíbrio, perda de memória e intolerância hepática. (MAYA *et al*, 2007; CASTRO & DIAZ, 1988). Outro problema da administração prolongada do benznidazol deve-se ao desenvolvimento de processos mutagênicos, potencialmente ligados à tumorigênese e à carcinogênese (CASTRO *et al*, 2006). Deste modo, fica evidente a urgência no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, eficientes e seguras, para o tratamento da doença de Chagas.



Benznidazol

Figura 24. Estrutura do benznidazol, fármaco de utilidade clínica reconhecida na fase aguda da doença de Chagas.

Diversos trabalhos na literatura discutem a atividade de peptídeos, naturais ou sintéticos contra tripanossomatídeos, inclusive com revisões publicadas sobre o tema (MCGWIRE e KULKARNI, 2010; HARRINGTON, 2011; MENDEZ-SAMPERIO e DE-LA-ROSA-ARANA; 2013; LACERDA *et al.*, 2016). Destacam-se, nesse contexto, os PACs de comprimidos de cadeia curtos, menores que 30 aminoácidos, apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Sequências de aminoácidos de PACs com atividade sobre diferentes espécies e estágios de desenvolvimento de tripanossomatídeos.

Sequência	Amino-ácidos	Espécie	Estágios de desenvolvimento	Referência
FLPLWLWLWL-WLWKLK FLPLWLWLWR-KLK	16 13	<i>T. cruzi</i>	epimastigota	SOUZA et al., 2016
GIGAVLKVLT- TGLPALISWI-KRKRQQ-NH ₂	26	<i>T. cruzi</i>	epimastigota, tripomastigota e amastigota	ADADE et al., 2013
FLSLIPHAIN-AVSAIAKHF- NH ₂	19	<i>T. cruzi</i> e <i>L. infantum</i>	tripomastigota e promastigota	PINTO et al., 2013
RLRLRIGRR-NH ₂	9	<i>T. brucei</i>	tripomastigota (sanguíneo)	KITANI et al., 2009
KWCFRVCYRG-ICYRRC	16	<i>L. braziliensis</i>	promastigota	LÖFGREN et al., 2008
IIGPVLGLVGSALGGLLKKI		<i>L. donovani</i>	promastigota	MANGONI et al., 2006
KILRGVCKKI- MRTFLRRISK-DILTGKK- NH ₂	27	<i>T. cruzi</i>	tripomastigota (toxidez e infectividade)	JACOBS et al., 2003
DSHAKRHHGY- KRKFHEKHHS-HRGY	24	<i>L. donovani</i>	promastigota	GWADZ et al., 1989

O modo de ação proposto para PACs sobre tripanossomatídeos se assemelha ao discutido na **Seção 1.2** (pág. 6) para justificar a atividade antibacteriana. Os PACs são atraídos eletrostaticamente pela membrana negativamente carregada dos parasitos. A partir da interação entre as porções lipofílicas, há a desestabilização da membrana celular do parasito com consequente perda da sua permeabilidade seletiva, e a morte do parasito. Alternativamente, PACs com capacidade de penetração celular podem também alcançar alvos intracelulares nos parasitos e causar a morte por outras vias, como danos ao material genético, inibição de síntese proteica, desbalanço dos níveis intracelulares de Ca⁺² e interrupção da síntese de ATP (**Figura 25**) (MCGWIRE e KULKARNI, 2010).

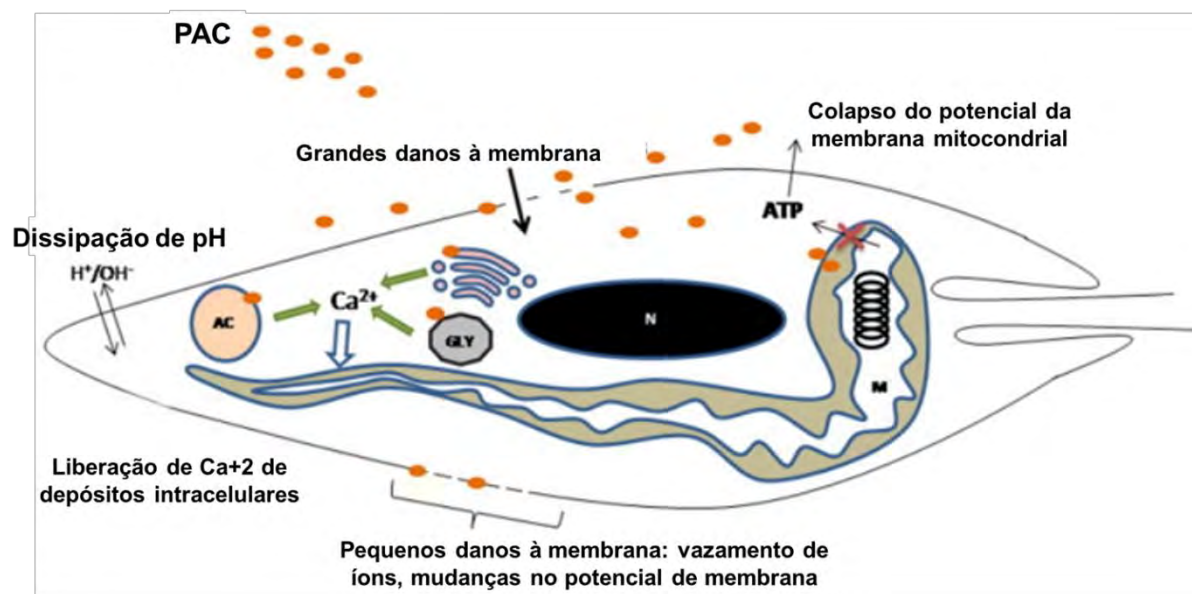


Figura 25. Propostas de mecanismos de ação de PACs sobre tripanossomatídeos (adaptado de MCGWIRE e KULKARNI, 2010).

Especificamente, em relação ao protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, este possui um complexo mecanismo de interação com o hospedeiro vertebrado e também de invasão celular. As formas tripomastigotas, presentes no sangue do hospedeiro, adquirem deste moléculas de ácido siálico, que são incorporadas à superfície celular do protozoário, através de uma enzima específica do parasita, chamada *trans*-sialidase (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000). Estima-se que cada célula de *T. cruzi* incorpore em torno de 10^7 moléculas de ácido siálico, que se ligam a mucinas, presentes na superfície da membrana do parasito. Este mecanismo resulta no recobrimento de glicoconjugados na superfície do parasito, funcionando como um manto, cuja função é evadir o sistema imune do hospedeiro, capaz de reconhecer os resíduos de mucina (FREIRE-DE-LIMA et al., 2012). Como consequência adicional, a superfície celular do parasito fica negativamente carregada, fazendo o *T. cruzi* potencialmente mais susceptível à ação de PACs (Figura 26).

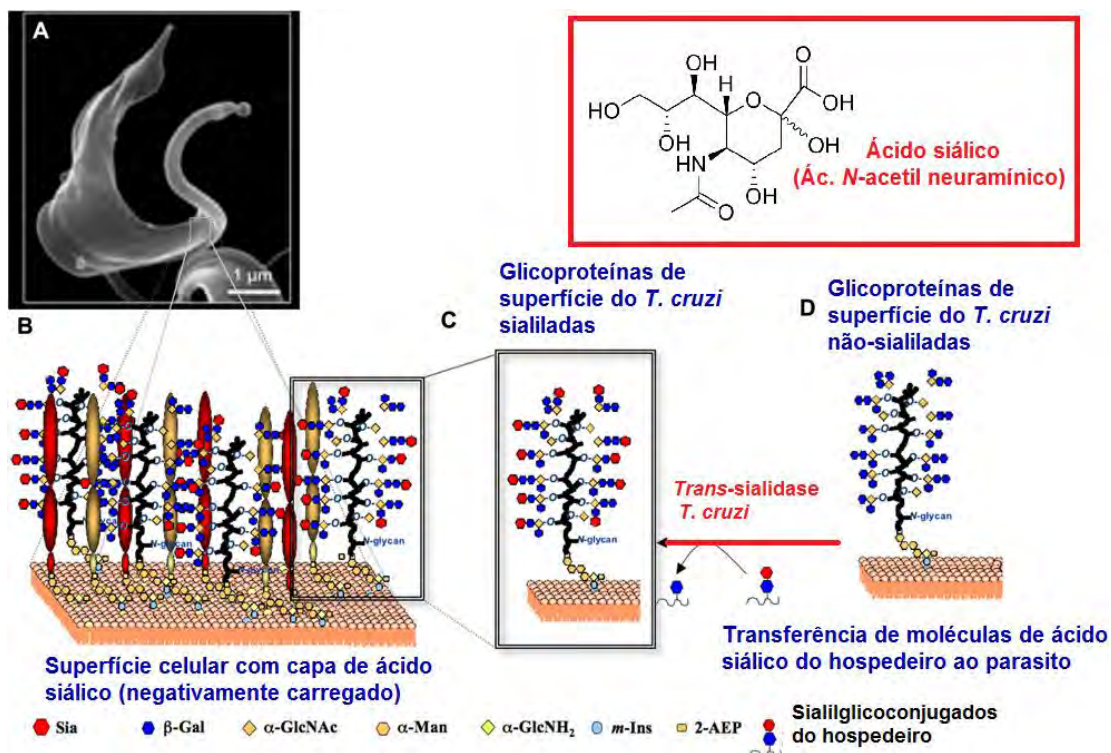


Figura 26. Mecanismo de sialização realizado pelo *T. cruzi* para evadir o sistema imune do hospedeiro, resultando em uma carga residual superficial negativa (adaptado de FREIRE-DE-LIMA et al., 2012).

1.7. Técnicas Modernas de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)

O avanço da utilização de peptídeos em pesquisa e principalmente como alternativas terapêuticas viáveis tem íntima relação com o desenvolvimento de técnicas de síntese química para sua obtenção. A complexidade dos produtos obtidos e a ocorrência de múltiplos grupos funcionais exigiram o desenvolvimento de técnicas direcionadas para a síntese de peptídeos e derivados. Neste sentido, a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi um avanço de extrema importância. Concebida pelo pesquisador americano, Dr. Robert Bruce Merrifield, e publicada pela primeira vez em 1963, o desenvolvimento da SPFS rendeu a seu idealizador o prêmio Nobel de química, em 1984 (MERRIFIELD, 1963; KAISER, 1984). A beleza e a genialidade da SPFS residem na simplicidade e praticidade do método. A cadeia peptídica é construída covalentemente ligada a uma resina polimérica funcionalizada. Os aminoácidos utilizados na síntese são ortogonalmente protegidos na porção amino e nas cadeias laterais. Ou seja, os grupos protetores utilizados nas respectivas porções podem ser seletivamente removidos conforme a conveniência da sequência sintética, com base em suas características químicas. O grupo carboxila, por sua vez, permanece disponível para acoplamento à resina, mediante o uso de estratégias de ativação. Uma vez acoplado o aminoácido, o grupo protetor da porção amino é removido, e um segundo aminoácido é acoplado, construindo-se assim uma

ligação peptídica. O processo de construção da cadeia peptídica segue, de forma sequencial e sistemática, alternando-se protocolos de acoplamento e desproteção da porção amino. A ligação covalente entre a porção C-terminal da sequência peptídica em crescimento a um suporte sólido permite que, após cada etapa reacional, reagentes em excesso e subprodutos sejam removidos por filtração e lavagem da resina. Concluída a síntese da cadeia peptídica desejada, são removidos todos os grupos protetores e a sequência é desligada da resina polimérica (DA'SAN, 2018). Um esquema ilustrativo do método de SPFS é mostrado na **Figura 27**.

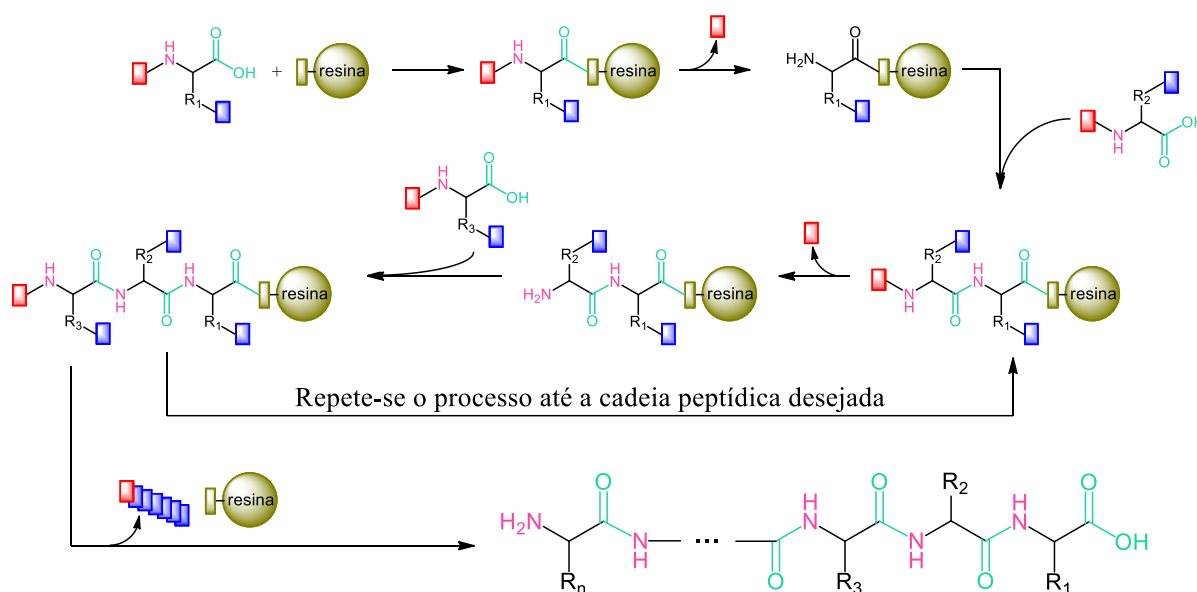


Figura 27. Esquema geral para a SPFS, idealizada por Robert B. Merrifield (1963).

A aplicação desta técnica permite a síntese rápida e eficiente de sequências peptídicas, com elevada pureza e eficiência, dadas as numerosas etapas reacionais. No entanto a SPFS não apresenta bons rendimentos para a síntese de sequências longas, observando-se quedas significativas para a síntese de cadeias maiores que 50 aminoácidos (BEHRENDT et al., 2016). O sucesso da SPFS está associado tanto à pureza dos reagentes utilizados, quanto à eficiência das reações de acoplamento e desproteção dos grupos amino da cadeia peptídica. Ao mesmo tempo visa-se minimizar a formação de subprodutos ao longo da cadeia peptídica. Outro fator interessante é que sejam empregados reagentes brandos quimicamente e de reduzida toxidez, de modo a facilitar manipulação e descarte de resíduos. Neste íterim a metodologia de síntese baseada na proteção Fmoc (**F**luorenil**m**etiloxi**c**arbonil) do grupo amino é a mais aplicada em SPFS atualmente. A remoção da proteção Fmoc é feita por tratamento com base, mais especificamente de aminas secundárias de cadeia cíclica, como piperidina, metilpiperidina, morfolina e *N*-metil-piperazina por exemplo. Os aminoácidos aplicáveis à metodologia Fmoc de SPFS são ortogonalmente protegidos em suas cadeias laterais, com grupos lábeis em meio

ácido, tipicamente removíveis por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA), e estáveis às condições reacionais de acoplamento, formação da ligação amídica, e desproteção do *N*-terminal. Uma proposta mecanística para a desproteção Fmoc é mostrada na **Figura 28** (BEHRENDT et al., 2016).

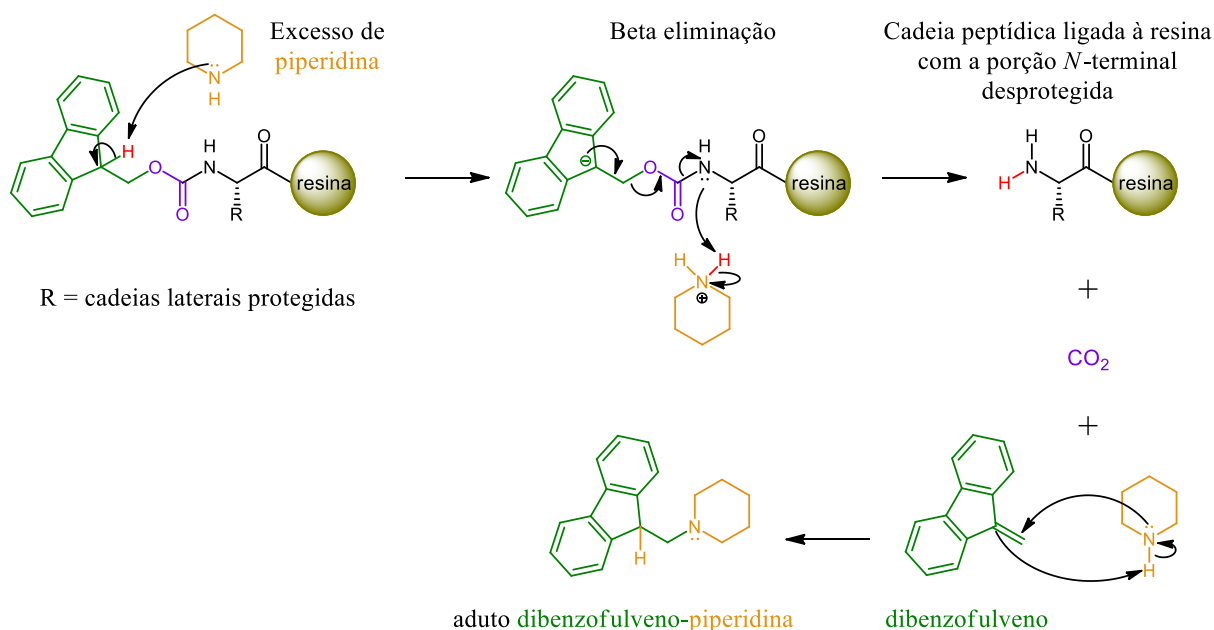


Figura 28. Proposta mecanística para a desproteção Fmoc do *N*-terminal da cadeia peptídica covalentemente ligada à resina polimérica.

A construção das ligações peptídicas se dá mediante utilização de reagentes ativadores da carboxila, que permitem a formação de amidas à temperatura ambiente, condições brandas de acidez/basicidade e em reduzidos tempos reacionais. Algumas dentre as inúmeras opções de reagentes para este fim são mostradas na **Figura 29**. Carbodiimidas, como a diisopropilcarbodiimida (DIC) foram, por muitos anos, os reagentes de primeira escolha para a ativação de ácidos carboxílicos, mas vem caindo em desuso para aplicação em SPFS, uma vez que geram subprodutos pouco solúveis, que dificultam sua remoção por filtração. Ésteres ativados, formados a partir de *N*-hidróxidos como HOBt e HOSu, são interessantes, uma vez que são estáveis o suficiente para serem isolados e comercializados, ao mesmo tempo que reagem espontaneamente com aminas primárias e secundárias. Sais de amínio e urônio, como HATU e COMU, são hoje os reagentes de ativação mais utilizados para a SPFS, devido às suas versatilidade e simplicidade metodológica para a ativação de ácidos carboxílicos, ao mesmo tempo que geram subprodutos solúveis, facilmente removíveis por filtração (DA'SAN, 2018).

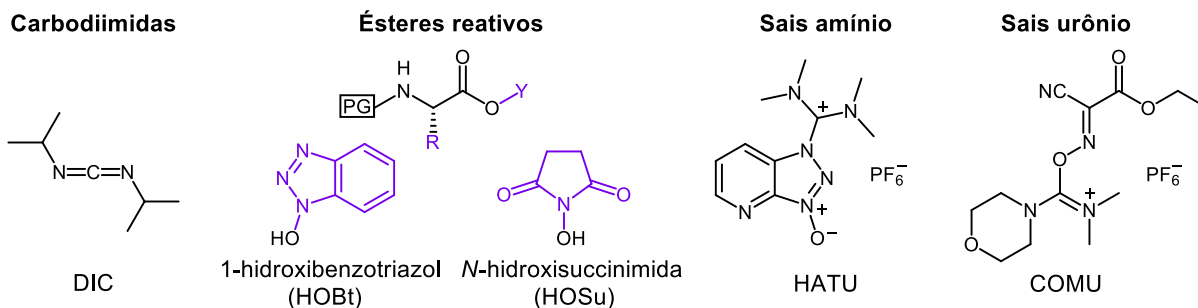


Figura 29. Exemplos de reagente de acoplamento aplicáveis à SPFS.

Em todos os casos, a ativação se dá pela substituição da hidroxila do ácido carboxílico por um grupo ativador, que atua, simultaneamente, aumentando a eletrofilicidade do carbono acílico e se comportando como um bom grupo abandonador. Uma proposta mecanística para a ativação, seguida de substituição nucleofílica em carbono acílico com o amino-terminal da cadeia peptídica em SPFS, é mostrada na **Figura 30**, utilizando o reagente HBTU e diisopropiletilamina (DIPEA) como exemplo (DA'SAN, 2018).

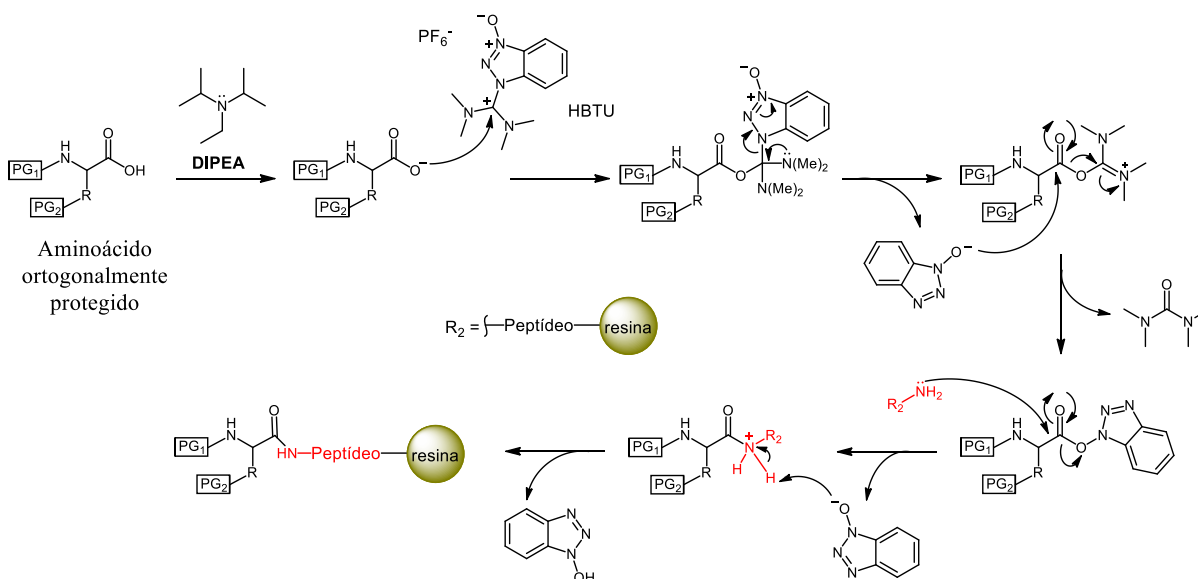


Figura 30. Proposta mecanística para reação de acoplamento mediada pelo reagente ativador de carboxila HBTU em presença de DIPEA.

As resinas aplicáveis à SPFS possuem, também, características especiais. Ainda hoje a resina de Merrifield, com cadeia de poliestireno funcionalizada com unidades de 4-cloroestireno e reticulada com divinilbenzeno, é uma das bases poliméricas mais utilizadas (**Figura 31. A**). As cadeias cruzadas garantem que a resina se mantenha insolúvel em uma gama variada de solventes orgânicos. Ao mesmo tempo permite que a ela inche e contraia ao ser encharcada com solventes de diferentes perfis de polaridade e lipofilicidade. Quando em meios de características apolares, a cadeia lipofílica da resina interage melhor com o solvente e se incha,

causando um efeito denominado *swelling*, aumentando de tamanho. Assim os reagentes em solução podem permear a resina com mais facilidade, acessando os sítios ativos presentes nas porções mais internas da resina (**Figura 31. B**). Solventes mais polares repelem a cadeia apolar da resina, fazendo com que ela se contraia, expulsando reagentes em excesso e subprodutos formados nas etapas de acoplamento ou desproteção (**Figura 31. C**). Cabe frisar que o crescimento da cadeia peptídica, ligada covalentemente à resina, muda sua característica de polaridade (**Figura 31. D**), de modo que o fator de *swelling*, associado a diferentes solventes (**Figura 31. E**), varia ao longo de todo o processo sintético (PALOMO, 2014; FORNS e ALBERICIO, 2001).

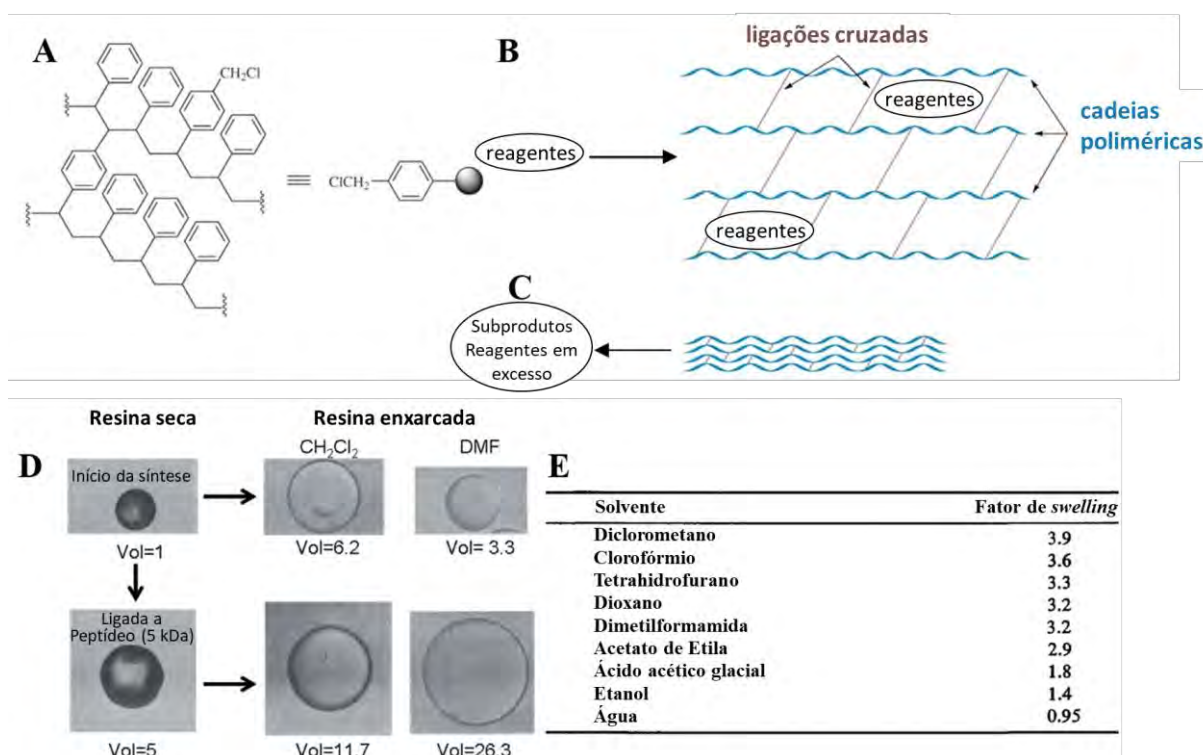
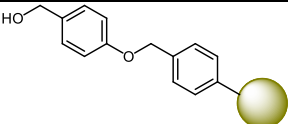
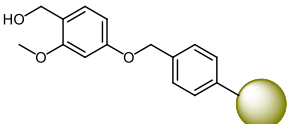
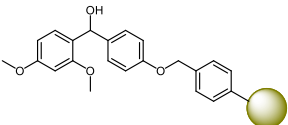
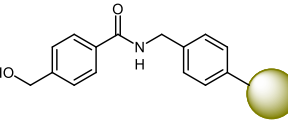
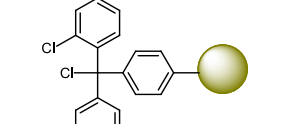
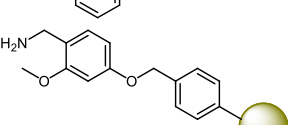
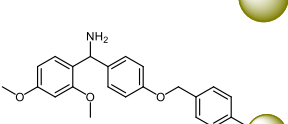
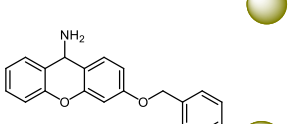
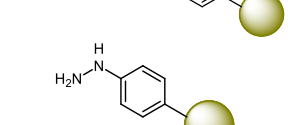


Figura 31. Resinas poliméricas com cadeia cruzada e efeito de *swelling* em SPFS.

Atualmente, existem diversas alternativas de resinas funcionalizadas adequadas à SPFS. Na **Tabela 4** são destacados alguns grupos funcionais adequados à metodologia Fmoc. O grupo funcional, em cada caso, funciona como um ponto de ancoramento, onde a cadeia peptídica irá se manter covalentemente ligada pelo C-terminal durante todo o processo de SPFS. Em todos os casos, a cadeia peptídica é desligada da resina por tratamento em meio ácido contendo TFA, o que, na maioria dos casos, já promove, simultaneamente, a desproteção das cadeias laterais. Algumas resinas, como a 2-clorotritil, permitem que o desligamento ocorra sem a desproteção das cadeias laterais do aminoácido, mediante tratamento com 2% TFA em DCM. Outra

característica importante das resinas funcionalizadas é que elas permitem síntese de peptídeos com modificações no *C*-terminal, aumentando a versatilidade do método (DA'SAN, 2018).

Tabela 4. Exemplos de conectores utilizados em resinas adequadas à metodologia Fmoc de SPFS (adaptado de DA'SAN, 2018).

Nome da resina	Estrutura	Tipo de resina	Tipo de ancoramento	C-terminal ao final da síntese
Wang		Hidróxi	Éster	Carboxila
SASRIN		Hidróxi	Éster	Carboxila
Rink ácido		Hidróxi	Éster	Carboxila
HMBA		Hidróxi	Éster	Carboxila, hidrazida, amida, éster ou álcool
2-clorotritil		Eletrofílica	Éster	Carboxila
SASRIN-NH ₂		Benzilamina	Amida	Amida
Rink amida		Benzihidrilamina	Amida	Amida
Sieber		Xantenilamina	Amida	Amida
Fenilhidrazina		Hidrazina	Hidrazida	Carboxila, amida, éster ou tioéster

Os aminoácidos ortogonalmente protegidos, adequados à metodologia Fmoc de SPFS, são protegidos em suas cadeias laterais com grupos lábeis em meio ácido e estáveis sob as condições básicas das reações de acoplamento e desproteção Fmoc. Existem diversos grupos que são comumente empregados para a proteção das cadeias laterais, adequados às variadas funcionalidades presentes. Os grupos protetores mais comumente utilizados, bem como os

aminoácidos tipicamente protegidos, são mostrados na **Figura 32**. A desproteção em meio ácido de TFA gera espécies catiônicas reativas, que podem reagir com outras porções do peptídeo desprotegido, gerando subprodutos peptídicos estáveis e reduzindo o rendimento da reação. Daí a necessidade da utilização de reagentes sequestradores de cátions na etapa de desproteção das cadeias laterais. Estes sequestradores são espécies nucleofílicas, capazes de reagir com as espécies catiônicas transientes formadas no meio, como água, álcoois, silanos, tióis, entre outros, levando à formação de subprodutos não-peptídicos estáveis removíveis por precipitação do peptídeo em éter etílico. Existem ainda outros grupos protetores estáveis, tanto em meio básico quanto em meio ácido, que inserem um terceiro eixo de ortogonalidade e possibilitam a modificação seletiva das cadeias laterais na sequência peptídica. Há ainda os chamados grupos protetores semi-ortogonais, grupos removíveis em condições especiais de acidez ou basicidade, que também possibilitam a modificação da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos de forma seletiva (ISIDRO-LLOBET et al., 2009).

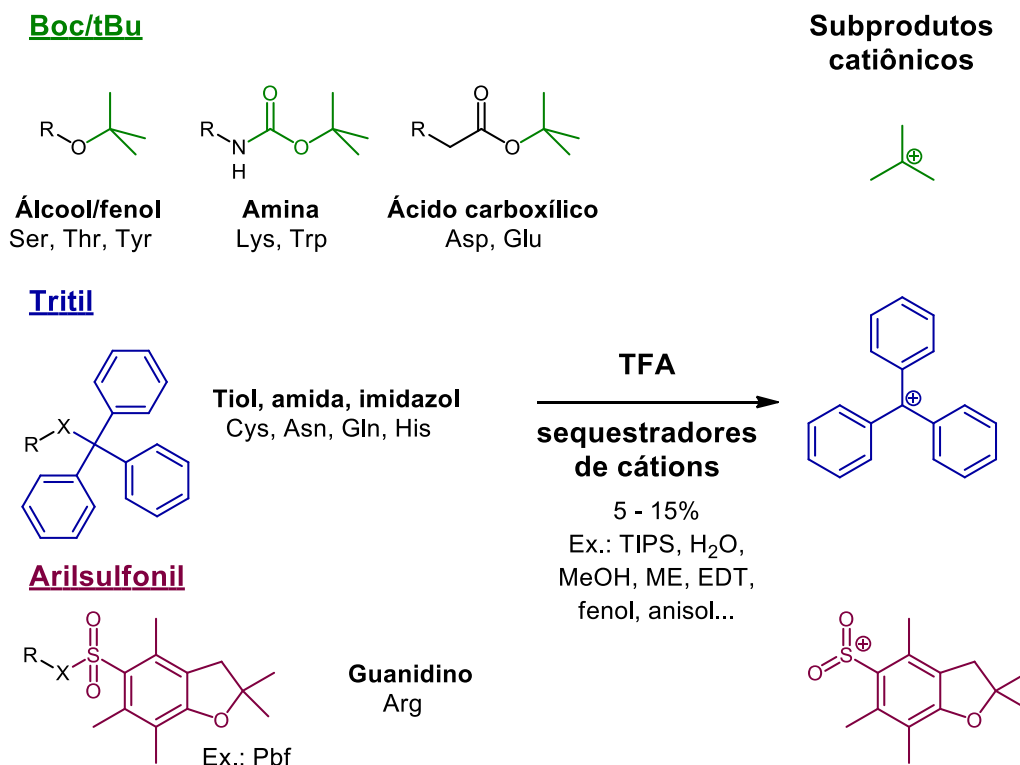


Figura 32. Grupos protetores mais comumente utilizados na proteção de cadeias laterais de aminoácidos para a SPFS pela metodologia Fmoc.

As técnicas de SPFS vem sendo aprimoradas, tanto para a aplicação em escala laboratorial, com o desenvolvimento de sistemas automatizados para a síntese de peptídeos (WINKLER, 2020), quanto em escala industrial, com investimentos em sistemas de síntese em fluxo contínuo, técnicas de ativação mais eficientes e a utilização de solventes ambientalmente

mais amigáveis (HARTRAMPF et al., 2020; MARTIN et al., 2020). A necessidade de excesso de reagentes durante as etapas reacionais e a utilização de solventes tóxico ainda são pontos que limitam uma utilização mais ampla da SPFS em escala industrial. No entanto, diversos peptídeos de aplicação terapêuticas são produzidos industrialmente pela técnica de SPFS ou pela combinação de SPFS com técnicas de síntese convencional (C) em solução, como mostrado na **Tabela 5** (BRAY, 2003).

Tabela 5. Exemplos de peptídeos produzidos em escala industrial por SPFS ou por técnicas convencionais (C) em solução (adaptado de BRAY, 2003).

Peptídeo	Comprimento	Método de Produção
Hormônio adrenocorticotrópico (1–24)	24	C
Bivalirudina	20	C
Fator de liberação do hormônio do crescimento	29	SPFS
Integrelina	7	C
Oxitocina	9	C
Enfuvirtida	36	C, SPFS
Atosiban (antagonista de oxitocina)	9	C
Timopentina (TP-5)	5	C
Timosina α -1	28	SPFS
Hormônio liberador de tirotropina	3	C
<i>Análogos de vasopressina</i>		
Desmopressina	9	C, SPFS
Felipressina	9	C
Glipressina	12	C
Lipressina	9	C
Pitressina	9	C
<i>Fatores de liberação de corticotropina</i>		
Humana	41	SPFS
Ovelha	41	SPFS
<i>Inibidores de enzima conversora de angiotensina</i>		
Enalapril, Lisinopril	2	C
Somatostatina e análogos		
Somatostatina e análogos	14	C, SPFS
Octreotida	8	C
Lanreotida	8	SPFS
Hormônio liberador de hormônio luteinizante	10	C, SPFS
<i>Agonistas e antagonistas de LHRH</i>		
Leuprolida	9	C, SPFS
Goserelina	10	C
Triptorelina	10	C
Buserelina	9	C
Nafarelina	10	C
Cetrorrelix	10	SPFS
Ganirrelix	10	C
<i>Calcitoninas</i>		
Humana	32	C
Salmão	32	C, SPFS
Enguia	32	C, SPFS
Dicarba-Enguia (elcatonin)	31	C, SPFS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho incluem o planejamento, a síntese, e a avaliação biológica de peptídeos anfifílicos catiônicos (PACs) com potencial atividade antimicrobiana e de penetração celular, bem como de conjugados peptídeo-fármaco. O planejamento estrutural visa a orientar a organização molecular em nível de estrutura secundária, pela escolha da sequência peptídica, visando uma homogeneidade na distribuição dos aminoácidos quanto à sua natureza química. Objetivam-se ainda os estudos de atividade dos compostos planejados, incluindo perfil de liberação de fármaco a partir de conjugados, citotoxicidade e perfil de penetração celular, atividade antibacteriana e atividade anti-*T. cruzi*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Planejamento de peptídeos anfifílicos catiônicos com potencial atividade antimicrobiana e de penetração celular

A atividade antimicrobiana de peptídeos anfifílicos catiônicos está associada com o grau de organização das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura quanto à sua natureza química. De modo que a ocorrência, em nível molecular, de regiões ao longo da cadeia com caráter bem definido, catiônico ou hidrofóbico, favorece a atividade antimicrobiana (LEI et al., 2019). Desta forma nosso planejamento inclui a síntese de peptídeos baseados em aminoácidos naturais com padrões de repetição de aminoácidos catiônicos (C) ou lipofílicos (L) sequências do tipo $[CCLL]_n$, para favorecer a formação de alfa-hélices, ou do tipo $[CLCL]_n$, para favorecer a formação de folhas-beta. A nossa proposta é que haja uma orientação com base na interação não covalente entre as cadeias laterais, favorecida pela sequência de aminoácidos. Nossos objetivos incluem ainda a descrição da relação entre o comprimento da cadeia peptídica e o perfil de atividade biológica, de modo que foram incluídos peptídeos com $n = 1, 2, 3, 4$ repetições dos padrões $[CCLL]_n$ ou $[CLCL]_n$. Visando-se conferir a habilidade de penetração celular aos peptídeos, estabelecemos a inserção de resíduos de arginina como aminoácido de caráter catiônico, uma vez que sequências ricas em Arg têm sua atividade de penetração celular descrita na literatura (XIE et al., 2020). Para a porção hidrofóbica dos peptídeos nós selecionamos os aminoácidos leucina e triptofano, devido tanto à sua ocorrência na estrutura de

peptídeos de atividade antimicrobiana, quanto ao seu alto volume molecular (CHAN et al., 2006; MA et al., 2013). Além do mais, deseja-se saber se há influência da natureza hidrofóbica, alifática ou aromática, na atividade biológica. Sendo assim foram propostas 3 séries de peptídeos seguindo-se os seguintes padrões estruturais: **P₁** – AcYG(RRLL)_n-NH₂, **P₂** – AcYG(RLRL)_n-NH₂, **P₃** – AcYG(RRWW)_n-NH₂. O aminoácido tirosina foi inserido na porção *N*-terminal de peptídeos das séries **P₁** e **P₂**, com o objetivo de incluir um grupo cromofórico quantificável por absorção no UV (280 nm) (AITKEN e LEARMONTH, 2009). As modificações acetilação no *N*-terminal e amida no *C*-terminal visam a conferir maior estabilidade química e metabólica aos peptídeos (ALSINA e ALBERICIO, 2003; AKSNES et al., 2015). As estruturas gerais dos PACs planejados para este trabalho são apresentadas na **Figura 33**.

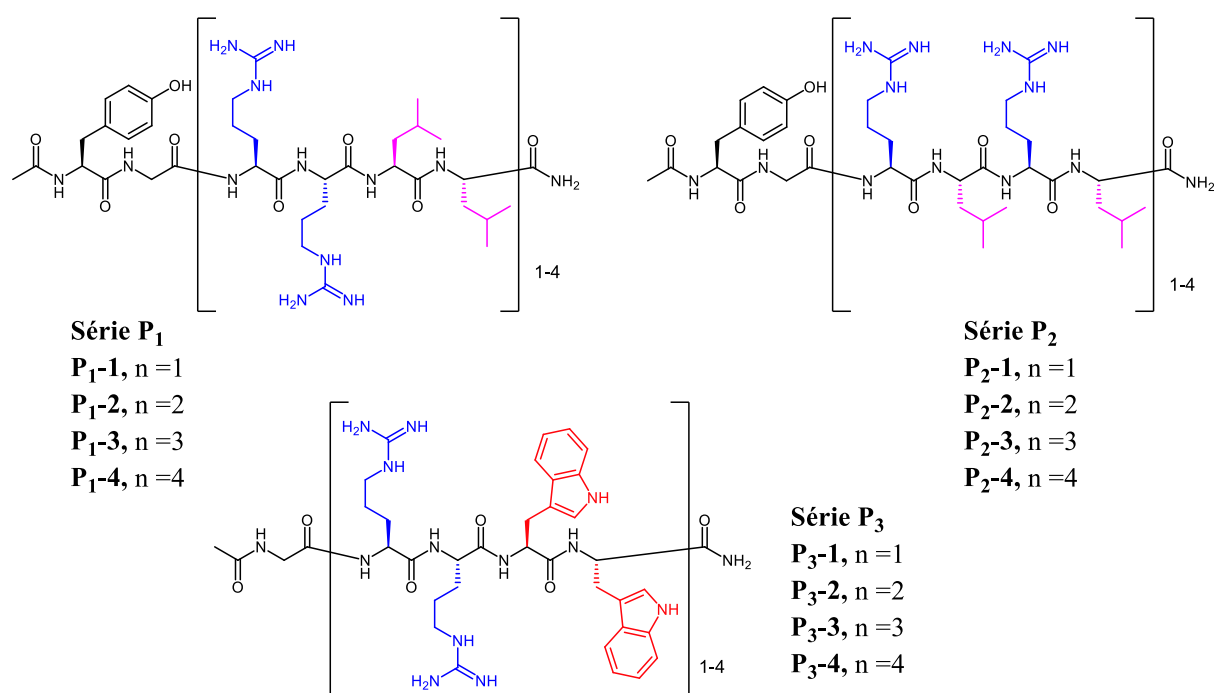


Figura 33. Estrutura geral dos PACs das séries **P₁**, **P₂** e **P₃**, evidenciando o padrão de repetição de resíduos de aminoácidos em nível de estrutura primária.

Foram construídos modelos tridimensionais representativos das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** no programa Spartan 14 (Wavefunction, Inc), para uma melhor visualização dos padrões moleculares propostos. As estruturas secundárias estão identificadas na forma de fitas com os seguintes padrões de cores: arginina, ciano; leucina, vermelho-vinho; triptofano, rosa; glicina, azul; tirosina, laranja. Os modelos 3D gerados são mostrados na **Figura 34**.

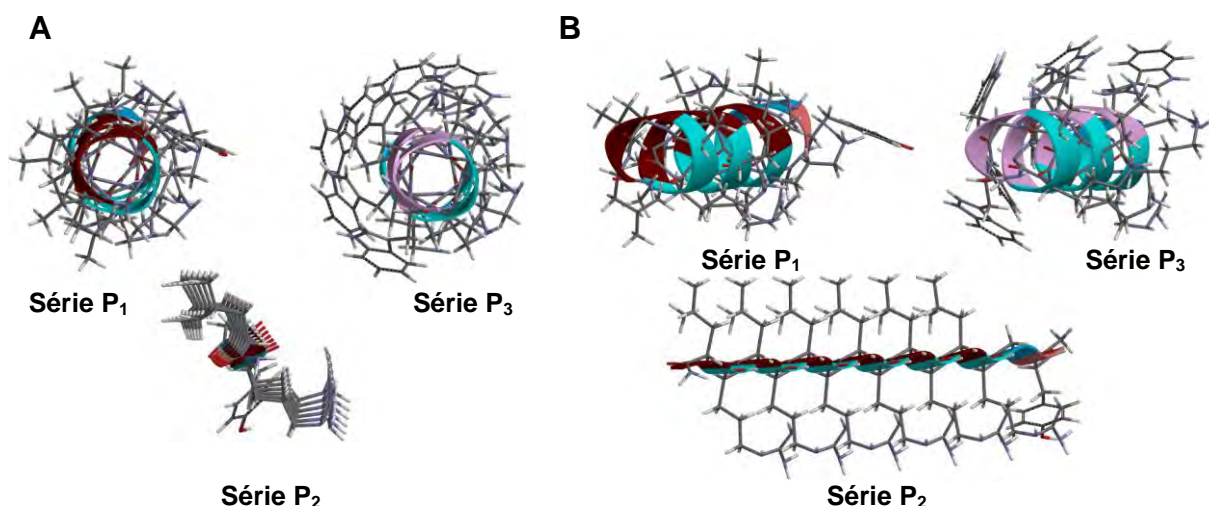


Figura 34. Visualização em modelos 3D (preparados pelo autor no programa Spartan 14) para estruturas representativas das cadeias peptídicas das séries **P₁** (alfa-hélice), **P₂** (folha-beta) e **P₃** (alfa-hélice), evidenciando a ordenação das cadeias laterais dos aminoácidos em vista **A**) frontal e **B**) em perspectiva.

2.2.2. Planejamento de conjugados peptídeo-fármaco

Para utilizar o potencial de peptídeos de penetração celular (PPCs) foram planejados conjugados peptídeo-fármaco com o objetivo de alcançar patógenos localizados no ambiente intracelular. Os fármacos linezolidina e benznidazol foram selecionados para construção dos conjugados peptídeo-fármaco, ambos possuindo um grupo funcional amida secundária em sua estrutura (**Figura 35. A**). Linezolidina é um antibiótico aplicado ao tratamento de infecções por bactérias gram-positivas (AGER e GOULD, 2012). Sua conjugação com PPCs apresenta potencial para o tratamento de infecções persistentes no trato respiratório, caracterizadas pela ocorrência de patógenos *gram*-positivos em compartimentos intracelulares (RICE, 2006). Já o benznidazol é o único fármaco aprovado para o tratamento da doença de Chagas que, no entanto, apresenta baixa eficácia para o tratamento de pacientes na fase crônica da doença, caracterizada pela ocorrência de ninhos de amastigotas intracelulares, presentes no interior de tecidos e órgãos. Para tanto, nosso objetivo foi a construção de conjugados peptídeo-fármaco, unidos por uma cadeia espaçadora autoimolativa no ambiente intracelular, conectada à porção amida do fármaco, via ligação imida (**Figura 35.B**). Foi selecionado o grupo 4,4'-ditiodibutiril (**DTBA**) para atuar como espaçador autoimolativo, devido à maior possibilidade de degradação da ligação dissulfeto no meio intracelular, explorando a maior ocorrência de enzimas redutases neste microambiente (DENG et al, 2020).

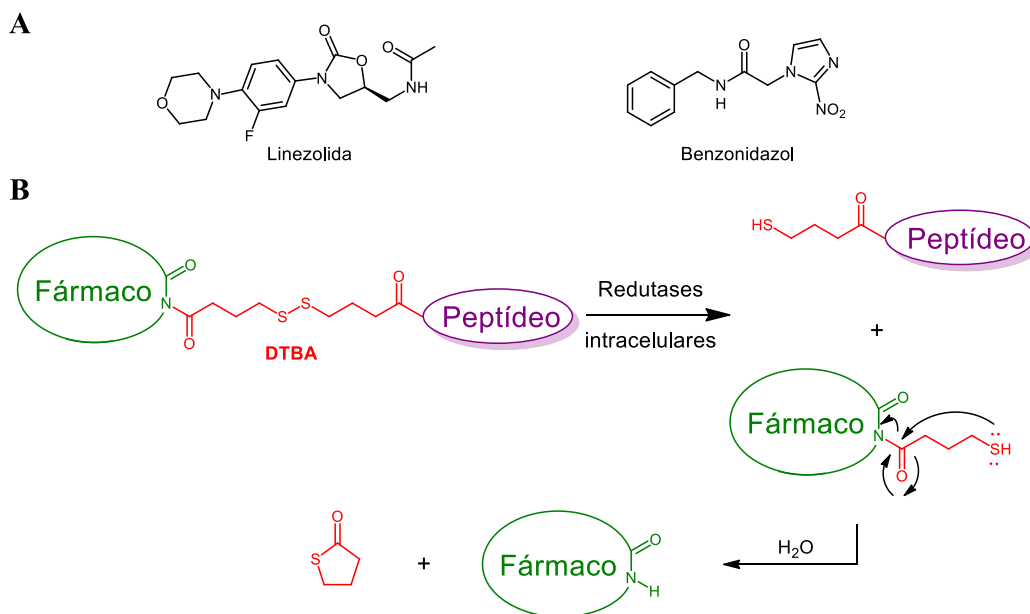


Figura 35. Estratégia de conjugação peptídeo-fármaco, utilizando espaçador contendo ligação dissulfeto redutível no ambiente intracelular e com potencial de liberação do fármaco na sua forma original, a partir de ataque intramolecular.

O planejamento inclui também a construção de conjugados com o fármaco benznidazol, modificado para conter um grupo carboxila no carbono benzílico. Esta alternativa é interessante, principalmente devido à sua maior acessibilidade sintética, uma vez que prevê a conjugação com a porção *N*-terminal do peptídeo, via ligação amida. A inclusão de um grupo carboxila no carbono benzílico na estrutura do benznidazol implica na ocorrência do fenômeno de quiralidade neste átomo de carbono, característica ausente na estrutura original do fármaco. Desta forma, nosso planejamento inclui a síntese do conjugado peptídeo-fármaco com controle da estereoquímica do grupo carboxila no carbono benzílico da estrutura do benznidazol (**Figura 36**), visando-se estudar a influência deste parâmetro na atividade biológica.

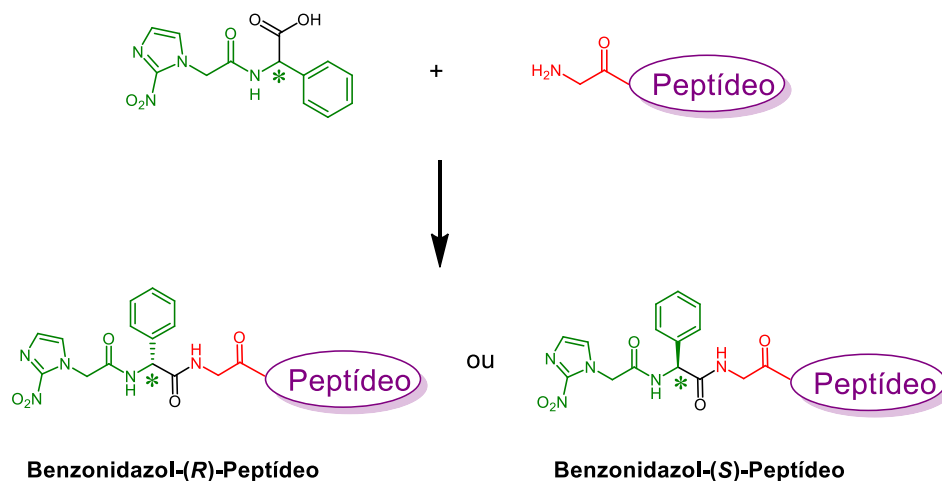


Figura 36. Estratégia de conjugação peptídeo-fármaco, envolvendo o benzimidazol modificado com grupo carboxila, e com controle da estereoquímica do carbono benzílico.

Além dos peptídeos com potencial de penetração celular, cujo planejamento fora apresentado na **Seção 2.2.1**, o planejamento inclui a conjugação entre fármacos e hélices poliprolina anfífilas, a partir da modificação no *N*-terminal da cadeia de **P14LRR** (**Figura 37.A**). Hélices poliprolina são mais rígidas, devido à menor liberdade conformacional ao redor do aminoácido cíclico prolina. Uma característica intrínseca a hélices poliprolina tipo II, como **P14LRR**, é a ocorrência de 3 resíduos aminoácidos a cada volta da hélice, de modo que as cadeias laterais se sobrepõem, formando ângulos de aproximadamente 120°, como mostrado na **Figura 37. B e C**. Desta forma é possível se obter estruturas peptídicas com caráter hidrofóbico ou catiônico bem definido ao longo de sua cadeia (FILLON et al., 2005).

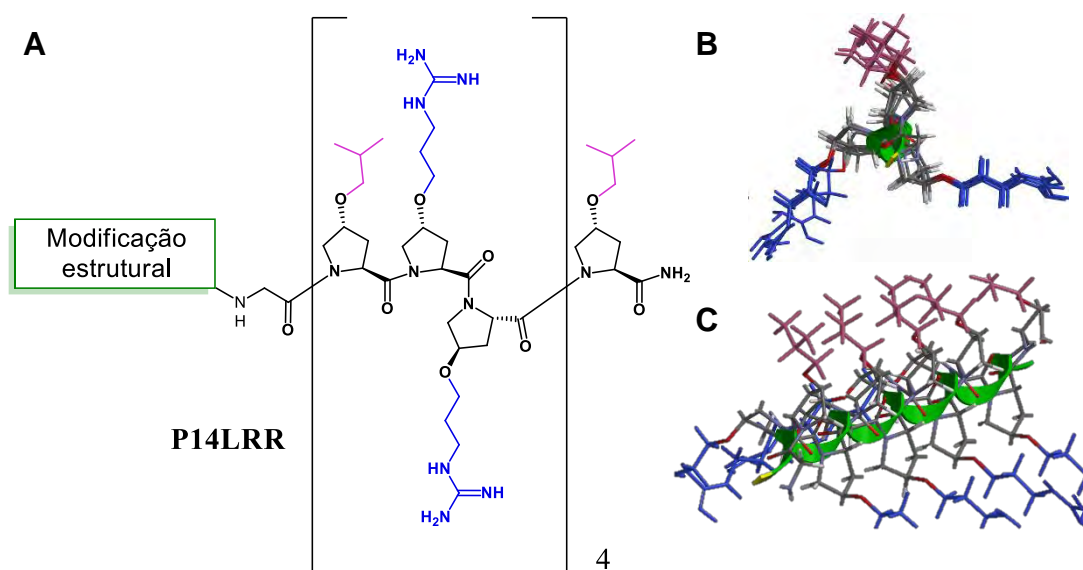


Figura 37. A. Estratégia de conjugação com hélices poliprolina **P14LRR**, via *N*-terminal. Visão frontal (**B**) e em perspectiva (**C**) de modelos tridimensionais da estrutura de **P14LRR**, evidenciando as cadeias laterais catiônicas (azul) e hidrofóbicas (rosa).

2.2.3. Síntese de peptídeos, conjugados e intermediários

Preparação de peptídeos e conjugados peptídeo-fármaco via metodologia SPFS (TULLA-PUCHE et al. 2015).

Síntese de intermediários adequados à SPFS não disponíveis comercialmente, a partir de adaptações de metodologias de síntese orgânica clássica disponíveis na literatura.

2.2.4. Caracterização e análise química de peptídeos, conjugados e intermediários

Peptídeos e conjugados, sintetizados via SPFS, são tipicamente caracterizados por espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência. Já os intermediários obtidos através de técnicas clássicas de síntese orgânica são caracterizados pelas técnicas usuais de espectroscopia por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) e espectrometria de massas.

Adicionalmente, foi prevista a caracterização por espectroscopia de dicroísmo circular dos PACs das séries **P₁**, **P₂** e **P₃**, em solução, para melhor se compreender seu comportamento em nível de estrutura secundária.

Para conjugados peptídeo-fármaco, obtidos via conexão imida-DTBA, foram planejados ainda a realização de experimento de redução induzida quimicamente, para se avaliar o perfil cinético de liberação de fármacos a partir da quebra da ligação dissulfeto.

2.2.5. Avaliação biológica de toxidez e capacidade de penetração em células de mamíferos

Por se tratar de peptídeos e conjugados, planejados com fins terapêuticos, os objetivos deste trabalho incluem a avaliação citotóxica em células de mamíferos.

Para se avaliar a capacidade de penetração celular em células de mamíferos, planejou-se o emprego de peptídeos e conjugados marcados com sondas fluorescentes, de modo a permitir a utilização de técnicas quantitativas e qualitativas de análise em nível celular.

2.2.6. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação antibacteriana *in vitro*, planejada para este trabalho, visa a fornecer informações preliminares quanto ao perfil de atividade de inibição sobre bactérias bem como indicativos quanto a possíveis mecanismos de ação.

2.2.7. Avaliação da atividade contra o *T. cruzi*

Para se conhecer o perfil de atividade frente ao *T. cruzi*, foram planejados experimentos para se avaliar a atividade frente a diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, incluindo amastigotas intracelulares e tripomastigotas, avaliando-se também tanto a toxidez direta sobre as formas infectivas, quanto a inibição de seu perfil de infectividade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Métodos Reagentes, Instrumentos e Análises: Parte Química

Os reagentes Cbz-Hyp-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Phg-OH, Fmoc-D-Phg-OH, e reagente de acoplamento HATU foram adquiridos da Chem Impex (Wood Dale, IL, EUA), ou Ana Spec, Inc. (Fremont, CA, EUA). A resina funcionalizada ChemMatrix H-Rink Amida, para SPFS, foi adquirida da PCAS Biomatrix Inc. (Quebec, Canadá). Todos os demais reagentes utilizados para a síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Solventes foram adquiridos da ThermoFisher Sci e utilizados sem tratamento adicional, exceto nas situações indicadas. O monitoramento das reações por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado em placas de vidro revestidas por sílica-gel (0,25 mm de espessura), contendo fluoresceína. Os analitos foram visualizados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), ou pela utilização de reveladores químicos, conforme indicado em cada caso. Purificações por cromatografia em coluna aberta (CCA) foram realizadas utilizando sílica-gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária. Soluções tampão, utilizadas nos experimentos, foram preparadas imediatamente antes do uso.

Os espectros de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) foram adquiridos em equipamento Bruker AC 400 MHz, as amostras preparadas em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) e os valores corrigidos em relação ao sinal do solvente CHCl_3 (7,26 ppm para ^1H) ou CDCl_3 (77,00 ppm para ^{13}C). As constantes de acoplamento foram reportadas em hertz (Hz). A multiplicidade dos sinais foi expressa como simpleto (s), sinal largo (sl), duplete (d), duplo-duplete (dd), tripleto (t), duplo tripleto (dt), quarteto (q) e multiplete (m).

Processos de purificação e análise por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa (CLAE-FR), foram realizadas em um equipamento Waters Delta Prep 4000 HPLC, com fase móvel composta por: A = acetonitrila + 0,1% TFA; B = água + 0,1% TFA. Experimentos monitorados por cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-EM), foram realizados em um equipamento Waters UPLC-MS. Espectrometria de massas de ionização por dessorção a laser, assistida por matriz e detecção por tempo de voo (MALDI-ToF), foi realizada em equipamento Voyager DE Mass Spectrometer (Applied Biosystems). Espectros de dicroísmo circular foram adquiridos em um espectropolarímetro

Jasco CD J-1500. Medidas de absorvância de soluções no UV-Vis foram realizadas em equipamento Jasco J-1700.

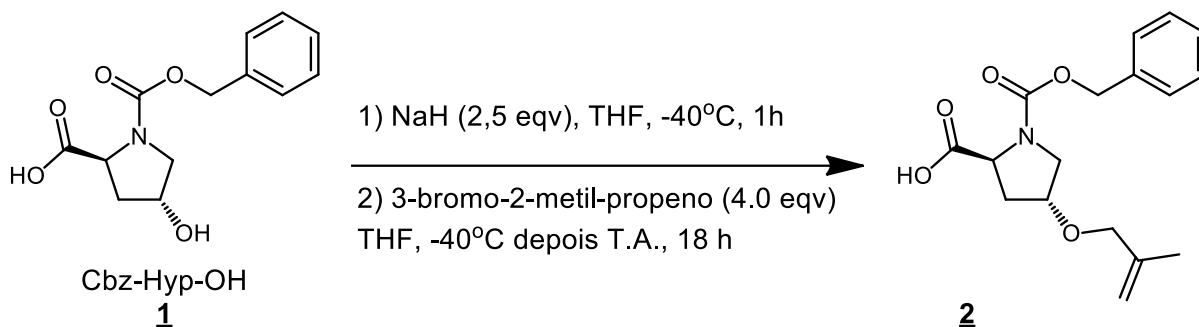
3.2. Protocolos de Síntese do Aminoácido Protegido Fmoc-P_L-OH (**3**)

A síntese do aminoácido protegido Fmoc-P_L foi feita conforme protocolo previamente descrito (FILLON et al., 2005), em duas etapas reacionais, cujo rendimento global foi de 65%.

3.2.1. *O*-alquenação de Cbz-Hyp-OH

Este protocolo demandou a utilização de vidrarias e solventes anidros e foi realizado sob atmosfera de N₂ seco, sob pressão positiva. Em um balão de fundo redondo, de 250 mL de capacidade, contendo peneira molecular (3 Å) e barra de agitação magnética, foram adicionados 1,05 g de NaH (60% m/m, 3,5 eqv) em 40 mL de THF, mantidos sob agitação a -40°C (banho de ACN e gelo seco). Em paralelo, em um balão de fundo redondo, de 100 mL de capacidade, foram solubilizados 2,0 g (1,0 eqv) de (*L*)-*N*-carboxibenzil-4-hidroxiprolina (Cbz-Hyp, **1**) em 20 mL de THF anidro. Em seguida, a solução contendo Cbz-Hyp foi transferida para a suspensão contendo NaH, lentamente, com auxílio de uma cânula, ao longo de 5 minutos. Após 1 h, sob agitação a -40°C, foram adicionados 3,1 mL (4,0 eqv) de 3-bromo-2-metil-propeno, utilizando-se uma seringa de vidro. Permitiu-se a reação alcançar a temperatura ambiente naturalmente, sendo a mesma mantida sob agitação por 18 h. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, em fase normal, utilizando-se a mistura DCM/MeOH/AcOH 93:6:1 como fase móvel. Após consumido completamente o reagente, a reação foi resfriada a 0°C e a base neutralizada com 12 mL de solução de 25% AcOH em THF, adicionados lentamente, ao longo de 5 minutos. O excesso de solvente foi removido e o material bruto foi purificado por CCA, utilizando-se mistura de DCM/MeOH/AcOH 93:6:1 como fase móvel. O produto puro, (**2**), foi obtido como um sólido branco, com 2,1 g de massa (rendimento de 88%). Os dados de caracterização obtidos (**Anexo 7.1.1**, pág. 126) se encontram de acordo com os disponíveis na literatura (FILLON et al., 2005).

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,38 – 7,29 (m, 5H); 5,20 – 5,13 (m, 2H); 4,95 – 4,90 (m, 2H); 4,56 – 4,48 (m, 1H); 4,15 – 4,12 (m, 1H); 3,92 – 3,83 (m, 2H); 3,75 – 3,57 (m, 2H); 2,50 – 2,33 (m, 2H); 1,73 – 1,72 (m, 3H). **RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 178,78; 156,50; 146,64; 141,56; 128,56; 128,39; 128,28; 128,00; 127,63; 112,65; 75,99; 73,12; 67,96; 65,75; 51,84; 34,64; 19,43.

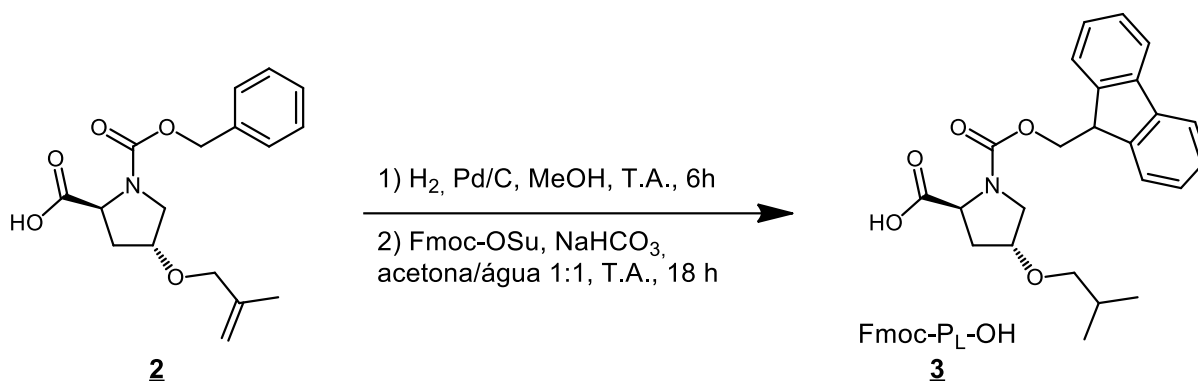


	Equivalentes	Quantidade
Cbz-Hyp	1	2 g
NaH (60% m/m)	3.5	1.05 g
3-bromo-2-metil propeno	4	3.1 mL
2	produto	2.1 g (88%)

3.2.2. Hidrogenação e proteção Fmoc

Em um balão de fundo redondo, contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados **2** (2,1 g, 1,0 eqv) e 25 mL de metanol, e a reação foi purgada com N₂ por 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. Pd/C (10% m/m, 210 mg) foi cuidadosamente adicionado, e a reação foi purgada com N₂ por mais 15 minutos. Em seguida, uma bexiga contendo H₂ foi utilizada para purgar a reação por 15 minutos, seguida de agitação vigorosa sob atmosfera de H₂ por 6 h. A reação foi monitorada por CCD (DCM/MeOH/AcOH 93:6:1), revelada com ninidrina, para visualização do produto com o grupo amino desprotegido na origem da placa. Após filtração para remoção do catalisador, o solvente foi evaporado e a reação foi ressuspensa em solução aquosa de NaHCO₃ (1,67 g, 3,0 eqv., em 15 mL). O éster *N*-hidroxisuccinimida de Fmoc (Fmoc-OSu, 2,45 g, 1,1 eqv) foi completamente dissolvido em 15 mL de acetona e adicionado lentamente à reação, ao longo de 15 minutos, em banho de gelo (0°C). A reação atingiu a temperatura ambiente naturalmente e foi mantida sob agitação por 18 h, sendo acompanhada por CCD (DCM/MeOH/AcOH 93:6:1) e revelada com ninidrina. O excesso de acetona foi evaporado, seguindo-se ajuste de pH 1–2 com HCl_(aq) 5,0 M e extração com EtOAc (4 × 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob Na₂SO₄ e evaporadas. A purificação por CCA se deu pela utilização de fase móvel, composta por DCM/EtOAc/AcOH, em gradiente de concentração de 99:0:1, até 74:25:1, com incrementos de 5% EtOAc a cada 500 mL de eluente. Por fim, foram obtidos 2,0 g do produto puro, **Fmoc-PL-OH (3)** (74% de rendimento), na forma de um sólido branco cristalino. Os dados de caracterização obtidos (**Anexo 7.1.2**, pág. 128) se encontram de acordo com os disponíveis na literatura (FILLON et al., 2005).

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,47 (sl, 1H); 7,78 – 7,29 (m, 8H); 4,53 – 4,03 (m, 5H); 3,73 – 3,59 (m, 2H); 3,21 – 3,15 (m, 2H); 2,44 – 2,36 (m, 1H); 2,22 – 2,09 (m, 1H); 1,86 – 1,79 (m, 1H); 0,92 – 0,90 (m, 6H). **RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 177,77; 176,35; 155,76; 154,60; 143,93; 143,75; 143,67; 141,22; 127,69; 127,56; 127,03; 125,03; 125,01; 119,94; 119,84; 76,90; 76,10; 67,90; 67,70; 51,75; 47,02; 36,74; 35,03; 28,47.



	Equivalentes	Quantidade
2	1	2.1 g
Pd/C (10% m/m)	1% (w/w)	210 mg
NaHCO ₃	3.0	1.67 g
FmocOSu	1.1	2.45 g
Fmoc-PL-OH (3)	produto	2.0 g (74%)

3.3. Protocolos de Síntese do Aminoácido Protegido Fmoc-PR(Boc)₂-OH (**6**)

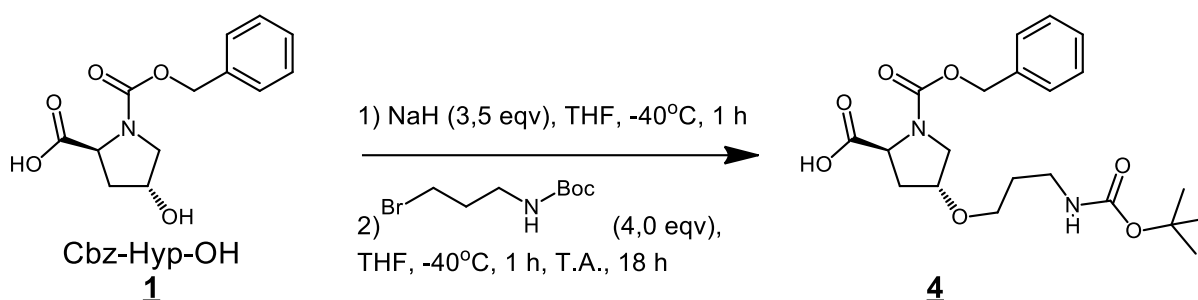
A síntese do aminoácido protegido Fmoc-PR foi realizada com modificações do protocolo previamente descrito (FILLON et al., 2005), em três etapas reacionais, cujo rendimento global foi de 65%, contra 25% de rendimento em quatro etapas, como previamente descrito.

3.3.1. *O*-(Boc-amino)alquilação de Cbz-Hyp-OH

Este protocolo demandou a utilização de vidrarias e solventes anidros e foi realizado sob atmosfera de N₂ seco, sob pressão positiva. Em um balão de fundo redondo, de 250 mL de capacidade, contendo peneira molecular (3 Å) e barra de agitação magnética, foram adicionados 1,05 g de NaH (60% m/m, 3,5 eqv) e 40 mL de THF. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura de -40°C. Em paralelo, em um balão de fundo redondo, de 100 mL de capacidade, foram solubilizados 2,0 g (1,0 eqv) de Cbz-Hyp (**1**), em 30 mL de THF anidro. Em seguida, a solução contendo Cbz-Hyp foi transferida para a suspensão contendo NaH, lentamente com auxílio de uma cânula, ao longo de 5 minutos. Após 1 h, sob agitação à temperatura de -40°C,

uma solução contendo brometo de 3-(Boc-amino)-propila (7,2 g, 4,0 eqv) em 30 mL de THF foi então lentamente adicionada ao meio reacional, com o auxílio de uma cânula, ao longo de 15 minutos. A reação foi mantida por 5 h a -40°C , atingindo em seguida a temperatura ambiente naturalmente, e mantida sob agitação por 18 h adicionais. A evolução da reação foi acompanhada por CCD em sílica gel, utilizando-se a mistura DCM/MeOH/AcOH 90:9:1 como fase móvel. Consumido completamente o reagente, a reação foi resfriada a 0°C e a base neutralizada com 12 mL de solução de 25% AcOH em THF, adicionados lentamente, ao longo de 5 minutos. O excesso de solvente foi removido e o material bruto foi purificado por CCA em sílica gel, utilizando-se a mistura DCM/MeOH/AcOH 93:6:1 como fase móvel. O produto, **4**, foi obtido como um sólido branco, com massa de 2,9 g (92% de rendimento). Os dados de caracterização obtidos (**Anexo 7.1.3**, pág. 130) se encontram de acordo com os disponíveis na literatura (FILLON et al., 2005).

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,36 – 7,24 (m, 5H); 5,20 – 5,08 (m, 2H); 4,81 – 4,76 (m, 1H); 4,50 – 4,44 (m, 1H); 4,09 – 4,05 (m, 1H); 3,72 – 3,61 (m, 2H); 3,49 – 3,39 (m, 2H); 3,22 – 3,11 (m, 2H); 2,43 – 2,11 (m, 2H); 1,73 – 1,70 (m, 2H); 1,43 (s, 9H).



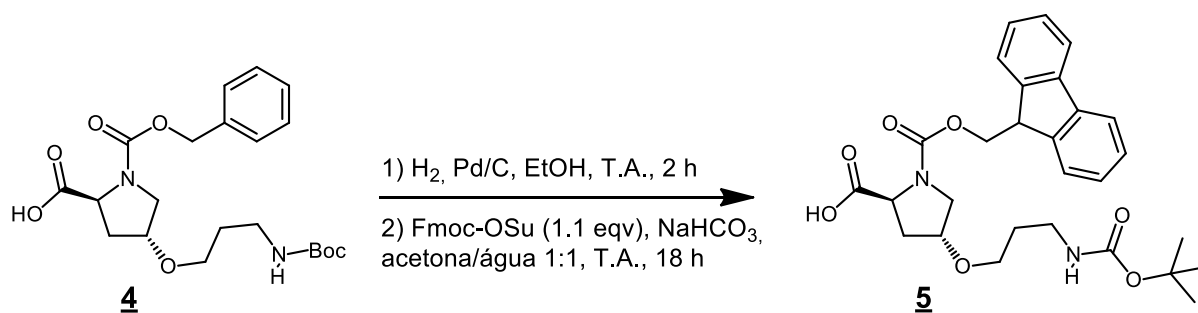
	Equivalentes	Quantidade
Cbz-Hyp-OH (1)	1	2,0 g
NaH 60% (m/m)	3.5	1,05 g
brometo de 3-(Boc-amino)-propila	4	7,2 g
4	produto	2.9 g (92%)

3.3.2. Troca do grupo protetor Cbz por Fmoc na porção amino

Em um balão de fundo redondo, contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados **4** (2,9 g, 1,0 eqv) e 25 mL de metanol. A atmosfera do balão foi purgada com N₂, por 15 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente. Após este tempo, Pd/C (10% m/m) foi cuidadosamente adicionado, e a reação foi purgada com N₂ por 15 minutos adicionais. Após ser saturada com N₂, a atmosfera do balão foi então purgada utilizando uma bexiga contendo H₂, por 15 minutos, e a reação mantida sob atmosfera de H₂ e agitação vigorosa por 2 h, sendo monitorada por CCD em sílica gel (DCM/MeOH/AcOH 93:6:1), revelada com ninidrina, para

visualização do produto com o grupo amino desprotegido. Após filtração para remoção do catalisador, o solvente foi evaporado e a reação foi ressuspensa em solução aquosa de NaHCO_3 (1,67 g, 3,0 eqv., em 15 mL). O éster *N*-hidroxisuccinimida de Fmoc (Fmoc-OSu, 2,45 g, 1,1 eqv) foi completamente dissolvido em 15 mL de acetona e adicionado lentamente ao meio reacional, ao longo de 15 minutos, em banho de gelo (0°C). A reação atingiu a temperatura ambiente naturalmente e foi mantida sob agitação por 18 h, sendo acompanhada por CCD, em sílica gel (DCM/MeOH/AcOH 90:9:1), revelada com ninidrina. O excesso de acetona foi evaporado, seguindo-se o ajuste de pH 3–4 com $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1,0 M e extração com EtOAc (4×30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em Na_2SO_4 e evaporadas. A purificação por CCA, em sílica gel, se deu utilizando a fase móvel composta pela mistura DCM/MeOH/AcOH 93:6:1. Após purificação, foram obtidos 2,5 g do produto puro, **5** (72% de rendimento), na forma de um sólido branco cristalino. Os dados de caracterização obtidos (Anexo 7.1.4, pág. 132) se encontram de acordo com os disponíveis na literatura (FILLON et al., 2005).

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,78 – 7,71 (m, 2H); 7,60 – 7,55 (m, 2H); 7,42 – 7,25 (m, 5H); 7,20 – 7,15 (m, 1H); 4,52 – 4,05 (m, 5H); 3,72 – 3,62 (m, 2H); 3,48 – 3,43 (m, 2H); 3,22 – 3,13 (m, 2H); 2,45 – 2,32 (m, 1H); 2,28 – 2,13 (m, 1H); 1,77 – 1,71 (m, 2H); 1,44 (s, 9H). **RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 175,14; 156,04; 154,66; 144,00; 143,71; 141,26; 141,22; 129,01; 128,20; 127,74; 127,59; 127,07; 125,02; 119,97; 119,85; 80,83; 79,30; 67,96; 67,78; 67,22; 51,68; 47,05; 38,22; 34,80; 29,89; 28,37.



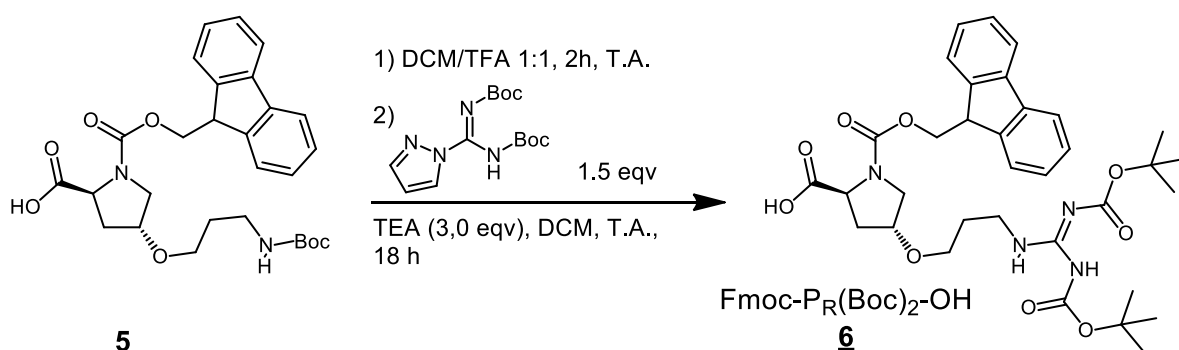
	Equivalentes	Quantidade
4	1,0	2,9 g
Pd/C (10% m/m)	1% (w/w)	290 mg
NaHCO_3	3,0	1,74 g
FmocOSu	1,1	2,56 g
5	produto	2,5 g (72%)

3.3.3. Guanilação da porção propilamino

Em um balão de fundo redondo, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados **5** (2,5 g, 1,0 eqv), e 50 mL de mistura DCM/TFA 1:1. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 2 h, à temperatura ambiente. O monitoramento da reação se deu por CCD, em sílica gel, eluída com mistura DCM/MeOH/AcOH 90:9:1, e revelada com ninidrina. O solvente foi então removido por evaporação, auxiliado por adições de tolueno, para favorecer a remoção de traços de TFA. O sólido foi então solubilizado em 40 mL DCM e 2,5 mL TEA (3,0 eqv) e resfriado a 0°C, sob agitação. Uma solução contendo 1,83 g (1,2 eqv) de *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (PCA-Boc₂) em 20 mL de DCM foi então adicionada lentamente, ao longo de 5 minutos. A reação atingiu a temperatura ambiente naturalmente, sendo então mantida sob agitação por 18 h adicionais. Após verificação do consumo do reagente, o solvente foi evaporado e o material bruto foi purificado por CCA, em coluna de vidro empacotada com sílica gel, utilizando como fase móvel a mistura DCM/MeOH, em gradiente de 98:2 a 92:8, com incrementos de 2% MeOH a cada 500 mL de eluente. Terminada a purificação, foram obtidos 2,9 g do produto **Fmoc-Pr(Boc)₂-OH (6)** (90% de rendimento), na forma de um sólido branco cristalino. Os dados de caracterização obtidos (**Anexo 7.1.5**, pág. 133) se encontram de acordo com os disponíveis na literatura (FILLON et al., 2005).

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 11,50 (sl, 1H); 8,58 (m, 1H); 7,78 – 7,25 (m, 8H); 4,58 – 4,10 (m, 5H); 3,79 – 3,43 (m, 6H); 2,58 – 2,12 (m, 2H); 1,84 – 1,79 (m, 2H); 1,50 – 1,46 (m, 18H).

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 174,34; 163,49; 156,00; 155,96; 153,06; 143,67; 143,62; 141,27; 141,21; 127,76; 127,60; 127,09; 127,02; 124,98; 119,98; 119,86; 83,03; 79,28; 68,07; 68,01; 67,68; 51,18; 47,03; 39,37; 34,70; 28,83; 28,27; 28,03.



	Equivalentes	Quantidade
5	1	2,5 g
DCM/TFA 1:1	-	50 mL
PCA-Boc ₂	1,2	1,83 g
TEA	3,0	2,5 mL
Fmoc-Pr(Boc)₂-OH (6)	produto	2,9 g (90%)

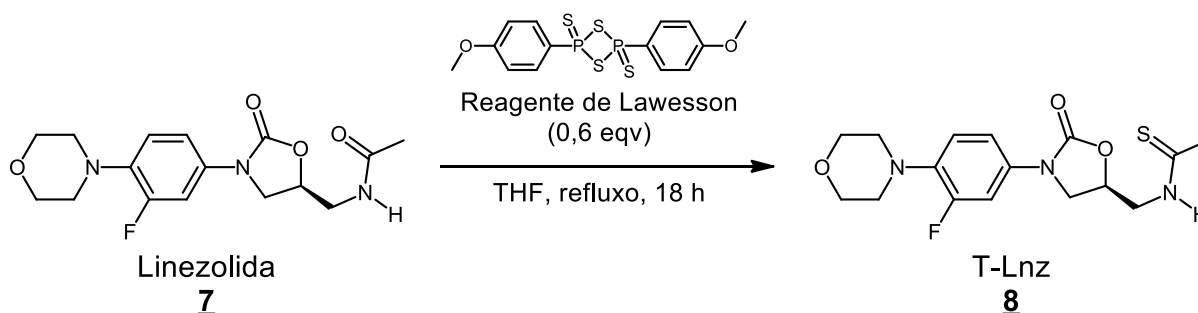
3.4. Protocolos de Síntese de Conjugado Linezolida-Espaçador, Via Conector Imida

A síntese do conjugado do fármaco linezolida ao espaçador 4,4'-ditiodibutiril, via conector imida (**Lnz-DTBA**, **9**), se deu a partir da adaptação de protocolo previamente descrito, em duas etapas reacionais e com rendimento global de 61% (SHANG et al., 2015).

3.4.1. Síntese do intermediário tionilado TLnz

Em um tubo de borosilicato selado, de 25 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 680 mg de linezolida (**7**) (2,0 mmol), 490 mg de reagente de Lawesson (0,6 eqv), sendo a mistura refluxada em 10 mL de THF, por 18 h. Terminada a reação, o solvente foi então removido por evaporação e a purificação se deu por CCA, em sílica gel, com hexano/EtOAc 25:75 como fase móvel. O produto puro, a tioamida **TLnz** (**8**), foi obtido na forma de um sólido acinzentado, com massa 640 mg (rendimento de 91%) (adaptado de SHANG et al., 2015).

Dados de caracterização (**Anexo 7.1.7**, pág. 142): **RMN¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,62 – 8,50 (sl, 1H); 7,41 – 7,36 (m, 1H); 7,05 – 7,03 (m, 1H); 6,93 – 6,89 (m, 1H); 5,03 – 4,97 (m, 1H); 4,25 – 4,18 (m, 1H); 4,15 – 4,05 (m, 2H); 3,88 – 3,82 (m, 5H); 3,06 – 3,04 (m, 4H); 2,60 (s, 3H). **RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 203,80; 156,59; 154,61; 154,14; 136,82; 136,73; 132,52; 132,41; 118,82; 118,78; 114,11; 107,80; 107,54; 71,20; 66,88; 50,90; 47,89; 47,73; 33,83.

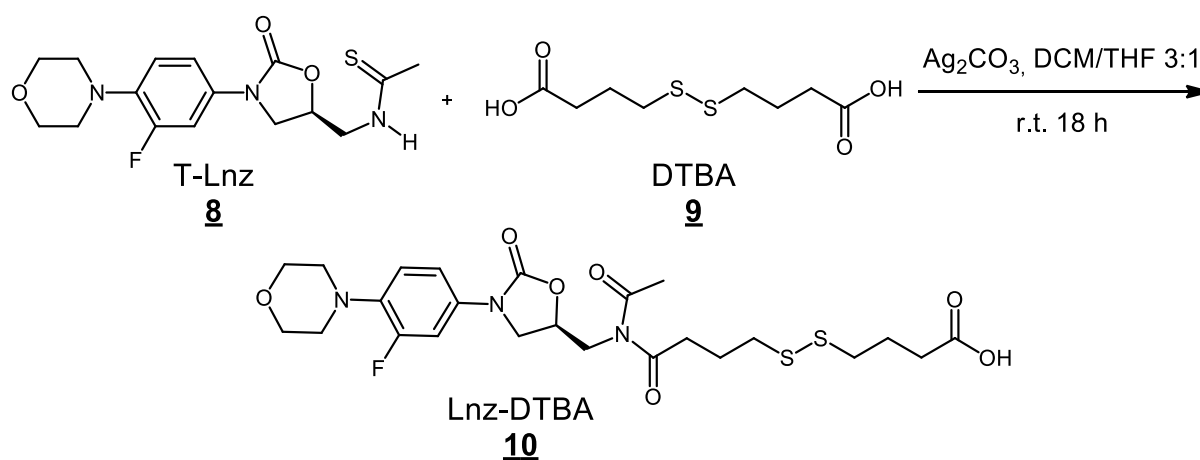


	Equivalentes	Quantidade
Linezolida (7)	1,0	680 mg
Reagente de Lawesson	0,6	490 mg
THF	-	10 mL
TLnz (8)	produto	640 mg (91%)

3.4.2. Dessulfuração/*N*-acilação da tioamida

Em um balão de fundo redondo, de 100 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética e mantido sob atmosfera inerte de N₂, foram adicionados 600 mg de **TLnz**

(8), 2,43 g de ácido 4,4'-ditiodibutírico (**DTBA**, 6,0 eqv), em 30 mL THF. Após total solubilização, carbonato de prata (I) (Ag_2CO_3) foi adicionado à reação, sob agitação vigorosa, à temperatura ambiente. A reação foi mantida sob agitação, nessas condições, por 18 h. Após a remoção do solvente, a purificação se deu por CCA, em sílica gel, utilizando um sistema ternário de DCM/EtOAc/AcOH, em gradiente, como fase móvel: 98 : 0 : 2 (400 mL), 73 : 25 : 2 (400 mL) e 48 : 50 : 2 (800 mL). O produto **Lnz-DTBA (10)** foi obtido na forma de um sólido rosado amorfo, com massa 650 mg (rendimento de 69%) (adaptado de SHANG et al., 2015). Dados de caracterização (**Anexo 7.1.8**, pág. 144): **RMN¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,60 (sl, 1H); 7,42 (dd, J_1 14,3 Hz, J_2 2,4 Hz, 1H); 7,09 (dd, J_1 8,7 Hz, J_2 1,5 Hz, 1H); 6,93 (t, J 9,1 Hz, 1H); 4,86 – 4,80 (m, 1H); 4,18 (dd, J_1 15,2 Hz, J_2 2,6 Hz, 1H); 4,11 (t, J 8,9 Hz, 1H); 3,94 – 3,86 (m, 5H); 3,72 (dd, J_1 9,1 Hz, J_2 7,3 Hz, 1H); 3,07 – 3,05 (m, 4H); 2,91 (dt, J_1 6,9 Hz, J_2 2,9 Hz, 2H); 2,76 – 2,71 (m, 4H); 2,48 (s, 5H); 2,11 – 1,98 (m, 4H). **RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 175,55; 173,59; 156,63; 154,18; 153,89; 136,56; 132,73; 132,62; 118,84; 118,80; 113,96; 113,93; 107,65; 107,38; 82,56; 71,69; 66,88; 50,93; 50,90; 48,38; 47,94; 37,62; 36,04; 32,29; 26,61; 23,95; 23,90.



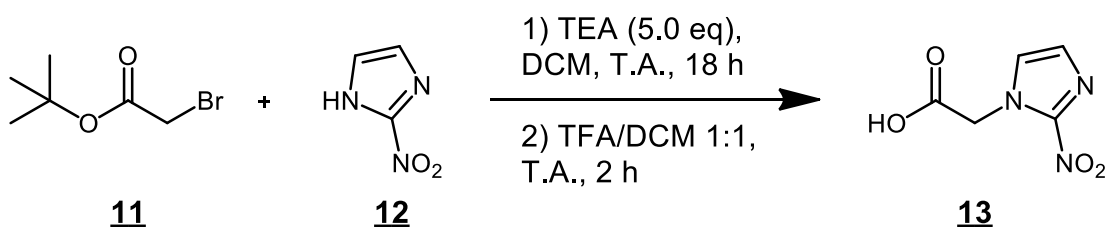
	Equivalentes	Quantidade
TLnz (8)	1,0	600 mg
DTBA (9)	6,0	2,43 g
Ag_2CO_3	2,0	936 mg
THF	-	30 mL
Lnz-DTBA (10)	produto	650 mg (69%)

3.5. Síntese do Ácido 2-Nitroimidazolil-Acético

Em um balão de fundo redondo, de 100 mL de capacidade, foram adicionados 0,5 mL (0,66 g, 3,38 mmol) de bromoacetato de *tert*-butila (**11**), 1,15 g (3,0 eqv) de 2-nitroimidazol (**12**), 2,4 mL (5,0 eqv) de TEA e 30 mL de DCM. A reação foi mantida à temperatura ambiente

por 18 h. O solvente foi removido, a reação ressuspensa em 10% Na₂CO_{3(aq)} e extraída com EtOAc (4 × 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com 4 × 50 mL 10% Na₂CO_{3(aq)} e secas sob Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado com auxílio de tolueno, para remoção de traços de TEA. Em seguida, foram adicionados 30 mL de DCM/TFA 1:1 e a reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 2 h. Após evaporação do solvente, com auxílio de tolueno para remoção de traços de TFA, o produto (**13**) foi obtido como um sólido amarelo, com 0,55 g de massa (95% de rendimento) (RAMI et al., 2013).

Dados de caracterização (**Anexo 7.1.9**, pág. 142): **RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 7,64 (s, 1H); 7,21 (s, 1H); 5,21 (s, 2H). **RMN¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 168,60; 128,49; 127,74; 50,70.



	Equivalentes	Quantidade
bromoacetato de tert-butila (11)	1,0	0,5 mL
2-nitroimidazol (12)	3,0	1,15 g
TEA	5,0	2,4 mL
ácido 2-nitroimidazolil-acético (13)	produto	0,55 g (95%)

3.6. Síntese de Peptídeos e Híbridos em Fase Sólida (SPFS)

As sínteses dos peptídeos e híbridos peptídeo-micromoléculas se deram através da metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), conforme protocolo descrito por TULLA-PUCHE et al. (2015). De forma breve, foi utilizada resina de poliestireno, funcionalizada com conector Rink amida, com carga de 0,45 mmol/g. As sínteses foram realizadas em frascos de síntese de peptídeos, de 10 mL de capacidade, em fase sólida. Foram utilizados aminoácidos ortogonalmente protegidos (4,0 eqv) com grupo Fmoc na porção amino e com grupos lábeis em meio ácido nas cadeias laterais. As reações de acoplamento dos aminoácidos protegidos, obtidos de fontes comerciais, ocorreram mediante ativação do grupo carboxila com HATU (4,0 eqv) e DIPEA (8,0 eqv), em contato com o grupo amino desprotegido ligado à resina polimérica, por 2 h (TULLA-PUCHE et al. 2015). Para os aminoácidos **Fmoc-PL-OH (3)** e **Fmoc-Pr(Boc)₂-OH (6)** (**Seção 3.2**, pág. 46, e **Seção 3.3**, pág. 48), foram utilizados 2,0 eqv. de aminoácido, 2,0 eqv. De HATU e 4,0 eqv. De DIPEA por 4 h (FILLON et al., 2005). As reações de desproteção do grupo Fmoc ocorreram em presença de 20%

piperidina em DMF, por 20 minutos. Após cada etapa de acoplamento ou desproteção foi realizada uma rotina de lavagens com DMF, DCM, MeOH, DCM e DMF (3 × 5 mL cada, em sequência). Após a segunda lavagem com DCM podem-se realizar os testes de Kaiser (aminas primárias), ou cloranil (aminas secundárias), para verificação do sucesso da reação: positivo após desproteção, negativo após acoplamento (FIELDS, 1997). As etapas de acoplamento e desproteção Fmoc foram repetidas de forma sistemática, utilizando-se os aminoácidos adequados, até que se fosse alcançada a sequência peptídica almejada, ligada covalentemente à resina e com as cadeias laterais protegidas (TULLA-PUCHE et al. 2015).

3.7. Acoplamento de Aminoácidos Fmoc-Phg-OH em SPFS

Os aminoácidos (*L*) ou (*D*) Fmoc-fenilglicina (Fmoc-Phg-OH, 3,0 eqv) foram acoplados à sequência peptídica em fase sólida, com controle da estereoquímica conforme protocolo previamente descrito (LIANG et al., 2017). De forma breve, o procedimento de síntese foi análogo à SPFS (**Seção 3.6**, pág. 56), utilizando-se condições reacionais adaptadas para as etapas de acoplamento (3,0 eqv COMU e 4,0 eqv TMP por 1 h) e desproteção Fmoc (10% piperidina em DMF por 10 e 5 minutos).

3.8. Adição do Grupo (2-Nitroimidazolil)-Acetil ao N-terminal em SPFS

Após o acoplamento do aminoácido fenilglicina, a proteção Fmoc foi removida e a resina lavada, conforme previamente citado (**Seção 3.6**, pág. 56). Uma solução contendo ácido 2-nitroimidazolil-acético (**13**) (3,0 eqv), HATU (3,0 eqv) e DIPEA (6,0 eqv) foi adicionada e a reação seguiu por agitação por 3 h. A lavagem foi então repetida até o último ciclo com DCM e a resina foi, em seguida, seca sob fluxo de N₂ (TULLA-PUCHE et al. 2015).

3.9. Acetilação do N-terminal em SPFS

Após o acoplamento do último aminoácido da sequência peptídica planejada, a proteção Fmoc foi removida e a resina lavada, conforme previamente citado (**Seção 3.6**, pág. 56). Uma solução contendo DMF/DIPEA/Ac₂O 87 : 8 : 5 foi adicionada e a suspensão foi mantida sob agitação por 30 minutos. A lavagem foi então repetida, conforme descrito anteriormente, até o último ciclo de lavagem com DCM, após o qual a resina foi finalmente seca sob fluxo de N₂ (TULLA-PUCHE et al., 2015).

3.10. Acoplamento de Lnz-DTBA ao N-terminal em SPFS

Após o acoplamento do último aminoácido da respectiva sequência peptídica planejada, a proteção Fmoc foi removida e a resina foi então lavada, conforme previamente citado (**Seção 3.6**, pág. 56). Uma solução contendo o conjugado fármaco-espaçador (**Lnz-DTBA**, **10**) (2,0 eqv), HATU (2,0 eqv) e DIPEA (4,0 eqv) foi adicionada e a suspensão seguiu sob agitação por 4 h. A lavagem foi então repetida, conforme descrito anteriormente, até o último ciclo de lavagem com DCM e a resina foi, em seguida, seca sob fluxo de N₂ (TULLA-PUCHE et al., 2015).

3.11. Desproteção Seletiva de Resíduo de Lys(Mtt) em SPFS

Para possibilitar a modificação da cadeia lateral do resíduo de aminoácido lisina, durante SPFS, foi utilizado o aminoácido Fmoc-Lys(Mtt)-OH, seguindo-se o protocolo geral já descrito. No momento da modificação o grupo protetor da cadeia lateral foi removido, através de reação do peptídeo ligado à resina, com 30% HFIP em DCM, 2 × 20 min, intercaladas com uma rotina de lavagem com DCM, MeOH e DCM (3 × 5 mL cada). Em seguida, a resina foi lavada segundo a rotina padrão (DIETSCHE et al., 2020).

3.12. Homologação de Sonda de Fluoresceína em SPFS

Após o acoplamento do último aminoácido na sequência peptídica planejada, e remoção da proteção Fmoc, ou remoção seletiva do grupo protetor da cadeia lateral de resíduo de Lys(Mtt), a resina foi lavada, conforme previamente citado (**Seção 3.6**, pág. 56). Uma solução contendo éster hidroxisuccinimida de 5(6)-carboxifluoresceína (1,2 eqv) e DIPEA (2,4 eqv), em solução de DMF, foi adicionada à resina, sendo a suspensão formada mantida sob agitação por 18 h. Seguiu-se com lavagem, segundo protocolo padrão, até o segundo ciclo com DCM, sendo a resina, em seguida, seca sob fluxo de N₂. Este procedimento, bem como todos os procedimentos subsequentes, envolvendo peptídeos e conjugados marcados com sonda de fluoresceína, foram realizados ao abrigo da luz (DIETSCHE et al., 2020).

3.13. Desligamento da Resina e Desproteção das Cadeias Laterais Após SPFS

Coquetéis de desligamento/desproteção foram preparados imediatamente antes do uso. A resina polimérica, ligada covalentemente às respectivas sequências peptídicas protegidas nas cadeias laterais (exceto para conjugados com **Lnz-DTBA**, **10**), após seca sob fluxo de N₂, foi

tratada com coquetel TFA/TIPS/H₂O 95 : 2,5 : 2,5 por 2h. No caso da ocorrência de múltiplos resíduos de Arg(Pbf) foram utilizados tempos adicionais de 1 h para 4 resíduos, 2 h para 6 resíduos e 3 h para 8 resíduos. Havendo resíduos de Trp(Boc) na sequência foi utilizado coquetel com TFA/fenol/TIPS/H₂O 90 : 5 : 2,5 : 2,5, sob as mesmas condições (TULLA-PUCHE et al., 2015). Para as sequências peptídicas conjugadas a **Lnz-DTBA (10)** foi utilizado o protocolo de desproteção com HFIP/TIPS/HCl_(conc) 95 : 4 : 1, com tempos de reação de 3 h, mantendo-se a reação por tempos adicionais no caso da ocorrência de resíduos de Arg(Pbf), conforme descrito (PALLADINO e STETSENKO, 2012). Terminada a reação, a solução contendo o peptídeo desligado e desprotegido foi concentrada em evaporador rotativo, e em seguida precipitada em éter gelado, permanecendo a -80°C por 18 h. O sólido foi então separado por centrifugação e seco por evaporação (TULLA-PUCHE et al., 2015).

3.14. Purificação e Análise por CLAE-FR e Caracterização por MALDI-ToF

O produto bruto, precipitado e seco para remoção de traços de éter etílico, foi solubilizado em 10 mL ACN/H₂O 1:3 e purificado por CLAE-FR em escala semipreparativa. A purificação foi realizada com o auxílio de uma coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm, 250 × 21,2 mm) e fase móvel composta por ACN/H₂O em gradiente linear, com 0,1% TFA como modulador de fase. O fluxo utilizado foi de 12 mL/min e o monitoramento se deu por UV/Vis em 214 nm, 254 nm e/ou 280 nm. As frações contendo os produtos, previamente identificadas por MALDI-ToF, foram recolhidas, combinadas, concentradas para remoção do excesso de solventes orgânicos e liofilizadas. Os produtos foram em seguida analisados por CLAE-FR, em escala analítica, para verificação da pureza. As condições de análise foram: coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm), fase móvel composta por ACN/H₂O, em gradiente linear, com 0,1% TFA como modulador de fase; fluxo de 1,2 mL/min e o monitoramento foi realizado por UV/Vis em 214 nm, 254 nm e/ou 280 nm. As estruturas dos peptídeos e conjugados foram confirmadas por espectrometria de massas (MALDI-ToF), utilizando ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico como matriz de suporte, e a detecção foi feita em modo positivo.

Dados de caracterização:

P1-1: AcYGRLL-NH₂ (**14**) – Anexo 7.1.10, pág. 144

MALDI-ToF: m/z calculado para C₃₇H₆₄N₁₃O₈⁺ 818,5 [M+H], m/z observado 818,8

CLAE-FR analítico: gradiente 10–50% A em 30 min, t_R = 17,316 min

P1-2: AcYGRLLRLL-NH₂ (**15**) – Anexo 7.1.11, pág. 145

MALDI-ToF: m/z calculado para C₆₁H₁₁₀N₂₃O₁₂⁺ 1356,9 [M+H], m/z observado 1356,8

CLAE-FR analítico: gradiente 20–65% A em 30 min, $t_R = 16,086$ min

P1-3: AcYGRLLRLLRLL-NH₂ (**16**) – Anexo 7.1.12, pág. 146

MALDI-ToF: m/z calculado para C₈₅H₁₅₆N₃₃O₁₆⁺ 1895,2 [M+H], m/z observado 1894,4

CLAE-FR analítico: gradiente 30–60% A em 30 min, $t_R = 18,324$ min

P1-4: AcYGRLLRLLRLLRLL-NH₂ (**17**) – Anexo 7.1.13, pág. 147

MALDI-ToF: m/z calculado para C₁₀₉H₂₀₂N₄₃O₂₀⁺ 2433,6 [M+H], m/z observado 2434,5

CLAE-FR analítico: gradiente 20–60% A em 30 min, $t_R = 25,650$ min

P2-1: AcYGRRLRLL-NH₂ (**18**) – Anexo 7.1.14, pág. 148

MALDI-ToF: m/z calculado para C₃₇H₆₄N₁₃O₈⁺ 818,5 [M+H], m/z observado 819,1

CLAE-FR analítico: gradiente 15–40% A em 30 min, $t_R = 15,913$ min

P2-2: AcYGRRLRRLRLL-NH₂ (**19**) – Anexo 7.1.15, pág. 149

MALDI-ToF: m/z calculado para C₆₁H₁₁₀N₂₃O₁₂⁺ 1356,9 [M+H], m/z observado 1357,2

CLAE-FR analítico: gradiente 15–50% A em 30 min, $t_R = 18,366$ min

P2-3: AcYGRRLRRLRRLRLL-NH₂ (**20**) – Anexo 7.1.16, pág. 150

MALDI-ToF: m/z calculado para C₈₅H₁₅₆N₃₃O₁₆⁺ 1895,2 [M+H], m/z observado 1895,1

CLAE-FR analítico: gradiente 15–55% A em 30 min, $t_R = 19,253$ min

P2-4: AcYGRRLRRLRRLRRLRLL-NH₂ (**21**) – Anexo 7.1.17, pág. 151

MALDI-ToF: m/z calculado para C₁₀₉H₂₀₂N₄₃O₂₀⁺ 2433,6 [M+H], m/z observado 2432,8

CLAE-FR analítico: gradiente 15–55% A em 30 min, $t_R = 20,254$ min

P3-1: AcGRRWW-NH₂ (**22**) – Anexo 7.1.18, pág. 152

MALDI-ToF: m/z calculado para C₃₈H₅₃N₁₄O₆⁺ 801,4 [M+H], m/z observado 801,8

CLAE-FR analítico: gradiente 15–50% A em 30 min, $t_R = 19,906$ min

P3-2: AcGRRWRRWW-NH₂ (**23**) – Anexo 7.1.19, pág. 153

MALDI-ToF: m/z calculado para C₇₂H₉₇N₂₆O₁₀⁺ 1485,8 [M+H], m/z observado 1486,1

CLAE-FR analítico: gradiente 15–50% A em 30 min, $t_R = 23,396$ min

P3-3: AcGRRWRRWWRRWW-NH₂ (**24**) – Anexo 7.1.20, pág. 154

MALDI-ToF: m/z calculado C₁₀₆H₁₄₁N₃₈O₁₄⁺ 2170,1 [M+H], m/z observado 2170,1

CLAE-FR analítico: gradiente 20–60% A em 30 min, $t_R = 19,914$ min

P3-4: AcGRRWRRWWRRWWRRWW-NH₂ (**25**) – Anexo 7.1.21, pág. 155

MALDI-ToF: m/z calculado C₁₄₀H₁₈₅N₅₀O₁₈⁺ 2854,5 [M+H], m/z observado 2853,3

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 17,494$ min

FI-P1-2: FI-GRLLRLL-NH₂ (**26**) – Anexo 7.1.22, pág. 156

MALDI-ToF: m/z calculado C₇₉H₁₀₈N₂₂O₁₅⁺ 1509,8 [M+H], m/z observado 1511,1

CLAE-FR analítico: gradiente 25–55% A em 30 min, $t_R = 20,701$ e $21,184$ min

FI-P1-3: FI-GRLLRLLRLL-NH₂ (**27**) – Anexo 7.1.23, pág. 157

MALDI-ToF: m/z calculado C₉₅H₁₅₅N₃₂O₁₉⁺ 2048,2 [M+H], m/z observado 2048,2

CLAE-FR analítico: gradiente 20–60% A em 30 min, $t_R = 19,340$ e $19,892$ min

FI-P1-4: FI-GRLLRLLRLLRLL-NH₂ (**28**) – Anexo 7.1.24, pág. 158

MALDI-ToF: m/z calculado para C₁₁₉H₂₀₁N₄₂O₂₃⁺ 2586,6 [M+H], m/z observado 2586,0

CLAE-FR analítico: gradiente 40–65% A em 30 min, $t_R = 18,696$ e $19,109$ min

Lnz-P1-2: Lnz-DTBA-GRLLRLL-NH₂ (**29**) – Anexo 7.1.25, pág. 159

MALDI-ToF: m/z calculado para C₇₄H₁₂₉FN₂₅O₁₅S₂⁺ 1691,0 [M+H], m/z observado 1690,9

CLAE-FR analítico: gradiente 30–60% A em 30 min, $t_R = 18,072$ min

Bzd-(S)-P1-2: Bzd(S)-GRLLRLL-NH₂ (**30**) – Anexo 7.1.26, pág. 160

MALDI-ToF: m/z calculado para C₆₃H₁₀₉N₂₆O₁₃⁺ 1437,9 [M+H], m/z observado 1438,4

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 19,764$ min

Bzd-(R)-P1-2: Bzd(R)-GRLLRLL-NH₂ (**31**) – Anexo 7.1.27, pág. 161

MALDI-ToF: m/z calculado para C₆₃H₁₀₉N₂₆O₁₃⁺ 1437,9 [M+H], m/z observado 1437,8

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 19,059$ min

FI-P14LRR: FI-GP_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_L-NH₂ (**32**) – Anexo 7.1.28, pág. 162

MALDI-ToF: m/z calculado C₁₄₀H₂₂₂N₃₉O₃₃⁺ 2977,7 [M+H], m/z observado 2475,3

CLAE-FR analítico: gradiente 20–60% A em 30 min, $t_R = 17,896$ e $18,076$ min

Lnz-P14-LRR: Lnz-DTBA-GP_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_L-NH₂ (**33**)

Anexo 7.1.29, pág. 163

MALDI-ToF: m/z calculado para C₁₄₃H₂₄₀FN₄₂O₃₃S₂⁺ 3156,8 [M+H], m/z observado 3154,6

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 21,411$ min

Lnz-FI-P14-LRR: Lnz-DTBA-GK(FI)GP_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_L-NH₂ (**34**)

Anexo 7.1.30, pág. 164

MALDI-ToF: m/z calculado para C₁₄₃H₂₄₀FN₄₂O₃₃S₂⁺ 3702,0 [M+H], m/z observado 3698,2

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 21,997$ min

Bzd-(S)-P14LRR: Bzd(S)-GP_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_LPr_RPr_L-NH₂ (**35**)

Anexo 7.1.31, pág. 165

MALDI-ToF: m/z para C₁₃₃H₂₂₀N₄₃O₃₁⁺ 2903,7 [M+H], m/z observado 2902,4

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, $t_R = 19,860$ min

Bzd-(R)-P14LRR: Bzd-(R)-GPLPRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂ (36)

Anexo 7.1.32, pág. 166

MALDI-ToF: m/z para C₁₃₃H₂₂₀N₄₃O₃₁⁺ 2903,7 [M+H], m/z observado 2902,5

CLAE-FR analítico: gradiente 25–65% A em 30 min, t_R = 19,912 min

3.15. Aferição da Concentração das Soluções Estoque por UV-Vis

Soluções estoque foram preparadas a partir de alíquotas dos produtos liofilizados, dissolvidas em água ultrapura (Milli-Q[®] Tipo I), e as concentrações foram aferidas por leitura da absorbância no UV/Vis, descontado da absorbância do branco (Abs), utilizando cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho da luz (*l*). O cálculo da concentração (*C*) foi realizado utilizando-se a lei de Lambert-Beer:

$$Abs = \varepsilon [M^{-1}cm^{-1}] \times C [M] \times l [cm]$$

que leva à equação corrigida pelo fator de diluição (*F_{dil}*) e ajustada para mM:

$$C [mM] = \frac{Abs \times F_{dil} \times 1000}{\varepsilon}$$

Para o coeficiente de extinção molar (ε) foi considerado um somatório dos valores de ε de todos os cromóforos presentes na estrutura.

Para peptídeos contendo resíduos de aminoácidos cromofóricos, Tyr (**Y**), Trp (**W**), ou (**P11–4**, **P21–4** e **P31–4**), a solução estoque foi diluída 20 × em tampão de cloreto de guanidínio 6,0 M (pH 8,5) e a absorbância monitorada em $\lambda = 280$ nm. Foram considerados os coeficientes de extinção molar do triptofano $\varepsilon_W = 5500 M^{-1}cm^{-1}$ e da tirosina $\varepsilon_Y = 1490 M^{-1}cm^{-1}$.

Para peptídeos contendo fluoresceína (**FIP12–4**, **FIP14LRR**, **FILnz-P14LRR**) a solução estoque foi diluída 40 × em tampão Tris-HCl 1,0 M (pH 8,5), sendo o monitoramento feito em $\lambda = 494$ nm. Foi considerado o valor de coeficiente de extinção molar para a fluoresceína $\varepsilon_{Fl} = 70000 M^{-1}cm^{-1}$ (PACE et al., 1995; NOBLE et al., 1009; AITKEN et al. 2009; SABNIS, 2015).

Para peptídeos contendo somente linezolida ou benznidazol como grupos cromofóricos foram construídas curvas de calibração a partir de soluções estoque dos respectivos fármacos puros a 40,00 mM, 20,00 mM, 10,00 mM, 5,00 mM, 2,50 mM e 1,25 mM, diluídas 40 × em tampão Tris-HCl 1,0 M (pH 8,5). Para linezolida foi monitorado o comprimento de onda $\lambda = 254$ nm, e para benznidazol foi usado o comprimento de onda $\lambda = 330$ nm. As concentrações das soluções-estoque foram calculadas com base nos valores de absorbância, obtidos nas mesmas condições de construção das curvas de calibração para os respectivos fármacos.

3.16. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Em uma cubeta de quartzo, com caminho de luz de 2 mm, foram adicionadas soluções a 50 μM dos compostos em tampão fosfato (pH 7,2) a 20 mM, sem e com a adição de 25% v/v trifluoroetanol (TFE). Os dados espectrais foram obtidos em triplicata, entre 260 a 190 nm, com velocidade de varredura de 20 nm/min e 1 nm de largura de banda. Os espectros foram descontados do valor de fundo e convertidos de valores de graus médios de rotação para elipsidade média por resíduo, dividindo-se pelo comprimento do caminho da luz, concentração de composto e número de resíduos de aminoácido por peptídeo, em cada caso.

3.17. Indução Química de Liberação de Fármaco de Conjugados de Linezolida

Os conjugados de linezolida **Lnz-DTBA**, **Lnz-P12** ou **Lnz-P14LRR** (40 μM) foram adicionados em solução tampão PBS (pH 7,4), previamente degasada. Quinina (10 μM) foi adicionada como padrão interno. A reação foi pré-aquecida a 37°C e o agente redutor ditioneitol (DTT, 10 mM) foi então adicionado. O volume total da reação foi de 3 mL. A reação foi mantida a 37°C por 60 minutos, e alíquotas de 200 μL foram coletadas nos tempos de 0, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos, sendo imediatamente congeladas a -78°C em um banho de acetona/gelo seco, para interromper a reação de redução. As amostras, após serem descongeladas, foram imediatamente analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-EM), por *electrospray* no modo positivo (ESI+). A análise foi conduzida usando uma coluna Acquity HSS T3 C18 (1,8 μm , 100 \times 2,1 mm) e fase móvel composta por ACN/H₂O, com 0,1% de ácido fórmico, gradiente linear de 5–50% de ACN, sob fluxo de 0,5 mL/min, ao longo de 10 min. O monitoramento da análise se deu por absorvância no UV (254 nm) e por EM de íons totais (ESI+). Os experimentos foram realizados em duplicatas, e para cada experimento foram construídas curvas de calibração de linezolida com 7 concentrações, variando de 1,25 a 80 μM , em presença de 10 μM de quinina, nas mesmas condições de análise mencionadas acima. As áreas sob as curvas, correspondentes à linezolida nos cromatogramas, foram corrigidas com o padrão interno. A concentração foi calculada com base na equação de regressão linear, obtida a partir da curva de calibração. Os valores de concentração e desvio padrão para cada ponto, referentes aos tempos, foram analisados no software GraphPad Prism, e os dados foram analisados usando regressão não-linear modelada a uma curva hiperbólica para o cálculo da concentração máxima.

3.18. Métodos, Reagentes, Instrumentos e Análises: Ensaios Biológicos

Benznidazol foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes, meios de cultura e suplementos Gibco ThermoFisher (Waltham, MA, EUA).

Todas as linhagens de células e bactérias utilizadas foram adquiridas da ATCC (Manassas, VA, EUA). Hemácias humanas foram adquiridas comercialmente da Innovative Research (Novi, MI, EUA), cat # IWB3CPDA1.

Os parasitos da cepa Tulahuen C2C4 LacZ de *T. cruzi* foram gentilmente doados pelo Prof. Adriano Andricopulo do Instituto de Física da USP-São Carlos, SP.

Medidas de absorvância e densidade ótica em microplacas foram realizadas em leitor TECAN Infinite F PLEX. Os experimentos de citometria foram realizados em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), equipado com laser de argônio de 488 nm, e a emissão de compostos marcados fluoresceína. Imagens de microscopia confocal foram obtidas em um microscópio de fluorescência confocal invertido, Nikon A1R-MP, equipado com lente objetiva de 60× por imersão em óleo, e as imagens obtidas foram processadas utilizando o software NIS Elements.

3.19. Cultivo de Células de Linhagem de Mamíferos

As linhagens de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC) e fibroblastos renais de *Macaca mulata* LLC-MK2 (ATCC) foram cultivados a 37°C e 5% CO₂. Células J774A.1 foram cultivadas em meio DMEM com 10% SFB. Células LLC-MK2 foram cultivados em meio DMEM com 10% SFB. As monocamadas de células, em ambos os casos, foram desassociadas por ação enzimática por tratamento com tripsina-EDTA 0,05%, por 5 minutos a 37°C. Em ambos os casos, as células foram centrifugadas a 1600 rpm por 6 minutos, ressuspendidas em meio DMEM e a densidade celular determinada por contagem, por exclusão com azul de tripan, em câmara de Neubauer antes do uso.

3.20. Determinação do Perfil Citotóxico em Células J774A.1

Células J774A.1 foram cultivadas em uma placa de 96 poços (2,0 × 10⁴ células/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 18 h. O meio de cultura foi renovado e foram adicionados os compostos, em variadas concentrações em triplicatas, seguindo a incubação a 37°C e 5% CO₂ por 24 h. O meio de cultura foi então renovado e a quantificação da viabilidade celular se deu pelo método MTT (KUMAR et al., 2018). De forma breve, uma solução de sal de MTT (1,25

mg/mL, 20 µL/poço) foi adicionada, seguindo-se incubação a 37°C e 5% CO₂ por 2 h. O meio de cultura foi então removido, os cristais de formazana de MTT formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância da solução medida, utilizando-se um leitor de placas a 570 nm.

3.21. Determinação do Perfil Hemolítico em Hemácias Humanas

Hemácias humanas foram centrifugadas a 1200 rpm a 4°C por 5 min., lavadas com 2 × PBS (pH 7,4), ressuspensas em PBS, diluídas 1:25 e adicionadas a uma placa de cultivo celular de 96 poços (50 µL/poço). Os compostos foram adicionados em triplicatas, em diluição seriada em PBS. Triplicatas contendo Triton-X 0,1% ou PBS foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Após incubação por 1h a 37°C, a placa foi centrifugada a 1200 rpm, a 4°C por 5 min, e o sobrenadante transferido para uma nova placa de 96 poços (80 µL/poço). A liberação de hemoglobina foi quantificada por leitura da absorbância, em leitor de placas em 405 nm.

3.22. Determinação da Atividade Antibacteriana em *E. coli*

E. coli (ATCC 25922) foi cultivada em ágar TSA, por 18 h a 37°C. As colônias de bactérias foram recuperadas e cultivadas em meio TSB (5 colônias por 50 mL) a 37°C, sob agitação até a fase exponencial de crescimento (OD₅₉₅ = 0,500 – 0,600). Uma alíquota de 5 mL da suspensão bacteriana foi lavada por centrifugação a 3000 rpm por 3 × 10 min. com meio MHB. O pélete foi suspenso em meio MHB e a densidade óptica foi ajustada para 0,001. A suspensão bacteriana (90 µL/poço) foi então adicionada em uma placa transparente de cultivo celular, de 96 poços, contendo os compostos em triplicata, em diluição seriada e triplicatas para os controles (10 µL/poço), incubada por 6 h ou 20 h a 37°C, sob agitação. O peptídeo melitina em diluição seriada, e água, foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O crescimento bacteriano foi quantificado por medida OD₅₉₅, em leitor de placas, com capacidade para múltiplas leituras por poço. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a concentração mais baixa em que não se observou crescimento bacteriano (DIETSCHE et al., 2020).

3.23. Ensaio de Liberação de β-Galactosidase em *E. coli*

E. coli (ATCC 25922) foi cultivada em ágar TSA por 18 h a 37°C. Colônias de bactérias foram recuperadas e cultivadas em meio MHB (5 colônias por 50 mL), sob agitação, até a fase exponencial de crescimento (OD₅₉₅ = 0,450 – 0,500). A expressão de β-galactosidase foi

estimulada pela adição de IPTG (1,0 mM, concentração final) por 1 h a 37°C. Uma alíquota de 10 mL da suspensão bacteriana foi lavada por centrifugação a 3000 rpm por 3 × 10 min. com meio MHB. O pélete foi ressuspensionado em meio MHB e a densidade óptica foi ajustada para 0,500. A suspensão bacteriana (90 µL/poço) foi então adicionada em uma placa transparente de cultivo celular de 96 poços contendo os compostos em triplicatas em diluição seriada de 1 ×, 2 × e 4 × CIM e triplicatas para os controles, o peptídeo melitina a 16 µM (positivo) e água (negativo), em 10 µL/poço. Após incubação por 1 h a 37°C sob agitação, seguindo-se centrifugação a 4000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços (80 µL/poço) e tratada com solução 10 mg/mL de CPRG (20 µL/poço). A absorbância foi monitorada a cada 5 minutos em leitor de placas a 570 nm durante intervalos de 1 h (DIETSCHE et al., 2020).

3.24. Cultivo *In Vitro* de Tripomastigotas de *T. cruzi*

Em uma monocamada com 1.0×10^7 de células LLC-MK2 em um frasco de cultivo celular de 150 cm² (50 – 60% de confluência) foram adicionados 5.0×10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* transfectados com gene de *E. coli* para expressão da enzima β-galactosidase (Tulahuen C2C4 LacZ), em meio DMEM completo suplementado com 2,5% SFB. Após incubação por 24 h a 37°C e 5% CO₂ a monocamada de células foi lavada para remoção de parasitos não internalizados e a incubação em seguida foi mantida nas mesmas condições, sendo o meio de cultura renovado a cada 2 dias até o 7º dia. O sobrenadante foi recolhido diariamente do 7º ao 12º dia e enriquecido por centrifugação diferencial (2800 rpm por 10 min., 5500 rpm por 20 min.) para maximizar a proporção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A densidade da suspensão de parasitos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer de parasitos com motilidade e utilizada em seguida nos experimentos.

3.25. Determinação do Perfil Inibitório do Crescimento em Amastigotas de *T. cruzi*

Células LLC-MK2 foram adicionadas em uma placa de cultivo celular de 96 poços (1.0×10^4 células/poço) em meio DMEM completo com 5% SFB e incubadas por 3 h a 37°C e 5% CO₂ para adesão. O meio foi renovado e tripomastigotas de *T. cruzi* expressando β-galactosidase (Tulahuen C2C4 LacZ) foram adicionados (2.0×10^5 parasitos/poço). Foi mantida uma triplicata sem adição de parasitos como controle positivo. Após incubação por 24 h a 37°C e 5% CO₂, a monocamada de células foi lavada com PBS para remoção dos parasitos

não internalizados. Foi adicionado meio DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 5% SFB, seguido da adição dos compostos e do fármaco benznidazol a 50 μM em triplicatas. Meio de cultura sem tratamento foi utilizado como controle negativo. Após incubação por 120 h a 37°C e 5% CO_2 , uma solução contendo 0,5 M CPRG e 0,8% v/v IGEPAL® CA-630 (30 μL /poço) foi adicionada, seguindo-se incubação a 37°C por 2 h para reação enzimática. A absorvância em 570 nm foi medida em leitor de placas (BUCKNER et al., 1996).

3.26. Determinação do Perfil de Toxidez em Tripomastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) foram cultivadas em placas de 96 poços ($1,0 \times 10^6$ parasitos/ poço) em meio DMEM sem vermelho de fenol com 5% de SFB. Foi realizado tratamento com os compostos em variadas concentrações e mantidos controles negativos (meio sem tratamento) e positivos (10% v/v DMSO) em triplicatas, para um volume final de 100 μL /poço. Após um período de incubação de 24 h a 37°C e 5% CO_2 , foram adicionados 20 μL /poço de solução contendo sal de MTT (1,25 mg/mL) e metassulfato de fenazina (PMS, 0,22 mg/mL). Após incubação por 2 h a 37°C e 5% CO_2 os cristais de formazana formados foram solubilizados pela adição de 120 μL /poço de mistura de 50% isopropanol, 40% tampão acetato 50mM (pH 5,4) e 10% triton-X. Após 1 h sob agitação, a absorvância da solução foi medida em leitor de placas a 570 nm (adaptado de SERENO e LEMESRE ALVES, 1997; ALVES PASSOS et al., 2017).

3.27. Determinação do Perfil Inibitório da Infectividade em Tripomastigotas de *T. cruzi*

Células LLC-MK2 foram adicionadas em uma placa de cultivo celular de 96 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) em meio DMEM completo com 5% SFB e incubadas por 3 h a 37°C e 5% CO_2 para adesão. Tripomastigotas de *T. cruzi* expressando β -galactosidase (Tulahuen C2C4 LacZ) foram adicionados em uma segunda placa de cultivo de 96 poços ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço) e tratados em triplicatas com os compostos e o fármaco benznidazol em diluição seriada. Foi mantida uma triplicata sem adição de parasitos como controle positivo. Os parasitos foram incubados por 30 min. a 37°C e 5% CO_2 . O meio de cultura da monocamada de células foi removido e os parasitos pré-tratados foram adicionados junto com o sobrenadante. Após incubação por 24 h a 37°C e 5% CO_2 , a monocamada de células foi lavada com PBS para remoção dos parasitos não internalizados e foi adicionado meio DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 5% SFB. Após incubação por 120 h a 37°C e 5% CO_2 , uma solução

contendo 0,5 M CPRG e 0,8% v/v IGEPAL[®] CA-630 (30 µL/poço) foi adicionada, seguindo-se incubação a 37°C por 2 h para reação enzimática. A absorbância em 570 nm foi medida em leitor de placas (BUCKNER et al., 1996).

3.28. Determinação do Perfil Citotóxico em Células LLC-MK2

A citotoxicidade sobre células LLC-MK2 foi avaliada de forma análoga à montagem experimental dos experimentos descritos nas Seções 3.25 (pág. 66) e 3.26 (pág. 67), incluindo-se tempos de incubação e regimes de tratamento e excetuando-se à adição de tripomastigotas de *T. cruzi*. Triplicatas contendo meio DMEM com 5% SFB e meio DMEM com 10% DMSO foram utilizadas como controles negativo e positivo respectivamente. Após período de incubação de 120 h a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultura foi renovado e a viabilidade celular foi verificada pelo método MTT (KUMAR et al., 2018). De forma breve, uma solução de sal de MTT (1,25 mg/mL, 20 µL/poço) foi adicionada seguindo-se incubação a 37°C e 5% CO₂ por 2 h. O meio de cultura foi então removido, os cristais de formazana de MTT formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância da solução foi medida utilizando-se um leitor de placas a 570 nm.

3.29. Ensaios de Quantificação de Fluorescência por Citometria de Fluxo

Células J774A.1 semeadas em tubos de fundo redondo padrão (BD Biosciences) e incubadas por 18 h a 37°C e 5% CO₂ em meio DMEM com 10% SFB. Após centrifugação a 1200 rpm por 6 min., o meio de cultura foi renovado e os compostos marcados com sondas de fluoresceína foram adicionados em concentrações variadas em triplicatas. Meio de cultura sem tratamento foi utilizado como controle negativo. Após incubação por 1 h a 37°C e 5% CO₂ o meio de cultura foi removido após centrifugação e as células ressuspensas em PBS (pH 7,4) ou em solução de azul de tripan (1 g/L) em PBS. A fluorescência das células foi medida em citômetro de fluxo monitorada no canal FL1. Os dados foram tratados utilizando o software BD, do próprio equipamento (DIETSCHKE et al., 2020).

3.30. Visualização de em Células Vivas por Microscopia de Fluorescência Confocal

Células J774A.1 foram cultivadas em uma placa de 4 câmaras Lab-Tek e incubadas por 18 h a 37°C e 5% CO₂ em meio DMEM com 10% SFB. O meio foi renovado e os compostos marcados com sondas de fluoresceína foram adicionados em concentrações variadas. Após incubação por 1 h a 37°C e 5% CO₂, o meio foi renovado, seguindo-se tratamento com Hoechst

33342 (1000 nM) em combinação com MitoTracker™ (100 nM) ou LysoTracker™ (300 nM) por 30 min. a 37°C e 5% CO₂. O meio foi renovado, realizando-se em seguida os experimentos de imagem por microscopia confocal, utilizando-se os lasers de 488, 350 e 561 nm, respectivamente, para a excitação da fluoresceína, Hoechst 33342 e MitoTracker/LysoTracker (DIETSCHE et al., 2020).

3.31. Análise Estatística

O percentual de viabilidade de células ou parasitos foi calculado com base na fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{(A - P)}{(N - P)} \times 100$$

Onde: A = absorvância da situação específica, P = controle positivo, N = controle negativo.

O cálculo da concentração efetiva em 50% (CE₅₀) foi realizado por regressão logarítmica e a análise de significância estatística ($p < 0,05$), usando os ANOVA e teste de Dunnett foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 7.0. Os resultados são expressos como a média e desvio padrão referente a experimentos independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos Aminoácidos Protegidos Fmoc-PL-OH e Fmoc-PR(Boc)₂-OH

O grupo da professora Jean Chmielewski, da Universidade de Purdue (IN-USA), trabalha ativamente na síntese e investigação da atividade biológica de hélices poliprolina anfifílicas, publicando sobre o assunto desde 2005 (FILLON et al., 2005). Sua síntese, via SPFS, no entanto, é custosa, uma vez que demanda a utilização de aminoácidos ortogonalmente protegidos, baseados na estrutura da hidroxiprolina, **Fmoc-PL-OH (3)** e **Fmoc-PR(Boc)₂-OH (6)** (**Figura 38**), que não estão disponíveis comercialmente. A preparação de ambos os aminoácidos está descrita a partir da (L)-4-hidroxiprolina protegida com grupo carboxibenzil na porção amino (**Cbz-Hyp-OH, 1**). No entanto, especificamente em relação à preparação de **Fmoc-PR(Boc)₂-OH**, as múltiplas etapas e o baixo rendimento sintético são um inconveniente e uma limitação importantes. Dessa forma, a estratégia sintética originalmente proposta para a preparação de **Fmoc-PL-OH** foi mantida. Para a obtenção de **Fmoc-PR(Boc)₂-OH** uma nova rota de síntese foi desenvolvida neste trabalho. O objetivo desta nova proposta sintética foi a redução da quantidade de etapas reacionais, impactando o rendimento, o tempo e a demanda por processos de purificação, levando, conseqüentemente, à otimização da obtenção deste importante precursor.

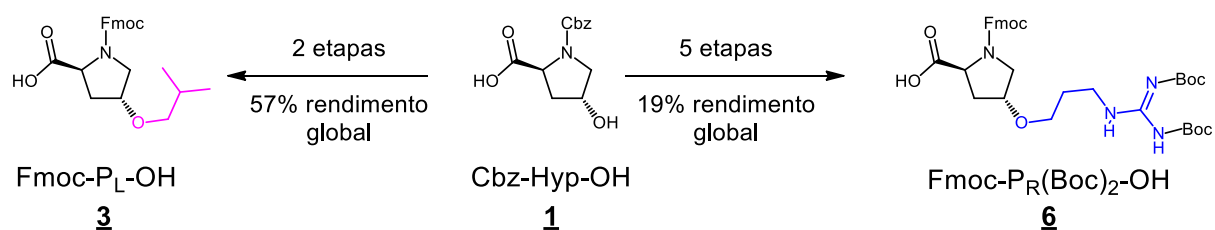


Figura 38. Estrutura dos aminoácidos Fmoc-PL-OH e Fmoc-PR(Boc)₂-OH, obtidos sinteticamente a partir da Cbz-Hyp-OH. Em detalhe, as quantidades de etapas reacionais e rendimentos encontrados por FILLON et al. (2005).

Em relação a **Fmoc-PL-OH**, o protocolo sintético foi aplicado conforme previamente descrito, com a caracterização e rendimentos reacionais condizentes com os dados da literatura (FILLON et al., 2005). A síntese de **Fmoc-PL-OH**, mostrada na **Figura 39**, inicia em **a** com a *O*-alquenação na hidroxila alcóolica da **Cbz-Hyp-OH**, através da formação do alcóxido correspondente por reação com NaH, em presença de peneira molecular (PM) com 3 Å de tamanho de poros, em THF anidro. Após a formação do alcóxido, segue-se a reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2), utilizando 3-bromo-2-metil-propeno como

eletrófilo. Dois pontos cruciais desta reação são a manutenção do meio reacional anidro durante todo o processo, além da manutenção da baixa temperatura (-40°C , mantida com banho de gelo seco em ACN) durante a formação do alcóxido e a adição do eletrófilo. Após purificação por CCA, o intermediário **2** reage nas condições mostradas em **b**, passando por um processo de redução do grupo alquenil ao grupo alquil correspondente, o que acontece concomitantemente à remoção do grupo protetor Cbz, via hidrogenação catalisada por Pd/C. Em seguida, o grupo amino é protegido com o grupo Fmoc, adequado à SPFS, pela reação com o éster hidroxissuccinimida de Fmoc (FmocOSu), em meio básico. A síntese foi realizada em escala de 2,0 g de **Cbz-Hyp-OH** e, após a purificação, o produto **Fmoc-PL-OH** foi obtido com 2,0 g em massa e rendimento global de 65%.

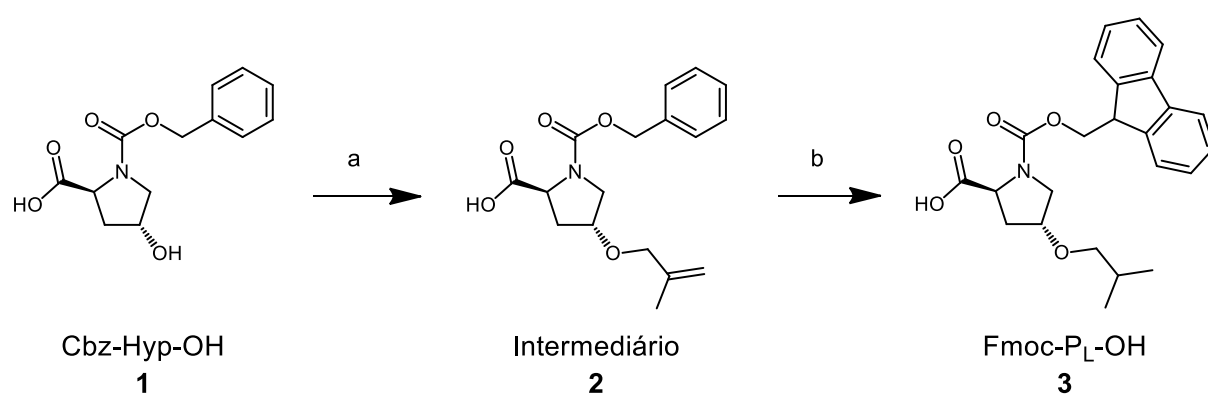


Figura 39. Síntese do aminoácido Fmoc-PL-OH a partir de 2,0 g de Cbz-Hyp-OH. **a.** i) NaH (3,5 eqv), PM 3 Å, THF, -40°C ; ii) 3-bromo-2-metil-propeno (4,0 eqv), -40°C , depois T.A., 18 h (88%). **b.** i) H_2 , Pd/C, MeOH, T.A., 6 h ii) FmocOSu (1,1 eqv), NaHCO_3 (3,0 eqv), acetona/água 1 : 1, T.A., 18 h (74%). Rendimento global: 2,0 g (65%).

A síntese de Fmoc-Pr(Boc)₂-OH, descrita por FILLON et al. (2005), envolve 5 etapas reacionais e apresenta rendimento global de 19%, conforme mostrado na **Figura 40. I**). Durante o período de realização deste trabalho, havia um protocolo de otimização sintética para Fmoc-Pr(Boc)₂-OH, sendo desenvolvido no grupo da Profa. Jean Chmielewski pela então aluna de doutorado, hoje Dra. Samantha Zeiders. Os resultados deste protocolo de síntese, em 3 etapas e com 50% de rendimento global, foram recentemente publicados (DIETSCHKE et al., 2020) e o esquema reacional é apresentado na **Figura 40. II**).

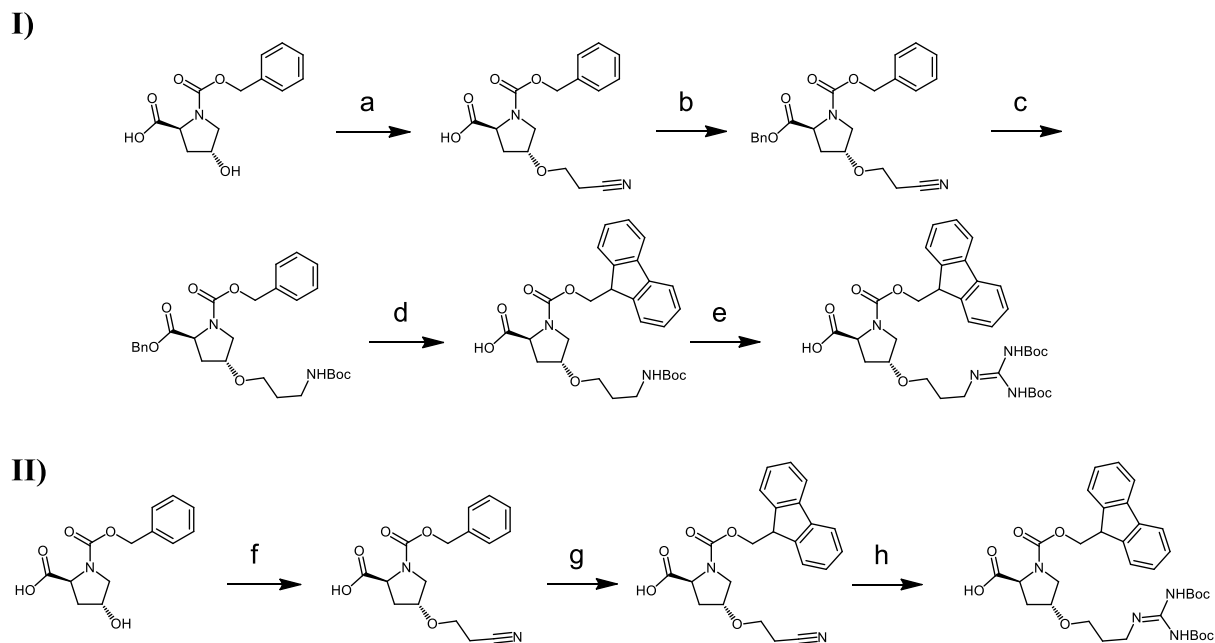


Figura 40. Síntese do aminoácido Fmoc-Pr(Boc)₂-OH descrita por FILLON et al. (2005) (**I**) e por DIETSCHÉ et al. (2020) (**II**). **I** a. i) NaH ii) acrilonitrila (70%); **b.** BnBr, K₂CO₃ (85%); **c.** CoCl₂, Boc₂O, NaBH₄ (70%); **d.** i) H₂, Pd/C; ii) Fmoc-OSu (60%); **e.** i) TFA; ii) TEA, *N,N'*-bis(tert-butoxicarbonil)-*N''*-trifilguanidina (75%). Rendimento global: 19%. **II** f. i) NaH; ii) acrilonitrila (80%); **g.** i) H₂, Pd/C ii) Fmoc-OSu (quant.); **h.** i) H₂, PtO₂, AcOH, MeOH; ii) *N,N'*-bis-Boc-1-guanilpirazole, TEA (62%). Rendimento global: 50%.

No momento em que a síntese de **Fmoc-Pr(Boc)₂-OH**, necessário para a execução deste trabalho, estava sendo realizada, o protocolo publicado por DIETSCHÉ et al. (2020) estava sendo refinado. Deste modo, foi desenvolvido uma rota sintética alternativa, apresentada na **Figura 41**. Inicialmente foi realizada uma reação de *O*-alquilação via mecanismo S_N2, de modo similar ao descrito na primeira etapa sintética da síntese **Fmoc-Pr-OH**. Um cuidado extra tomado para esta síntese foi o resfriamento prévio da solução contendo o eletrófilo (brometo de 3-(Boc-amino)-propila) a -40°C, e a manutenção da temperatura baixa por 5 h adicionais após sua adição. Este cuidado experimental visou reduzir o consumo de eletrófilo, via reação de eliminação de segunda ordem (E₂), potencialmente promovida pelo íon alcóxido da **Cbz-Hyp-OH**. Após purificação, o grupo protetor do intermediário sintético **4** foi substituído, obtendo-se **5**. Neste momento foi feito um protocolo de purificação por CCA em sílica gel, utilizando fase móvel contendo DCM/EtOAc/AcOH, em gradiente de eluição na proporção de 99 : 0 : 1 até 74 : 25 : 1, com incrementos de 5% de EtOAc a cada 500 mL de eluente. O objetivo da purificação, mais criteriosa nesta etapa, foi minimizar a ocorrência de impurezas após a etapa subsequente, última etapa da rota sintética. O grupo Boc foi removido em presença de TFA/DCM 1 : 1, sendo o grupo amino da porção aminopropil convertido em um grupo guanidínil *N,N'*-bis-Boc, protegido por reação *N,N'*-bis-Boc-1-guanilpirazol. Após esta etapa

foi possível a purificação, via CCA em sílica gel, utilizando DCM/MeOH 93:7, sem a necessidade de adição de ácido acético como modulador ácido, normalmente utilizado para melhorar a resolução cromatográfica no processo de purificação. A purificação sem a utilização de modulador é especialmente interessante, pois resíduos de AcOH são um problema para SPFS, uma vez que em presença dos reagentes de acoplamento estes resíduos causam a acetilação da cadeia peptídica, interrompendo o seu crescimento e reduzindo os rendimentos da síntese.

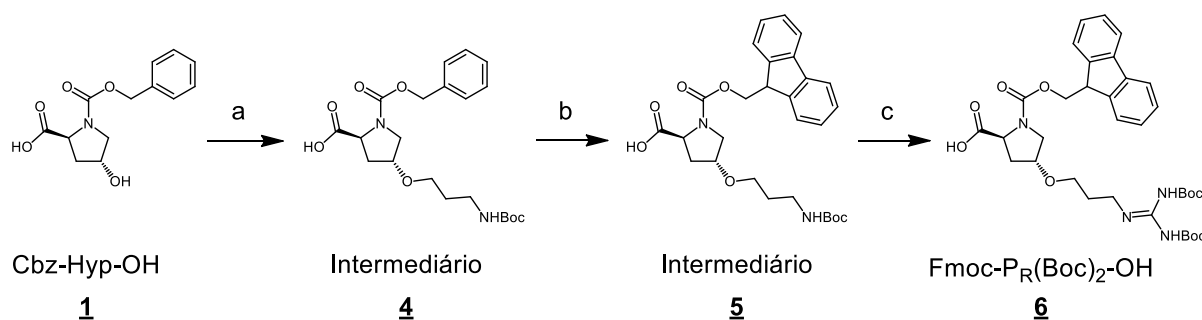


Figura 41. Síntese do aminoácido Fmoc-PR(Boc)₂-OH proposta neste trabalho (a partir de 2,0 g de Cbz-Hyp-OH): **a.** i) NaH (3,5 eqv), PM 3 Å, THF, -40°C; ii) brometo de 3-(Boc-amino)-propila (4,0 eqv), -40°C, 5 h, depois T.A., 18 h (92%); **b.** i) H₂, Pd/C, MeOH, T.A., 6 h ii) FmocOSu (1,1 eqv), NaHCO₃ (3,0 eqv), acetona/água 1 : 1, T.A., 18 h (72%); **c.** i) TFA/DCM 1:1, T.A. 2 h; ii) *N,N'*-bis-Boc-1-guanilpirazol, TEA, DCM, -0°C, depois T.A. 18 h (90%). Rendimento global: 2,9 g (60%).

4.2. Síntese do Conjugado Linezolida-Espaçador

A síntese do conjugado linezolida-espaçador, via conexão imida, se deu em duas etapas reacionais, a partir da adaptação de protocolo previamente descrito para a *N*-acilação de amidas secundárias (SHANG et al., 2015). Por se tratar de um substrato complexo, a estrutura da linezolida (**7**) foi caracterizada por RMN ¹H e ¹³C, respectivamente a 400 MHz e 100 Mhz em CDCl₃ (Anexo 7.1.6, pág. 140). Uma proposta de atribuição dos sinais observados é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Proposta de atribuição de sinais de RMN ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz), observados para a linezolida (**7**), em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Posição	δ _H	δ _C	Posição	δ _H	δ _C
1	2.02	23.11	9	7.06	113.91
2	-	171.14	10	6.92	118.85
3	6.35	-	11	-	136.60
4	3.64	41.94	12	-	156.69/
5	4.78	71.94	13	-	154.25
6	4.02/3.77	47.64	14	7.43	107.66
7	-	154.38	15	3.05	51.01
8	-	132.96		3.87	66.94

A primeira etapa reacional envolveu a conversão da do grupo amida da linezolida em um grupo tioamida, promovida pelo reagente de Lawesson, em refluxo em THF, conforme mostrado na **Figura 42**.

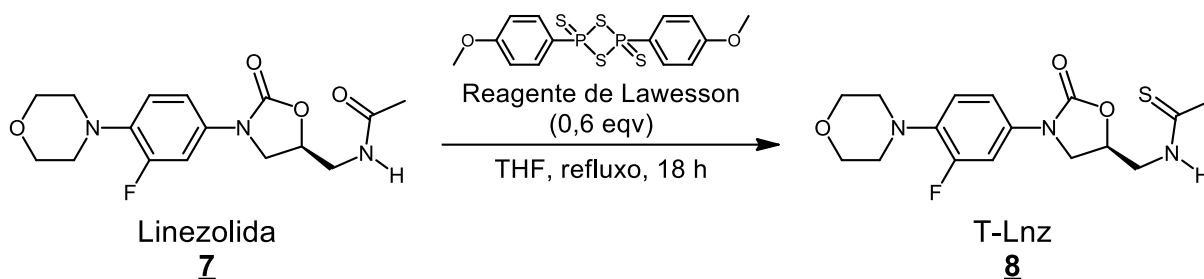


Figura 42. Conversão da linezolida na tioamida correspondente, utilizando reagente de Lawesson.

A proposta mecanística para tionilação, via reagente de Lawesson, é apresentada na **Figura 43**. O reagente de Lawesson (**i**) é uma estrutura dimérica, cuja dissociação dá origem a duas unidades ditiofosfato (**ii**) que, por sua vez, é um híbrido de ressonância com o ílideo ditiofosfina (**iii**), capaz de formar ligações fortes com oxigênio. A partir do ataque de um substrato carbonilado (**iv**) a (**iii**) ocorre a formação do intermediário tiaoxofosfetano (**v**) que, via decomposição análoga a uma reação de Wittig, dá origem ao produto tionilado (**vi**) e ao subproduto tiofosfato (**vii**) (JESBERGER et al., 2003).

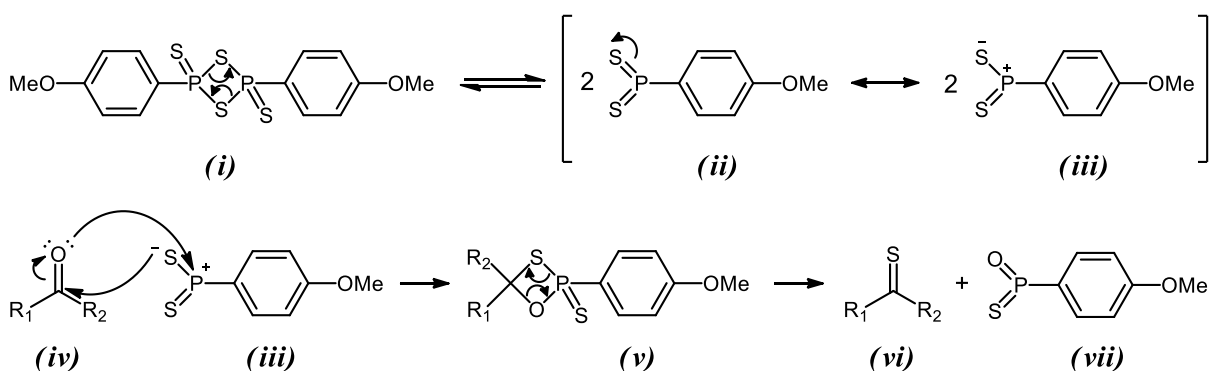


Figura 43. Proposta mecanística para tionilação, utilizando reagente de Lawesson (JESBERGER et al., 2003).

Na estrutura da linezolida estão presentes 2 porções potencialmente conversíveis por reação com reagente de Lawesson: uma carbonila ligada a N, de um grupo amida, e outra carbonila ligada a N e O, de um grupo carbamato. Há, no entanto, indicações na literatura de que o reagente de Lawesson reage seletivamente com amida em presença de carbamato (JOSSE et al., 1999; OZTURK et al., 2007). Esta seletividade foi verificada também para a reação de formação da tioamida da linezolida, conforme interpretação dos dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz), em CDCl_3 (**Figura 44**). Duas alterações principais foram

observadas entre os espectros de RMN ^1H de reagente e produto: a mudança do sinal correspondente ao grupo metila da acetamida da linezolida de δ 2,02 ppm para δ 2,60 ppm, correspondente à metila da tioacetamida de **TLnz (8)**; e o sinal do grupo NH da amida em δ 6,35 ppm no espectro da linezolida, contra δ 8,57 ppm, referente ao NH da tioamida em **TLnz (8)**. As variações observadas entre os espectros da amida e da tioamida correspondente estão de acordo com os dados disponíveis na literatura (AVALOS et al, 1992). Os sinais dos grupos próximos ao grupo carbamato, por sua vez, sofreram alterações não superiores a 0,25 ppm, comparando-se os dados espectrais de reagentes e produtos, indicando que esta porção da molécula não foi alterada pelo reagente de Lawesson. Esta observação foi corroborada por RMN ^{13}C , onde os sinais correspondentes às carbonilas de carbamato de reagente e produto foram observadas em regiões próximas, em δ 154,38 ppm e δ 154,61 ppm, respectivamente. Já o sinal correspondente à carbonila da amida da linezolida, em δ 171,14 ppm, divergiu significativamente do sinal correspondente à tionila da tioamida de **TLnz (8)** em δ 203,80 ppm.

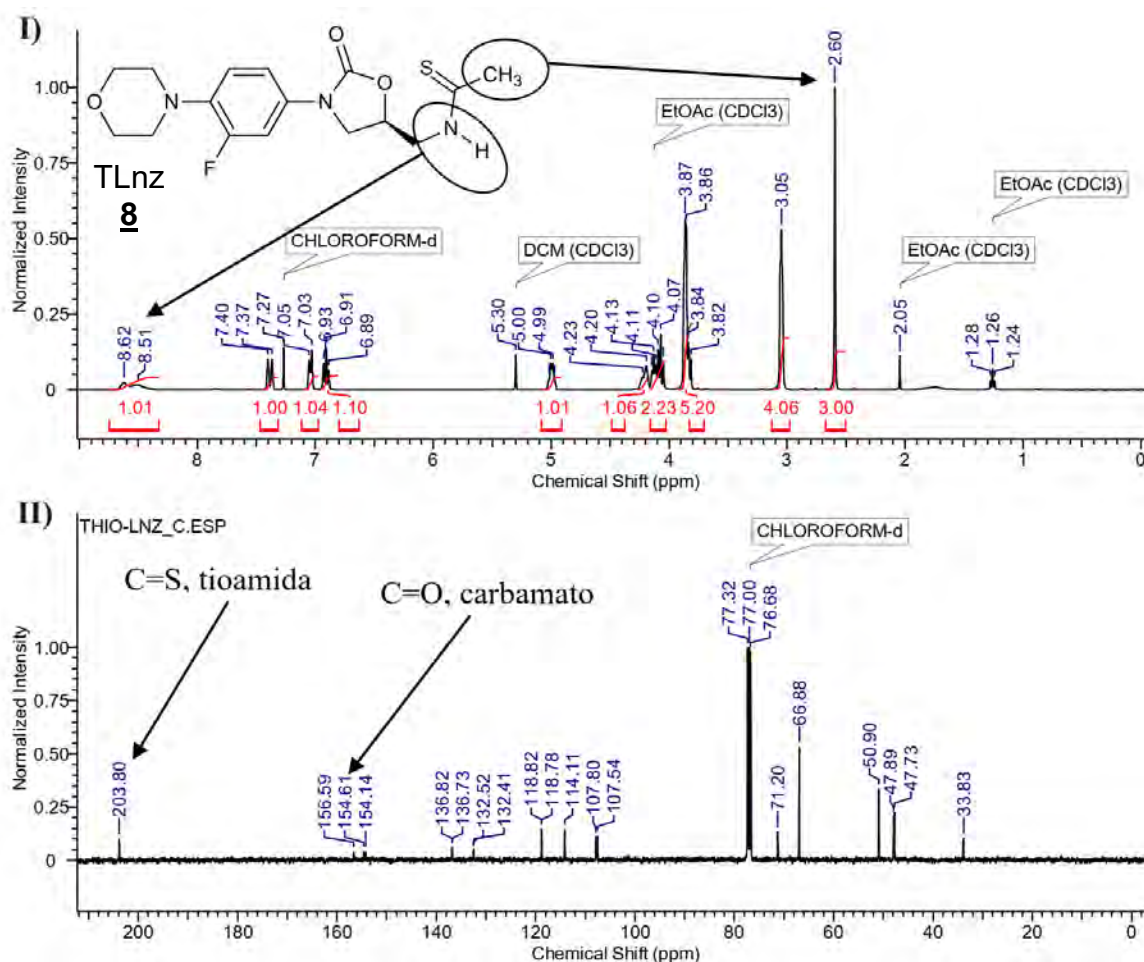


Figura 44. Espectros de **I)** RMN ^1H (400 MHz) e **II)** ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 de **TLnz (8)**, confirmando a tionilação seletiva na porção amida da linezolida.

A etapa subsequente envolveu a conversão de tioamida em imida, via reação de dessulfuração/acilação, em presença de carbonato de prata. O mecanismo proposto para esta reação é apresentado na **Figura 45**. O enxofre da tioamida (*i*) se coordena com o um cátion prata do sal carbonato (*ii*). Ao se coordenar com um segundo cátion prata (*iii*), o enxofre é eliminado, na forma de sulfeto de prata, levando à formação do íon alquilnitrílio (*iv*). O ácido carboxílico (*v*), que se encontra desprotonado (*vi*), ataca o íon alquilnitrílio (*iv*) para formar o intermediário *O*-acilisoimida (*vii*), que sofre então um rearranjo de Mumm, para dar origem à imida (*viii*) correspondente (BRADY et al., 1980; AVALOS et al., 1994; AVALOS et al., 1997; SHANG et al., 2015).

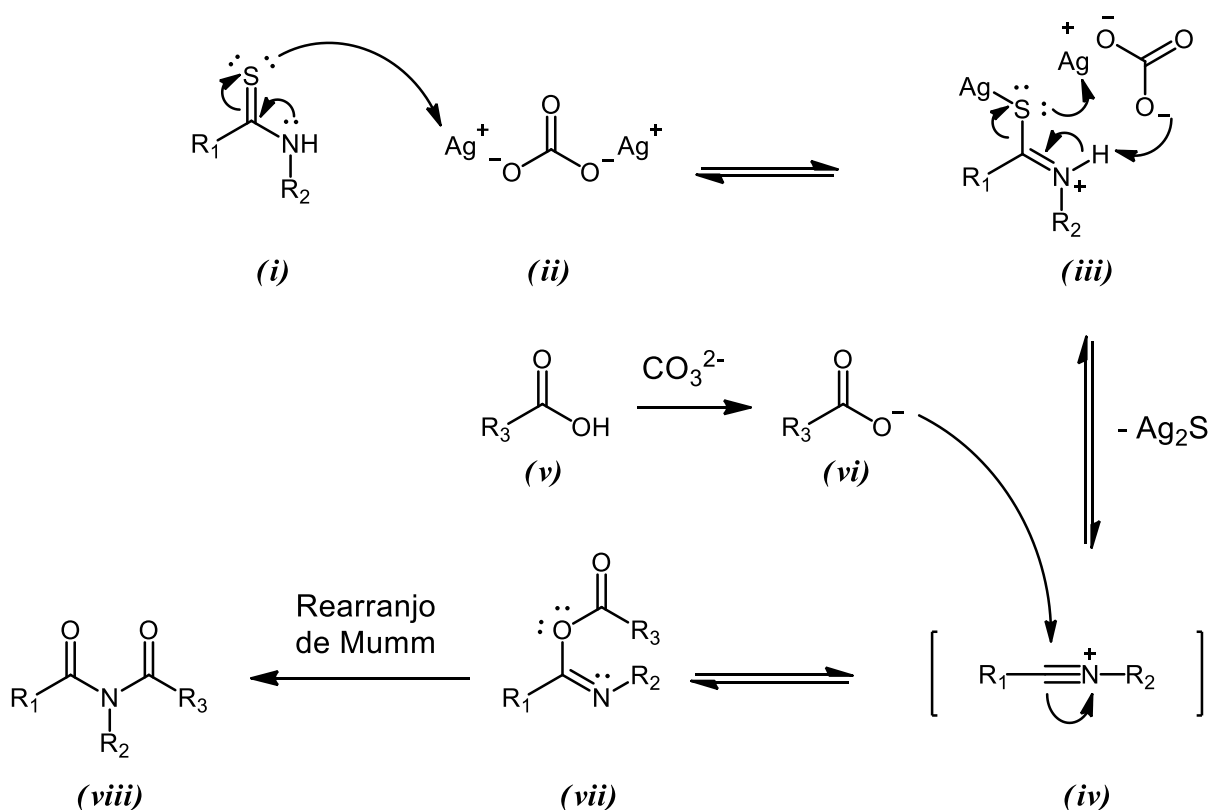


Figura 45. Proposta mecanística para a formação de imidas, a partir de tioamidas, por dessulfuração/acilação, em presença de carbonato de prata.

O intermediário sintético tioamida **TLnz (8)** foi, desta forma, convertido em imida via acilação com ácido 4,4'-ditiodibutírico (**DTBA, 9**), concomitante à dessulfuração, em presença de carbonato de prata para gerar o conjugado linezolida-espaçador **Lnz-DTBA (10)**. Por se tratar de um diácido, foi utilizado excesso de 6,0 eqv. de DTBA para evitar a formação de dímero. O esquema reacional é mostrado na **Figura 46**. Foram recuperados, após a purificação, além do produto de interesse (67%), o dímero **(Lnz)₂DTBA (37)** (3%) e o fármaco linezolida (**7**) (18%). A formação de linezolida também era esperada nesta reação, uma vez que este seria

o produto obtido do ataque de íons carbonato ou bicarbonato, presentes no meio reacional, ao íon alquilnitrílo, mostrado no mecanismo anteriormente discutido.

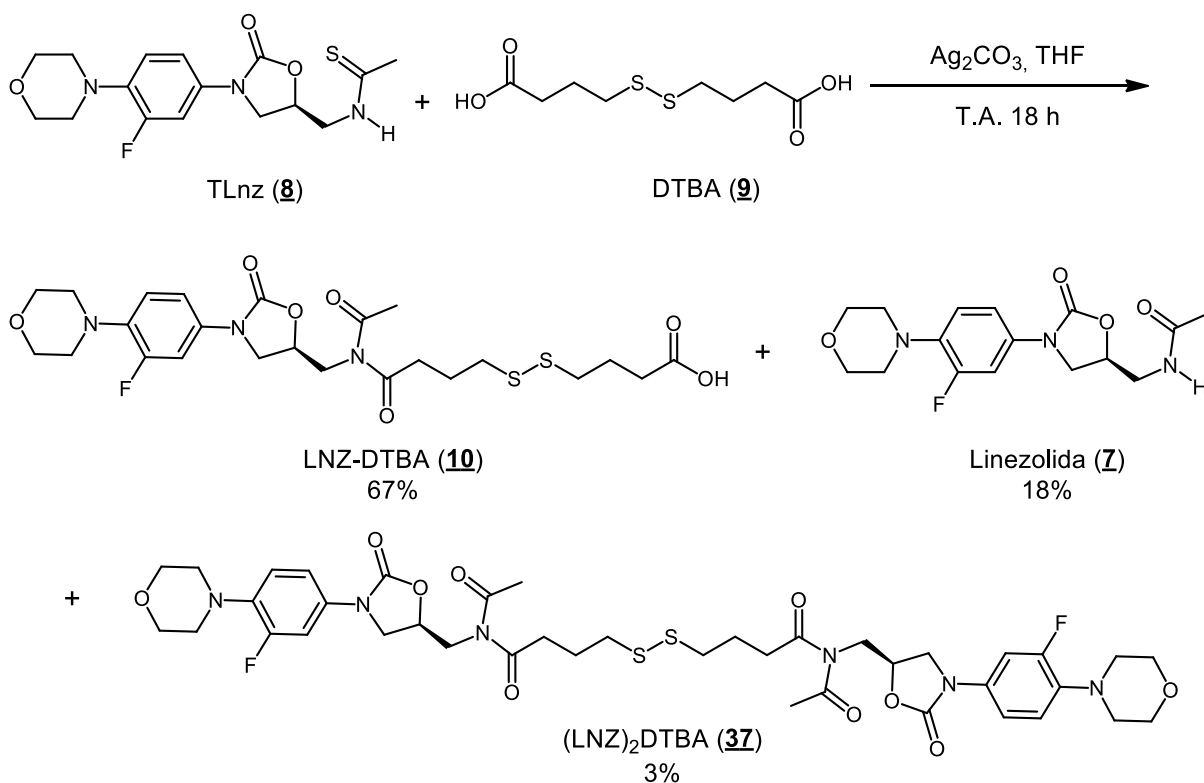


Figura 46. Esquema reacional para a síntese de Lnz-DTBA por dessulfuração/acilação mediada por carbonato de prata. Foram obtidos também os subprodutos linezolida e $(\text{Lnz})_2\text{DTBA}$.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 47 e 48) confirmaram a síntese e obtenção do produto desejado. Destaque, no espectro de RMN ^1H , para a ausência do sinal correspondente a NH de amida ($\delta \sim 6,3$ ppm), além da ocorrência de sinais na região de alifáticos ($\delta = 2,0 - 3,0$ ppm), condizentes com os metilenos da cadeia do espaçador. Já no espectro de RMN ^{13}C destacam-se os sinais correspondentes às carbonilas da imida ($\delta = 175,55$ ppm e $173,55$ ppm), ácido carboxílico ($\delta = 175,55$ ppm), e carbamato ($\delta = 153,83$ ppm).

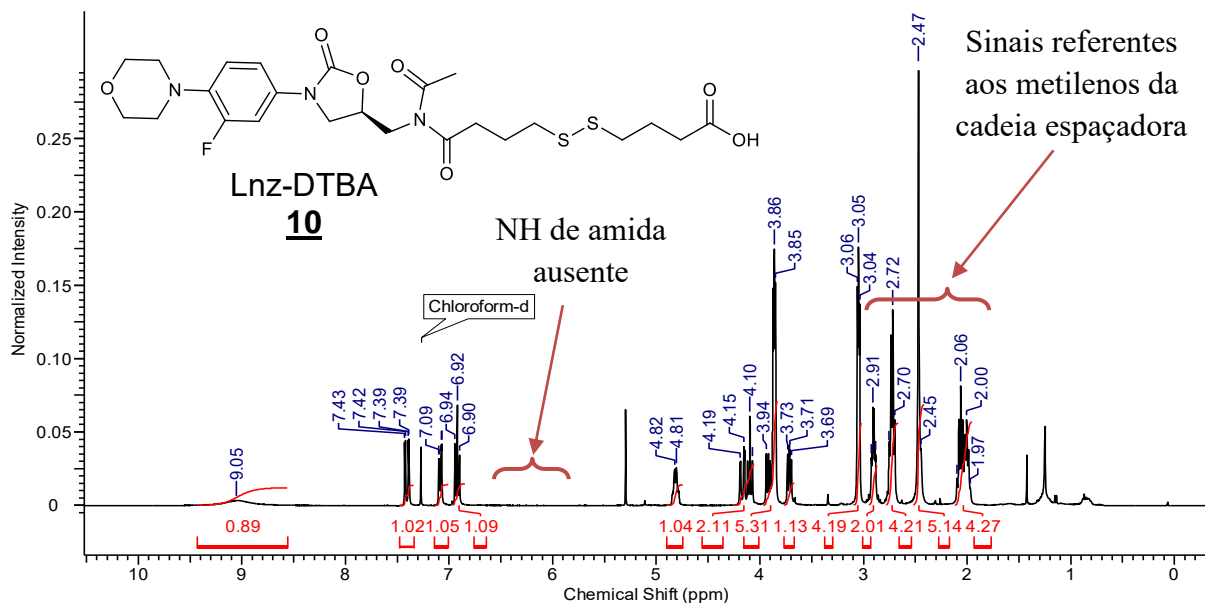


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para **Lnz-DTBA (10)**.

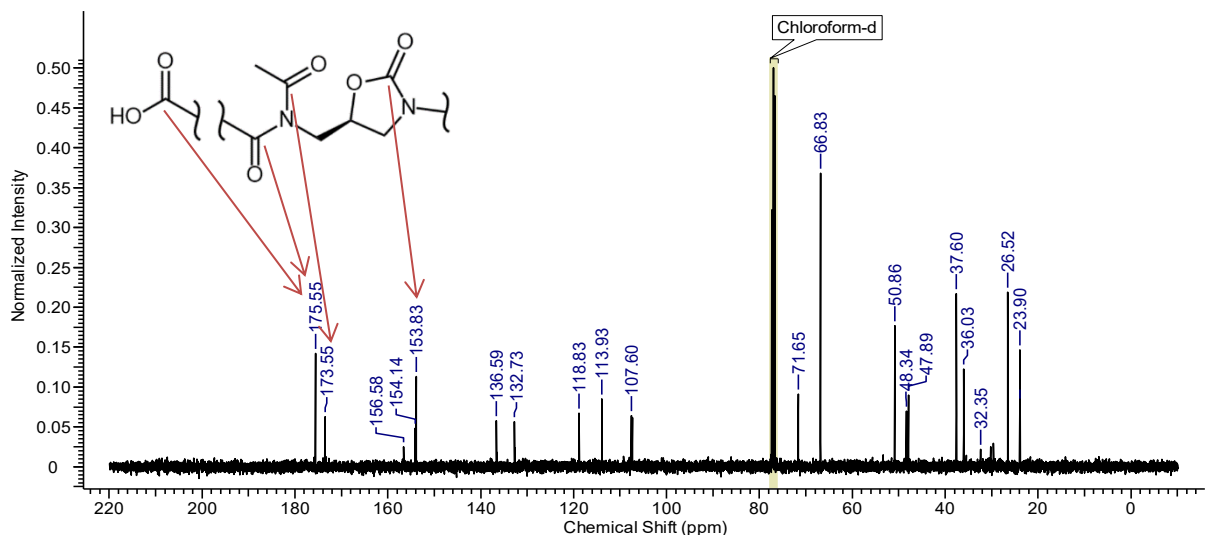


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para **Lnz-DTBA (10)**.

4.3. Construção de Cadeias Peptídicas por SPFS

A aplicação da SPFS neste trabalho permitiu a construção de cadeias peptídicas, bem como sua conjugação a micromoléculas, quer seja grupos farmacofóricos ou sondas fluorescentes. Os aminoácidos ortogonalmente protegidos com grupo Fmoc, lábil em meio básico de piperidina, na porção α -amino e com grupos Boc, Pbf ou Mtt, lábeis em meio ácido, presentes nas funcionalidades das cadeias laterais, se mostram adequados ao protocolo, conforme descrito na literatura. A utilização de reagentes de acoplamento (HATU e DIPEA) ou de ésteres reativos (*O*-succinimidil), permitiu a formação de ligações amida em reduzidos

tempos de reação, e sem a formação apreciável de subprodutos. E a estratégia de construção da cadeia peptídica covalentemente ligada à resina polimérica possibilitou a remoção, a cada etapa, de reagentes em excesso e subprodutos em solução, via procedimentos de lavagem. A **Figura 49** mostra um esquema geral resumido da SPFS aplicada a este trabalho, incluindo os protocolos experimentais descritos da **Seção 3.6** à **3.13** (pág. 56 – 58).

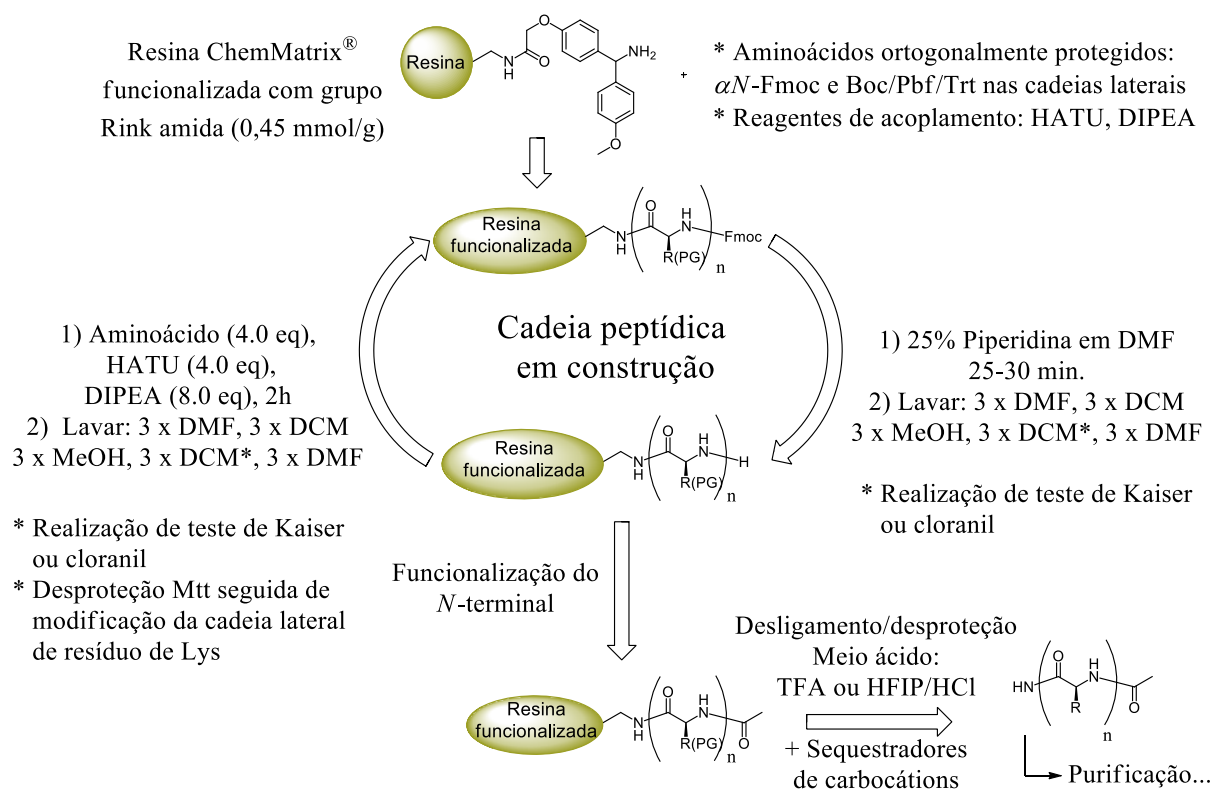


Figura 49. Esquema para a SPFS aplicada a este trabalho.

Cabe salientar que a ocorrência de múltiplos resíduos de Arg(Pbf) na estrutura do peptídeo pode levar à desproteção incompleta das cadeias laterais durante a reação de desligamento/desproteção. Isso se deve à maior estabilidade relativa do grupo Pbf (pág. 36) em comparação aos demais grupos protetores lábeis em meio ácido utilizados em SPFS (CARPINO et al., 1993). Para minimizar este problema foram utilizados tempos de reação estendidos para peptídeos contendo múltiplos resíduos de Arg(Pbf). De modo geral, para até 2 resíduos de Arg(Pbf) presentes na sequência, os tempos de reação foram de 2 h (TFA), ou 3h (HFIP/HCl). Estes tempos reacionais são os mesmos aplicados a sequências peptídicas em geral. A cada 2 resíduos de Arg(Pbf) adicionais foi adicionada mais 1 h de reação.

O produto **P₂-4 (21)** apresentou problemas de solubilidade após a etapa de precipitação e foi recuperado, após a purificação por CLAE, em quantidades suficientes somente para a caracterização química, mas não para a realização de ensaios biológicos *in vitro*.

4.4. Síntese de Conjugados Peptídeo-Fármaco Utilizando SPFS

A síntese do fármaco linezolida, conjugado ao espaçador ditiodibutiril com ácido carboxílico livre (**Lnz-DTBA**, **10**), possibilitou que a síntese de conjugados peptídeo-fármaco pudesse ocorrer via metodologia SPFS, utilizando suporte sólido polimérico e construção da ligação amida entre o grupo carboxila de **Lnz-DTBA** e a porção *N*-terminal desprotegida do peptídeo ligado à resina, com as cadeias laterais protegidas. A primeira reação deste tipo foi realizada utilizando a sequência de aminoácidos do peptídeo **P1-2**, para formar o conjugado **Lnz-P1-2** (**29**), mostrado na **Figura 50** ligado à resina e com as cadeias laterais protegidas.

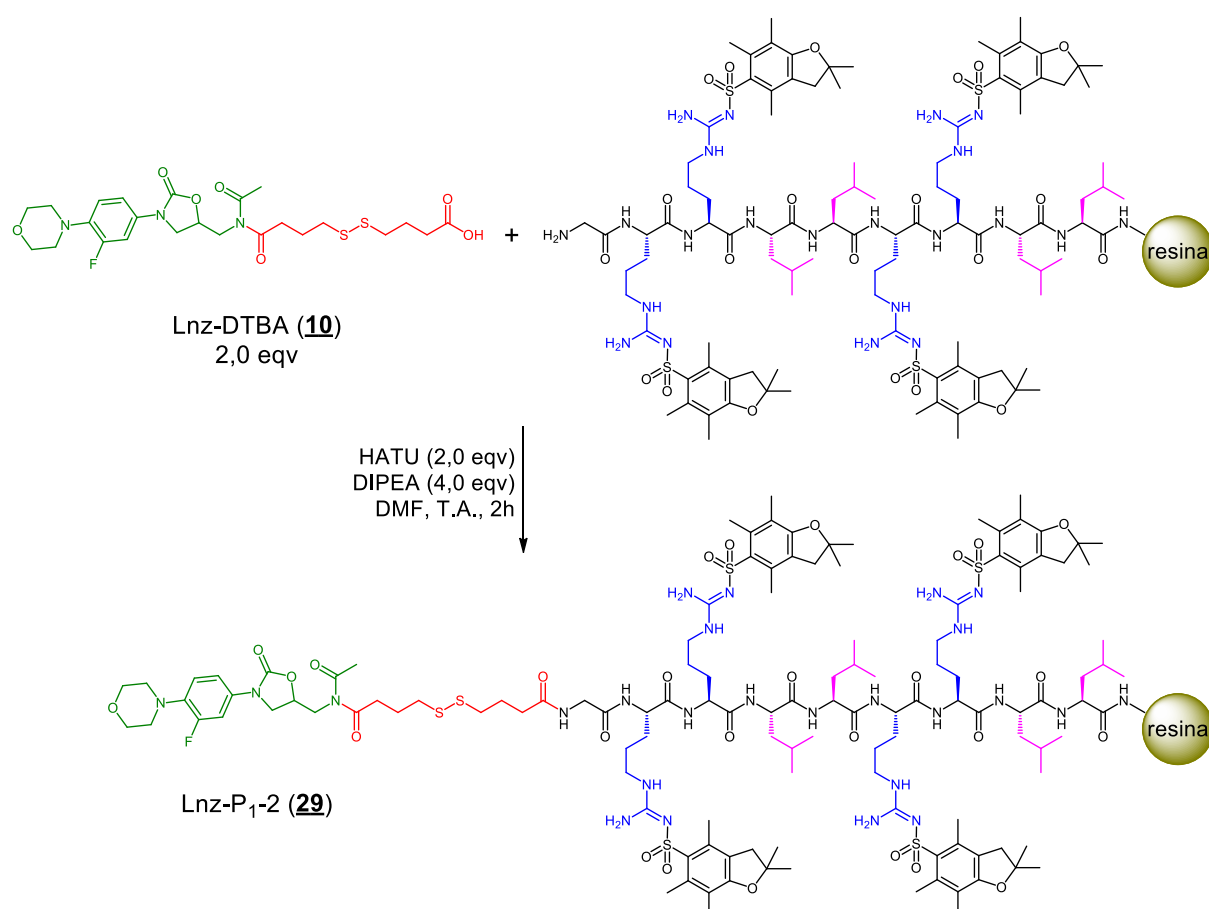


Figura 50. Esquema para a síntese do conjugado peptídeo-fármaco **Lnz-P1-2**, via SPFS.

Após a reação de acoplamento, foi realizado um teste de desligamento/desproteção utilizando uma pequena quantidade de resina (4–5 unidades) com TFA/TIPS/H₂O 95 : 2,5 : 2,5 por 30 min, seguida de espectrometria de massas por MALDI-ToF, para confirmar a eficiência da síntese. Além do sinal característico do produto, após a desproteção (m/z_{obs} 1691 $[M+H]^+$, m/z_{calc} 1691), foram observados também 2 sinais característicos: m/z 1649 $[M-42]^+$, relativo à desacetilação do grupo imida, e m/z 1372 $[M-339]^+$, relativo à perda do fármaco linezolida, via

reação de hidrólise do grupo imida. Desta forma foi utilizado protocolo de desligamento/desproteção utilizando HFIP/HCl_(conc)/TIPS 94 : 1 : 5, descrito por PALLADINO e STETSENKO (2012). As condições práticas mais brandas deste meio reacional foram adequadas para minimizar a formação de subprodutos de hidrólise do grupo imida. Ao mesmo tempo foram suficientemente ácidas para promover a remoção até mesmo dos grupos protetores Pbf, após 4 h de reação, os quais relativamente mais e resistentes à remoção em meio ácido. Utilizando este protocolo, além de **Lnz-P₁-2 (29)**, outros dois conjugados peptídeo-fármaco foram obtidos: **Lnz-P14LRR (33)**, via modificação do *N*-terminal da hélice poliprolina **P14LRR**, e **Lnz-FI-P14LRR (34)**, uma versão análoga, contendo um resíduo de Lys, marcado com a sonda fluorescente 5(6)-carboxifluoresceína (**Figura 51**).

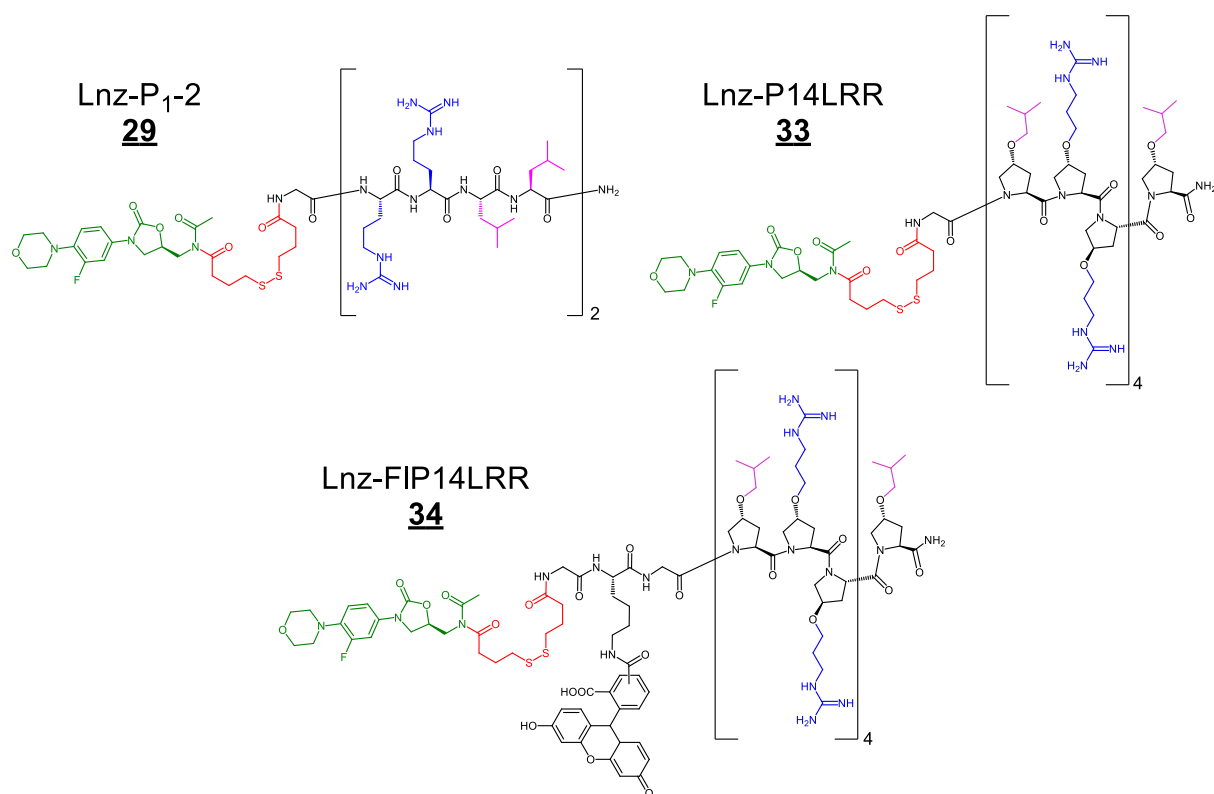


Figura 51. Estrutura dos conjugados entre peptídeos e o fármaco linezolida sintetizados neste trabalho.

4.5. Síntese de Híbridos Peptídeo-Benzimidazol com Controle da Estereoquímica

A partir do sucesso da conjugação do fármaco linezolida com o espaçador **DTBA**, via acilação do grupamento amida, nosso planejamento original incluía também a síntese de uma versão análoga, utilizando o fármaco anti-*T. cruzi* benzimidazol, que também possui em sua estrutura uma amida secundária. Para viabilizar a conjugação deste eventual intermediário fármaco-espaçador com peptídeos foram pensadas duas estratégias: através de um grupo

carboxila na extremidade de uma cadeia ditiodibutiril (**Bzd-DTBA**, **38**), ou por meio de uma reação de troca tiol/dissulfeto entre um peptídeo, contendo grupo tiol desprotegido, e o fármaco funcionalizado com grupo 4-(2-piridinildissulfanil)butiril (**Bzd-PSBA**, **39**). No entanto, todas as tentativas de síntese executadas no sentido de se obter qualquer uma das opções de fármaco funcionalizado, adequado à conjugação com os peptídeos planejados, falharam. As metodologias detalhadas, referentes às tentativas de síntese, bem como os resultados em cada caso, não foram apresentados na **Seção 3** deste trabalho. A **Figura 52**, no entanto, traz as estruturas almejadas de **Bzd-DTBA** (**38**) e **Bzd-PSBA** (**39**), bem como um panorama resumido das tentativas de síntese, sem sucesso, objetivando a obtenção dos produtos.

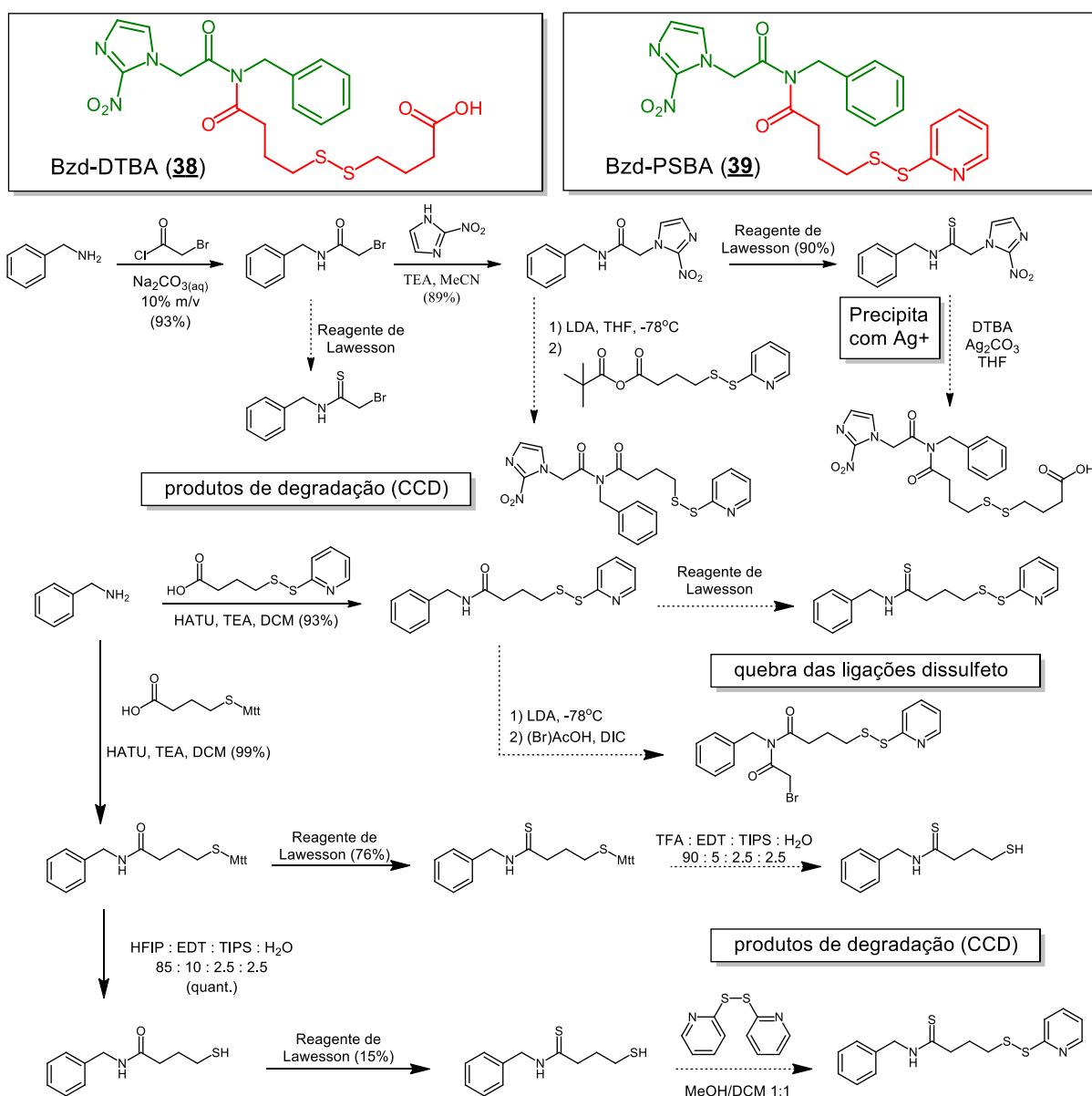


Figura 52. Resumo das tentativas de síntese de **Bzd-DTBA** (**38**) e **Bzd-PSBA** (**39**). As setas tracejadas representam reações que falharam. Comentários sobre as observações feitas, quanto aos resultados das tentativas mal sucedidas, aparecem em caixas próximas a cada situação.

Desta forma, nós decidimos construir conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, diretamente ligado à sequência peptídica, via ligação amida. Para tanto, foram acoplados ao peptídeo ligado à resina, via protocolo padrão de SPFS, o aminoácido protegido Fmoc-fenilglicina (Fmoc-Phg), seguindo-se da desproteção Fmoc do grupo *N*-terminal e subsequente acoplamento do ácido (2-nitroimidazolil)-acético (**13**), conforme mostrado na **Figura 53**.

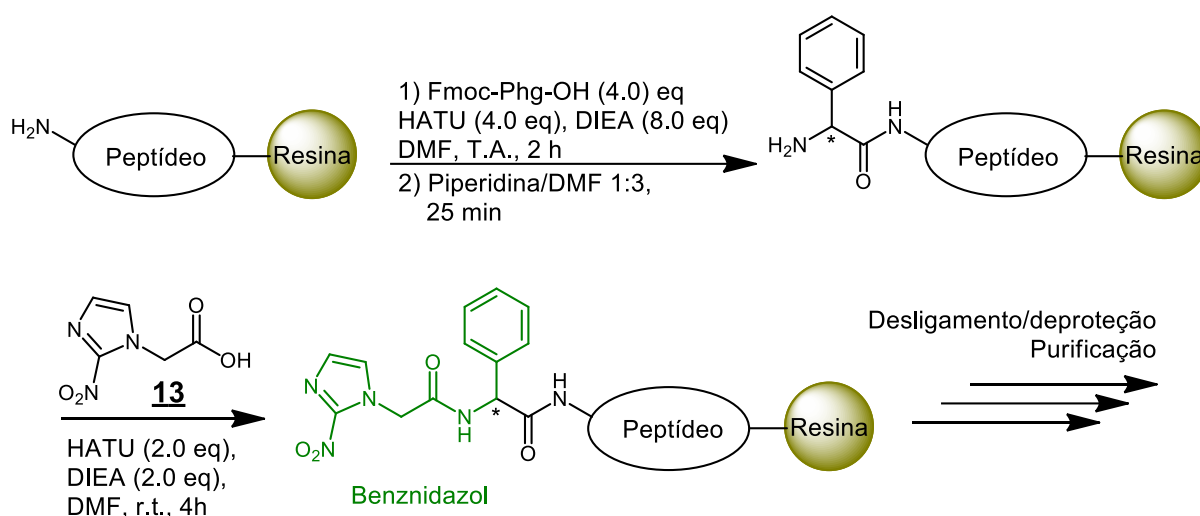


Figura 53. Esquema para a síntese de conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, via metodologia SPFS.

Foram utilizados tanto a Fmoc-L-Phg quanto a Fmoc-D-Phg com o intuito de se avaliar a influência da estereoquímica do carbono benzílico na etapa de avaliação biológica. Para a primeira tentativa de síntese foi utilizada a sequência peptídica de **P₁₋₂** para se obter o conjugado peptídeo-fármaco **Bzd-P₁₋₂**. No entanto, após desligamento/desproteção com TFA/TIPS/H₂O 95 : 2,5 : 2,5, tanto a síntese com a Fmoc-L-Phg quanto a Fmoc-D-Phg levaram a produtos com o perfil cromatográfico indicado na **Figura 54**, que indica a formação de dois produtos principais em mistura. Recolhendo-se as frações referentes a ambos os picos principais do cromatograma, $t_R = 18,5$ min e $t_R = 19,3$ min, e analisando-as por MALDI-ToF, pudemos observar o m/z 1438, referente ao íon molecular protonado [M+H] (calculado: 1437,9). Esta observação, juntamente com o fato de a proporção entre os produtos em ambos os casos ser de cerca de 1 : 1, nos levou à conclusão de que estava ocorrendo a racemização do aminoácido Phg durante o procedimento de acoplamento com HATU e DIPEA, comportamento que havia sido previamente descrito (LIANG et al., 2017).

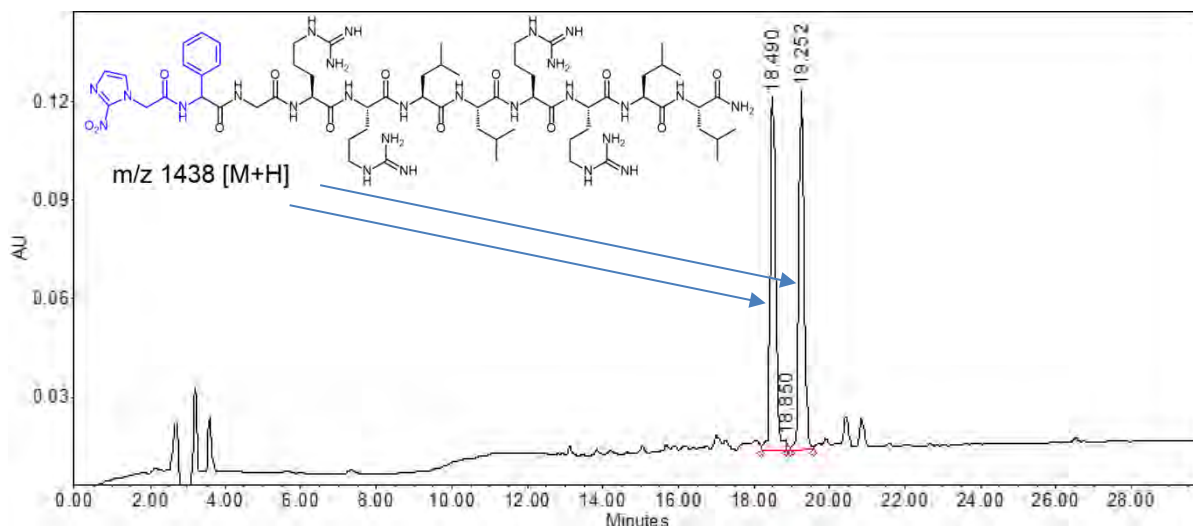


Figura 54. Estrutura do conjugado **Bzd-P1-2** e o cromatograma de CLAE-FR analítico, representativo dos materiais brutos, após a síntese sob condições padrão de SPFS, utilizando tanto a *L*-Phg quanto a *D*-Phg.

Para realizar a síntese com controle da estereoquímica durante o acoplamento de aminoácidos Fmoc-Phg, nós utilizamos as modificações no protocolo SPFS reportadas por LIANG et al (2017). Na etapa de acoplamento do aminoácido foi utilizado o reagente de acoplamento COMU (hexafluorofosfato de (1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilideno)dimetilamino-morpholino-carbênio) e como base TMP (2,4,6-trimetilpiridina), em DMF por 1 h. Para a desproteção Fmoc foi utilizada mistura 1 : 9 de piperidina em DMF por 10 e 5 minutos. O esquema representativo de síntese, utilizando a *L*-Phg como exemplo, é mostrado na **Figura 55**. A utilização desta metodologia permitiu a síntese com controle da estereoquímica do produto **Bzd(S)-P1-2 (30)**, cujo cromatograma de CLAE-FR analítico do material bruto após desligamento/desproteção é mostrado na **Figura 56**, com detalhe do cromatograma obtido nas mesmas condições para **Bzd(R)-P1-2 (31)**.

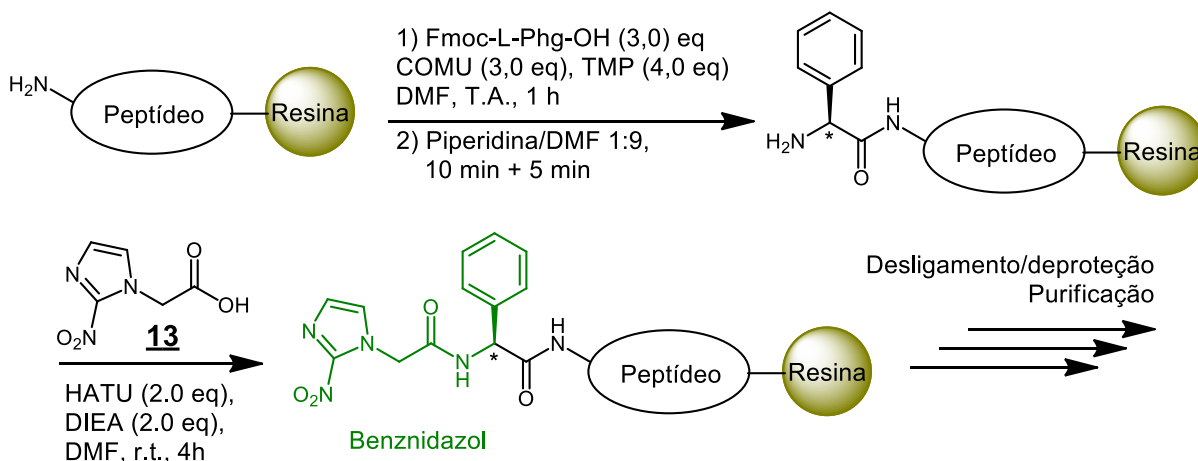


Figura 55. Esquema para a síntese de conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, via metodologia SPFS, com controle da estereoquímica do produto.

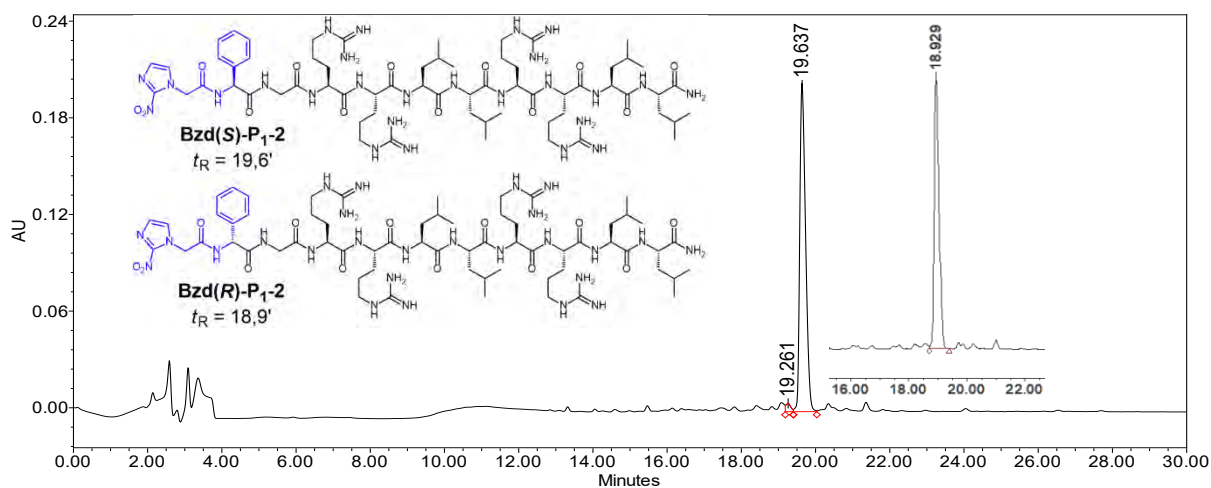


Figura 56. Estruturas dos conjugados **Bzd(S)-P₁-2** e **Bzd(R)-P₁-2** e o cromatograma de CLAE-FR analítico, representativo dos materiais brutos após a síntese de **Bzd(S)-P₁-2**, com detalhe do cromatograma obtido para **Bzd(R)-P₁-2**, sob as mesmas condições.

Utilizando a metodologia citada, foi possível realizar a síntese dos conjugados peptídeo-fármaco **Bzd(S)-P₁-2** (**30**), **Bzd(R)-P₁-2** (**31**), **Bzd(S)-P₁₄LRR** (**35**) e **Bzd(R)-P₁₄LRR** (**36**), cujas estruturas são mostradas na **Figura 57**, a seguir. Os produtos foram caracterizados por EM-MALDI-ToF.

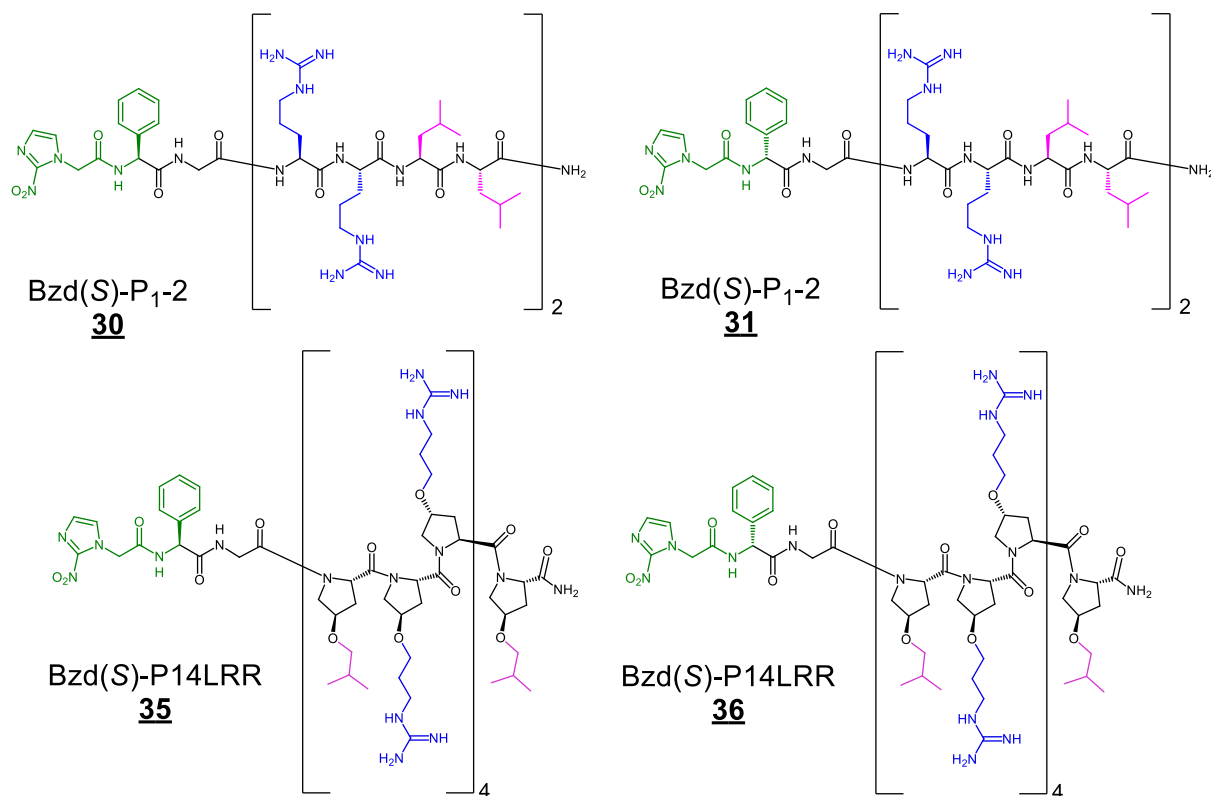


Figura 57. Estruturas dos conjugados peptídeo-fármaco com o benzimidazol, sintetizados neste trabalho.

4.6. Purificação, Caracterização e Preparo de Soluções-Estoque de Peptídeos e Conjugados Peptídeo-Fármaco

Subsequentemente ao desligamento da resina, e em concomitância com as desproteções das cadeias laterais, o peptídeo foi precipitado em éter etílico gelado, e purificado por CLAE-FR, em escala semipreparativa. Foi utilizada uma coluna C18 (5 μ m, 250 \times 21,2 mm) e fase móvel composta por ACN/H₂O, em gradiente, contendo 0.1% TFA como modulador de fase, em fluxo de 12 mL/min. A utilização de TFA, como modulador de fase, se deve à sua maior volatilidade, em comparação a outros moduladores ácidos, o que é conveniente para sua remoção por liofilização, após a purificação do produto. Para controle da pureza, os produtos foram analisados por CLAE-FR, em escala analítica, em coluna C18 (5 μ m, 250 \times 4,6 mm). As análises foram conduzidas com ACN/H₂O + 0,1% TFA como fase móvel, em gradiente, sob fluxo contínuo de 1,2 mL/min. Na **Figura 58** é mostrada uma composição entre dois cromatogramas, obtidos durante o processo de purificação em escala semipreparativa (**A**), e após a liofilização do peptídeo **P1-2** (AcYGRLLRLL-NH₂) (**15**) em escala analítica (**B**).

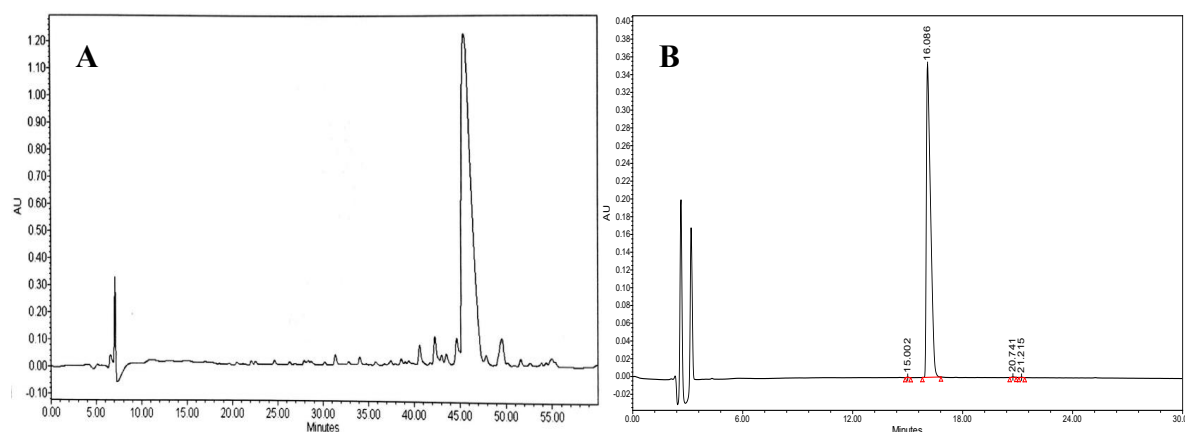


Figura 58. Exemplo de cromatogramas de CLAE-FR para o peptídeo P₁₋₂ obtidos durante a purificação em escala semipreparativa (**A**) e para o produto puro em escala analítica (**B**).

Todos os peptídeos e conjugados peptídeos-fármacos foram caracterizados por espectrometria de massas (EM), utilizando MALDI-ToF. Ácido α -ciano-4-hidroxicinânimo foi utilizado como matriz de suporte para a ionização a laser, pelo mesmo apresentar bom rendimento na detecção peptídeos e proteínas com até 5000 Da (ZAIMA et al., 2010).

Após o processo de liofilização é comum a formação de sais entre porções protonáveis dos peptídeos e o trifluoroacetato, remanescente do processo de purificação por CLAE-FR. Ademais, a umidade não é completamente removível pelo processo de liofilização, além do fato de os próprios peptídeos e conjugados, nas suas formas sólidas, serem higroscópicos. (GATLIN et al., 2007; ROUX et al., 2008) Dessa forma, é de se esperar que a massa aferida ao fim do

processo de liofilização não corresponda a massa real de produto obtido. Para se corrigir este desvio, após a preparação das soluções estoque em água ultrapura, as respectivas concentrações foram verificadas por leitura de absorbância no UV/Vis. As soluções-estoque foram primeiramente diluídas nas soluções tampão adequadas. Para o caso de peptídeos das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** foi utilizado tampão de cloreto de guanidínio para se induzir o desenovelamento dos produtos em nível de estrutura secundária, permitindo assim que os cromóforos presentes interagissem mais efetivamente com a luz. Já para os peptídeos da série **P14LRR**, cujo esqueleto helicoidal é mais rígido, foi utilizado tampão Tris-HCl para manutenção do pH básico (pH 8,5) e quantificação adequada do cromóforo 5(6)-carboxifluoresceína (PACE et al., 1995; NOBLE et al., 2009; AITKEN e LEARMONTH, 2009; SABNIS, 2015). No caso dos conjugados peptídeo-fármaco, os principais cromóforos eram as estruturas dos próprios fármacos, linezolida ou benznidazol. Desta forma foram construídas curvas de calibração para cada situação, utilizando os fármacos em diferentes concentrações, que foram comparadas com as medidas obtidas nas mesmas condições para os conjugados. O monitoramento para os conjugados com linezolida ocorreu em 254 nm e para os conjugados com benznidazol em 330 nm, valores dos máximos de absorção no UV para os respectivos fármacos.

4.7. Caracterização da Estrutura Secundária de Peptídeos por Dicroísmo Circular

Peptídeos selecionados das séries **P₁** e **P₂** foram avaliados por CD para investigação quanto à sua estrutura secundária em solução. Os peptídeos da série **P₃** não foram avaliados, uma vez que a ocorrência de múltiplos resíduos de triptofano, cuja cadeia lateral absorve na região espectral investigada, interfere no experimento (JUBAN et al., 1997). Os espectros foram recolhidos em tampão fosfato, na presença ou ausência de 25% trifluoroetanol (TFE). O TFE atua simultaneamente, aumentando a hidrofobicidade do meio e reduzindo o efeito de solvatação da água sobre a cadeia peptídica. Dessa forma, favorecem-se as interações via ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácido nas sequências peptídica, aumentando seu caráter alfa-helicoidal ou de folha beta em solução (BODKIN e GOODFELLOW, 1996; KENTISIS e SOSNICK, 1998). Argumenta-se, inclusive, que esta estratégia é interessante para se inferir quanto ao comportamento de peptídeos, quando estes se encontram permeando a membrana citoplasmática, uma vez que esta condição mimetiza suas características químicas como hidrofobicidade e baixa disponibilidade de água (CHEN et al., 2007). Nas **Figuras 59–62** são mostrados os espectros de CD obtidos para **P₁-2 (15)**, **P₁-3 (16)**, **P₁-4 (17)** e **P₂-3 (20)**,

respectivamente. Nota-se que, na presença de TFE todos os peptídeos apresentaram estruturas secundárias bastante características, com o perfil de alfa-hélice (**P1-2**, **P1-3** e **P1-4**) ou folha-beta (**P2-3**). Estes resultados corroboram o nosso planejamento em relação à indução da organização da estrutura secundária, através da arquitetura da estrutura primária dos peptídeos. Já os espectros obtidos em presença de tampão em meio aquoso apresentaram perfil variado. **P1-2** se mostrou com estrutura secundária aleatória. **P1-3** e **P1-4** apresentaram perfil helicoidal, muito embora, para **P1-4**, tenha se observado uma intensificação do sinal em 222 nm, em detrimento do sinal em 208 nm. Os espectros para os peptídeos da **Série P1** em solução aquosa foram multiplicados pelos fatores indicados nos gráficos para melhor visualização, uma vez que a elipsidade molar média por resíduo ($\theta[\text{MR}]$) foi substancialmente aumentada na presença de TFE. Já o peptídeo **P2-3** apresentou perfil de folha-beta, característico também em solução aquosa. Os gráficos mostrados nas **Figuras 58–61** estão sobrepostos para os experimentos na presença ou ausência de TFE para os respectivos produtos. Os gráficos individuais, para cada experimento, são mostrados nos **Anexos 7.2** (pág. 167).

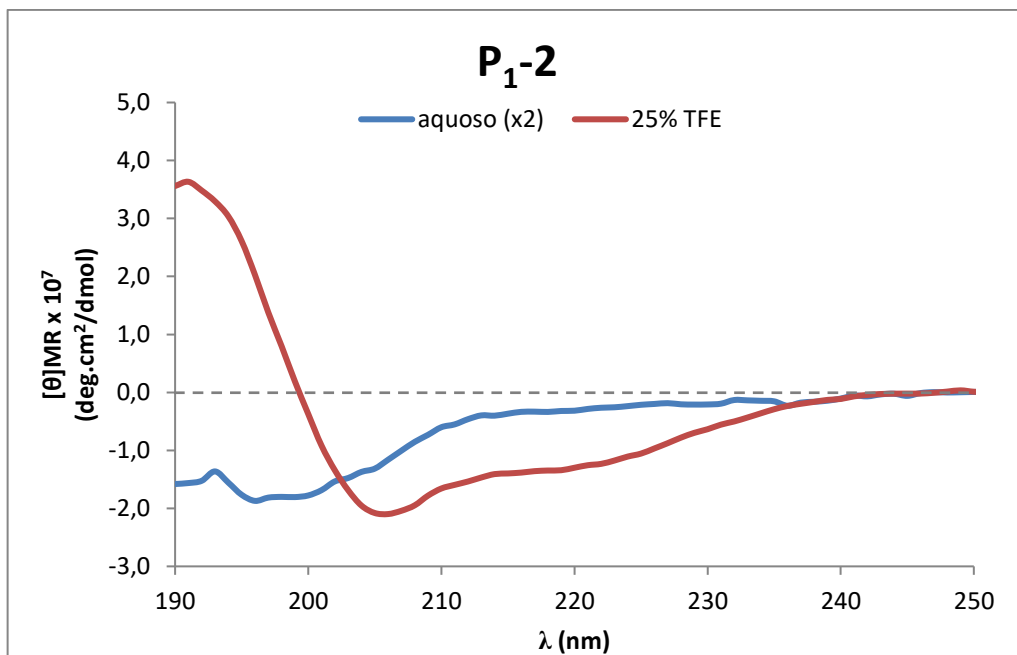


Figura 59. Espectro de CD de **P₁₋₂** em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 2×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.

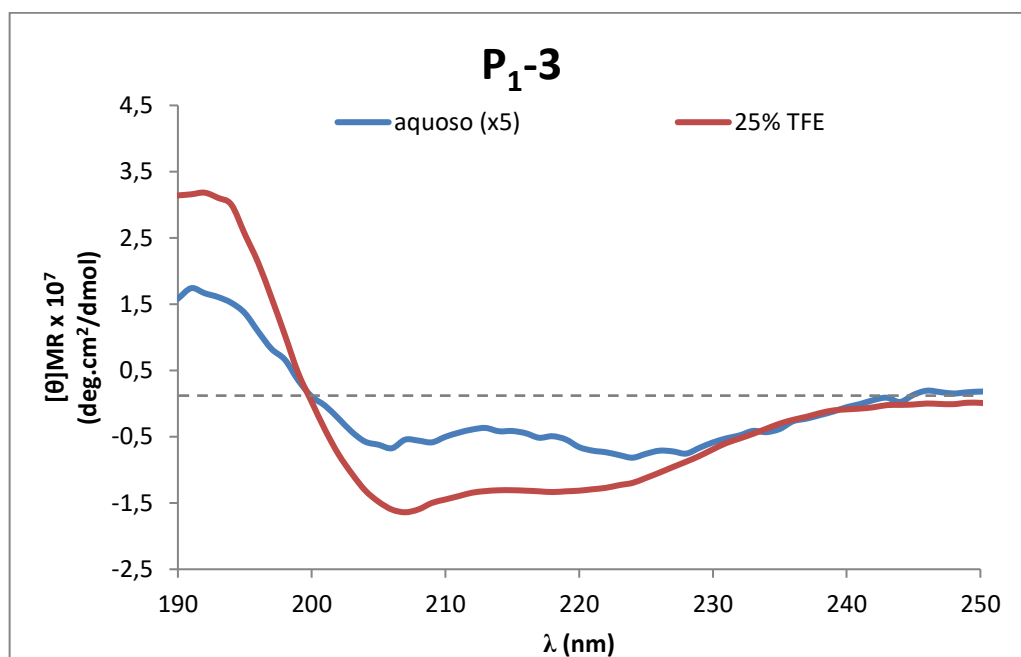


Figura 60. Espectro de CD de **P₁₋₃** em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 5×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.

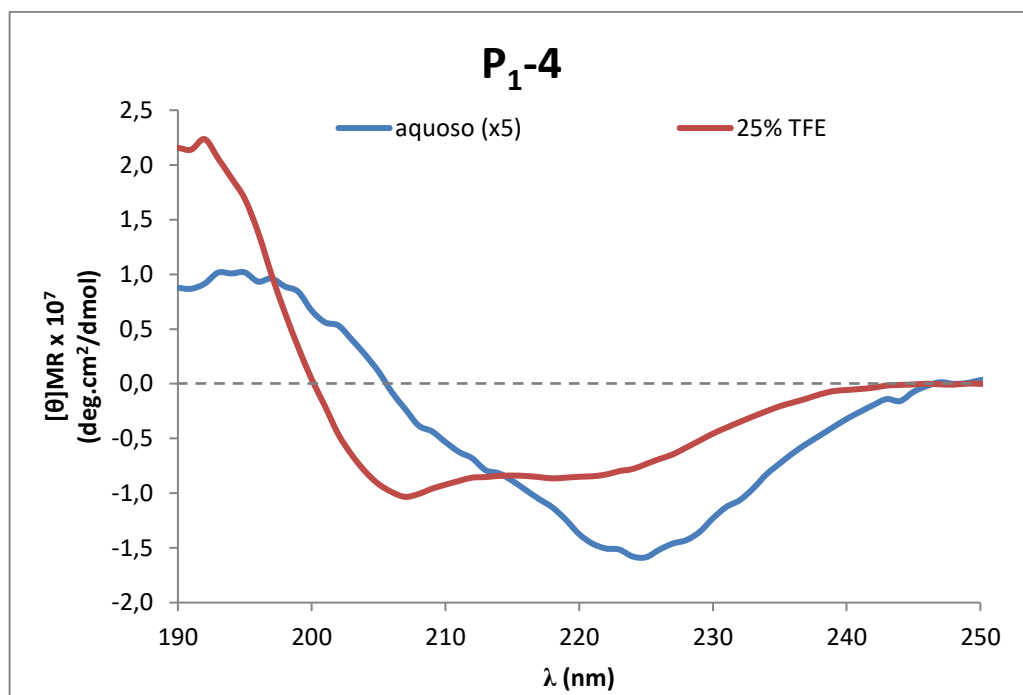


Figura 61. Espectro de CD de **P₁-4** em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho). O espectro em meio aquoso foi ampliado em 5×, relativo à escala do gráfico para favorecer a visualização.

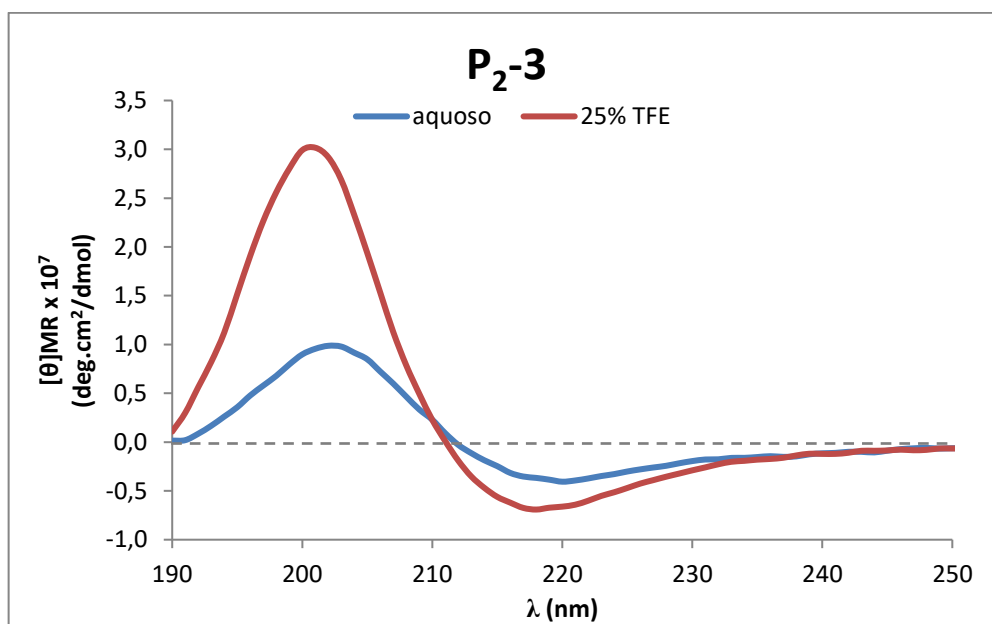


Figura 62. Espectro de CD de **P₂-3** em presença de tampão fosfato (pH 7,2), na ausência (azul) ou na presença de 25% TFE (vermelho).

4.8. Cinética de Liberação de Linezolida de Conjugados Peptídeo-Fármaco

A capacidade de liberação do fármaco linezolida a partir de conjugados peptídeo-fármaco foi avaliada por meio de redução química da ligação dissulfeto, utilizando DTT, que é um redutor com rápida cinética de reação (SINGH et al., 1995). A utilização do DTT se justifica, uma vez que a rápida redução da ligação dissulfeto permitir-nos-ia estudar a cinética do ataque nucleofílico intramolecular 1-5 do enxofre do grupo tiol reduzido à carbonila do grupo imida, resultando na liberação do fármaco linezolida e do subproduto γ -tiobutirolactona, conforme mostrado no esquema da **Figura 63**.

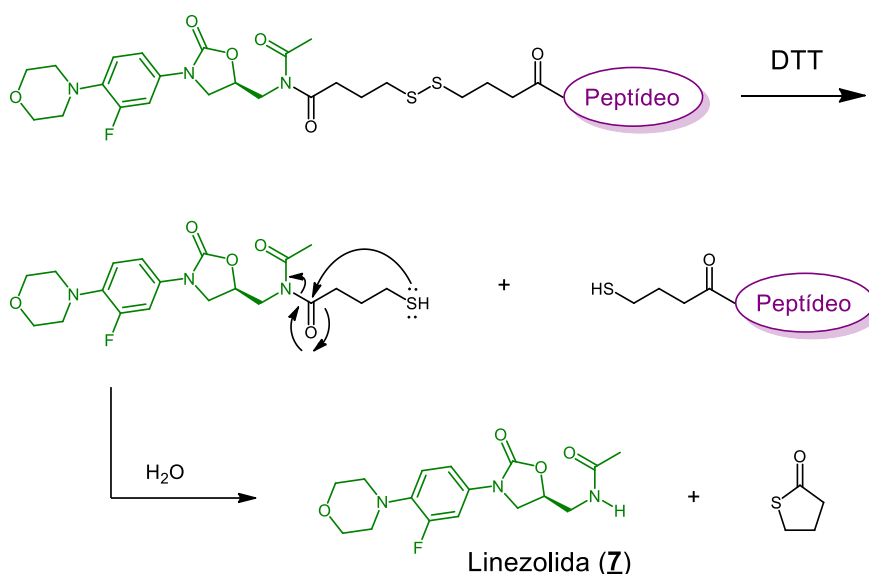


Figura 63. Esquema para a liberação de linezolida (**7**) a partir de conjugados peptídeo-fármaco, em meio aquoso, a partir da redução química da ligação dissulfeto do espaçador por ação de DTT.

Foram investigadas 3 situações para a liberação do fármaco linezolida pela reação com DTT: a partir do conjugado fármaco-espaçador **Lnz-DTBA (10)** e a partir dos conjugados peptídeo-fármaco **Lnz-P₁-2 (29)** e **Lnz-P14LRR (33)**. Os substratos foram adicionados à concentração inicial de 32 μ M. As alíquotas das reações, em diferentes tempos de zero a até 60 min. após a adição de DTT, foram analisadas por CLUE-EM e comparadas com curvas de calibração para o fármaco linezolida. Os gráficos mostrando os perfis de liberação de linezolida para os diferentes substratos são mostrados na **Figura 64**. Os tempos para a liberação de metade da concentração máxima ($t_{1/2}$) de linezolida na reação foram calculados e estão indicados nos respectivos gráficos.

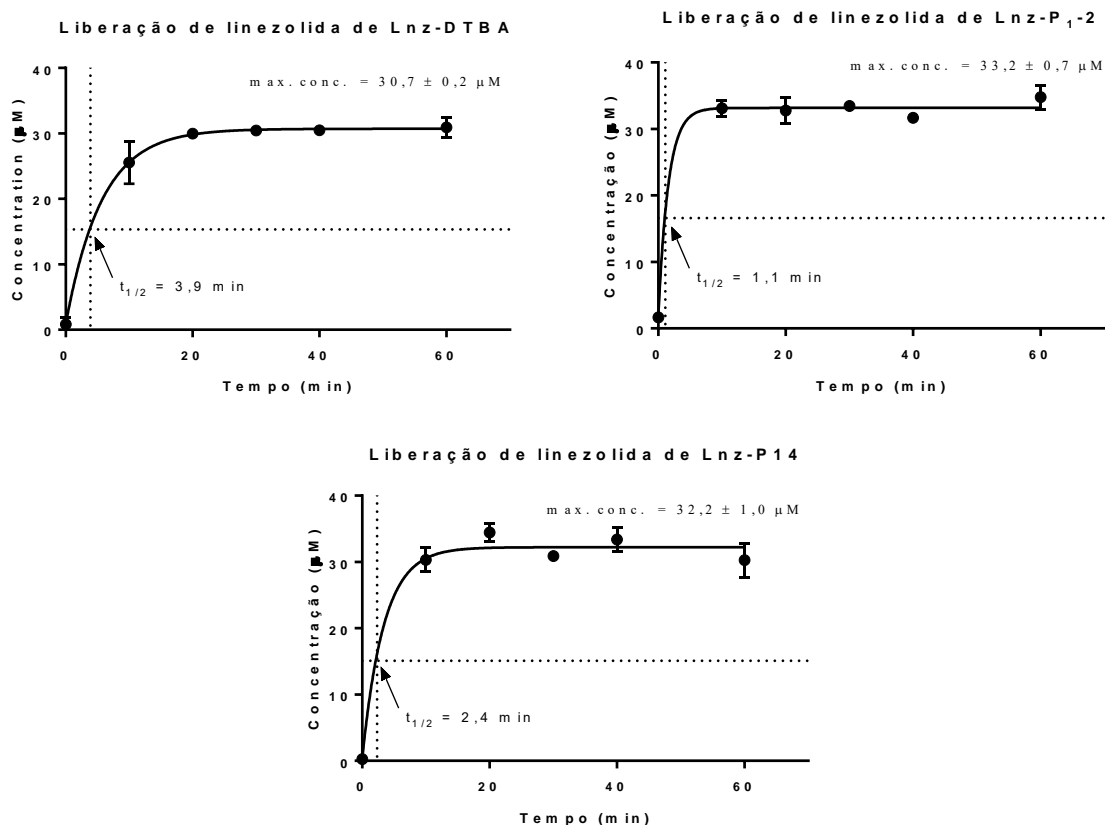


Figura 64. Gráficos de liberação de linezolida ao longo do tempo, após a adição de DTT em conjugados conectados por espaçador contendo ligação dissulfeto.

Observou-se um rápido perfil de liberação de linezolida em todos os casos, com valores de $t_{1/2}$ entre 1,1 e 3,9 min. e concentrações na faixa da concentração máxima, em 20 min para **Lnz-DTBA**, e em 10 min para **Lnz-P1-2** e **Lnz-P14LRR**. Analisando-se os picos dos cromatogramas de íons totais (TIC), representativo da reação com **Lnz-DTBA** (**Figura 65. A**), observamos indicações de que a reação de quebra da ligação dissulfeto promovida por DTT é a etapa limitante do processo de liberação de linezolida. Os tempos de retenção do padrão interno quinina ($t_R = 2,1$ min) da linezolida ($t_R = 3,4$ min) e de **Lnz-DTBA** ($t_R = 6,8$ min) são conhecidos a partir dos respectivos padrões. Ao se extrair os respectivos espectros de massas referentes aos picos, com valores de t_R iguais a 6,4 min, 5,0 min e 4,6 min, observamos valores m/z de 440, 440 e 398, respectivamente. Estes valores são condizentes com o intermediário formado após a quebra da ligação dissulfeto (**40**, m/z calc. 440), e da versão desacetilada desse intermediário (**41**, m/z calc. 398). O segundo sinal, referente a m/z 440, pode ser explicado pelo ataque nucleofílico intramolecular 1-7, que leva à transferência do grupo acetil do nitrogênio da imida para o enxofre do grupo mercaptobutiril gerando o produto **42**, como indicado na **Figura 65. B**.

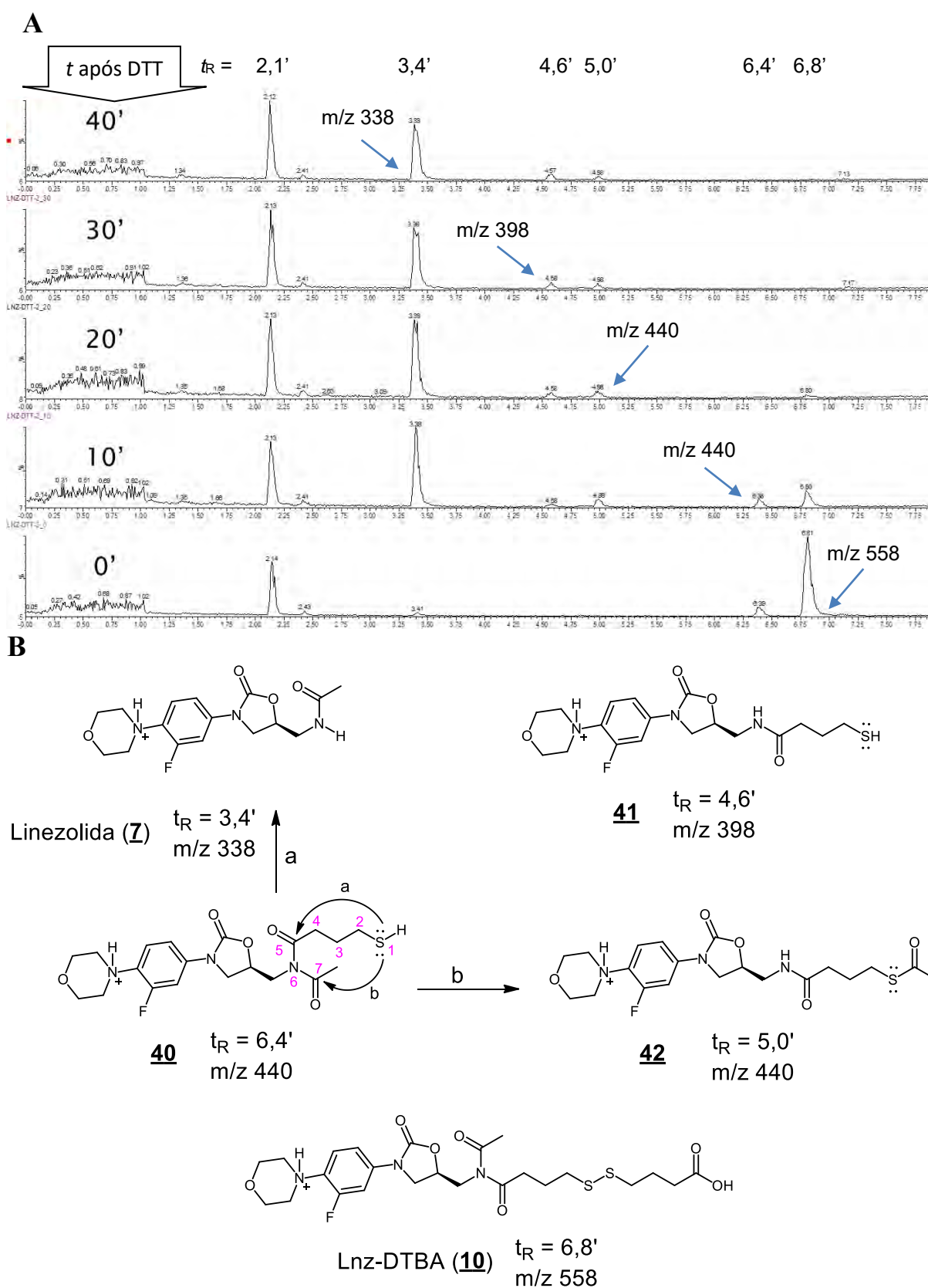


Figura 65. A. Cromatogramas de íons totais (CLUE-EM-ESI⁺), obtidos para a reação de liberação de linezolida a partir de **Lnz-DTBA (10)**, em presença de DTT. **B.** Proposta de atribuição dos sinais observados no cromatograma de íons totais para as espécies químicas envolvidas durante a reação.

Na **Figura 65** ainda é possível observar que o sinal atribuído ao produto da reação de redução promovida por DTT (**40**, $t_R = 6,4'$) não se acumula no meio reacional ao longo do tempo, o que indica que está sendo consumido mais rapidamente ou, no mínimo, tanto quanto é formado. Assim não se pode argumentar quantitativamente quanto à velocidade de liberação do fármaco linezolidina após a quebra da ligação dissulfeto. O que podemos afirmar é que a liberação ocorre tão, ou mais, rapidamente do que a própria redução da ligação dissulfeto por DTT, o que ocorre de forma total entre 10 e 20 minutos, nas condições do experimento.

4.9. Atividade Antibacteriana de Peptídeos das Séries **P₁**, **P₂** e **P₃**

Os peptídeos anfifílicos catiônicos (PACs) das séries **P₁** (**AcYG(RRLL)_n-NH₂**), **P₂** (**AcYG(RLRL)_n-NH₂**) e **P₃** (**AcYG(RRWW)_n-NH₂**) foram avaliados contra bactérias gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), por técnica de microdiluição em caldo. As bactérias foram cultivadas em presença dos compostos em diluição seriada de 32 – 0,5 μM , por 20 h, sendo a densidade ótica da suspensão de bactérias medida em leitor de microplacas (PATEL et al., 2015). O peptídeo melitina, de reconhecida atividade antibacteriana, foi usado em diluição seriada como padrão de comparação (PICOLI et al. 2017). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração mais baixa de peptídeo em que não se observou crescimento bacteriano. A atividade antibacteriana se mostrou, para todas as séries, dependente do comprimento da cadeia do peptídeo. Para sequências mais curtas ($n= 1$) não foi observada atividade antibacteriana nas concentrações testadas. Já para comprimentos de cadeia intermediários ($n= 2$ e $n= 3$) foram observados os valores mais baixos de CIM: 2–4 μM para **P₁₋₂**, 4 μM para **P₁₋₃**, 8 μM para **P₂₋₂** e **P₂₋₃**, e 8–16 μM para **P₃₋₂** e **P₃₋₃**. Para comprimentos maiores ($n= 4$), no entanto, foi observada relativa redução da atividade antimicrobiana. Outra observação foi a atividade antimicrobiana mais pronunciada para peptídeos da série **P₁**, seguido dos peptídeos da série **P₂** e a menor atividade para os peptídeos da série **P₃**. Para estes últimos, a baixa atividade pode estar associada à baixa solubilidade, uma vez que se observou turbidez, logo em seguida à adição de meio de cultura. Os valores de CIM para os peptídeos das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** contra *E. coli* são apresentados na **Tabela 7** (média de ao menos 3 experimentos independentes).

Tabela 7. Valores de CIM para os peptídeos das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** contra *E. coli*.

Série	CIM vs. <i>E. coli</i> (μM)			
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4
P₁ – AcYG(RRLL) _n -NH ₂	> 32	2	4	16–32
P₂ – AcYG(RLRL) _n -NH ₂	> 32	8	8	-
P₃ – AcG(RRWW) _n -NH ₂	> 32	16	8–16	> 32
Melitina		2 – 4		

Os PACs podem causar a lise da membrana citoplasmática bacteriana por meio da interação desestabilização da porção lipofílica do peptídeo com a bicamada fosfolipídica componente das membranas. Uma vez desestabilizada, a membrana perde a sua capacidade de permeabilidade seletiva, podendo vir a se romper (TRAVKOVA et al., 2017). Para testar esta hipótese foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar a liberação de β -galactosidase (β -Gal) no sobrenadante da suspensão de cultivo de bactérias. A β -Gal é uma enzima de ocorrência no citoplasma de *E. coli* e sua detecção no ambiente extracelular é um indicativo de que houve rompimento da membrana plasmática (THIBODEAU et al., 2004). A cultura de bactérias teve a expressão de β -Gal estimulada pela adição de 1,0 mM de β -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG), que se liga ao gene *lac* repressor, inibindo a degradação de β -Gal (HANSEN et al., 1998). Os PACs **P₁₋₂**, **P₁₋₃**, **P₁₋₄**, **P₂₋₃** e **P₃₋₃** foram adicionados a suspensões de *E. coli* com OD₅₉₅ = 0,5, nas concentrações de 1×, 2× e 4×CIM, e foram incubados por 1 h. O peptídeo melitina (Mlt), que age causando o rompimento da membrana plasmática, foi utilizado como controle positivo a 16 μM (LEE et al., 2013). Após a incubação, as bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante foi tratado com o substrato galactosídeo de vermelho de clorofenol (CPRG). A hidrólise enzimática do CPRG pela β -Gal causa a liberação do corante vermelho de fenol no meio, o qual pode ser quantificado por medida da absorbância (**Figura 66**).

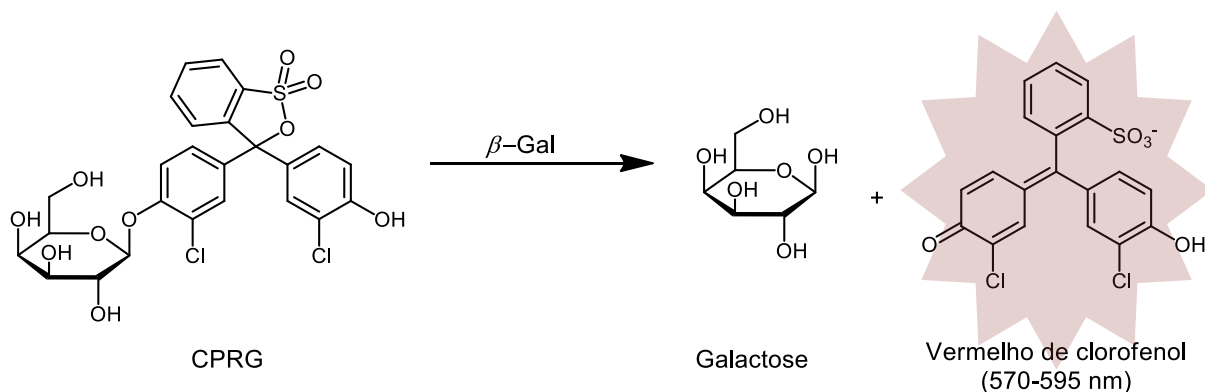


Figura 66. Reação enzimática de hidrólise do galactosídeo CPRG por β -Gal e liberação do corante vermelho de clorofenol, quantificável por absorbância no UV (570 nm).

A liberação do corante vermelho de clorofenol foi monitorada pela leitura da absorbância em 570 nm, ao longo de 1 h, em intervalos de 5 minutos. Os dados de leitura são apresentados nos gráficos na **Figura 67** (médias de 2 experimentos independentes). Os PACs **P₁-2** e **P₃-2** apresentaram capacidade de romper da membrana, dependente da concentração acima da CIM, o que indica que seus mecanismos de ação podem envolver outros alvos, além da membrana celular. Já **P₁-3** apresentou perfil lítico, mesmo à CIM, o que indica que este deve ser seu principal mecanismo de ação. **P₁-4** causou pouco dano à membrana, mesmo em altas concentrações. O tratamento com **P₂-3** gerou resultados inesperados, uma vez que se observou um elevado perfil lítico a 1× e 2×CIM, enquanto foi observada uma redução substancial na taxa de hidrólise do CPRG a 4×CIM (32 μM). Nós não encontramos precedente na literatura para este comportamento, que pode estar, possivelmente, associado à inibição da β-Gal pelo peptídeo **P₂-3**.

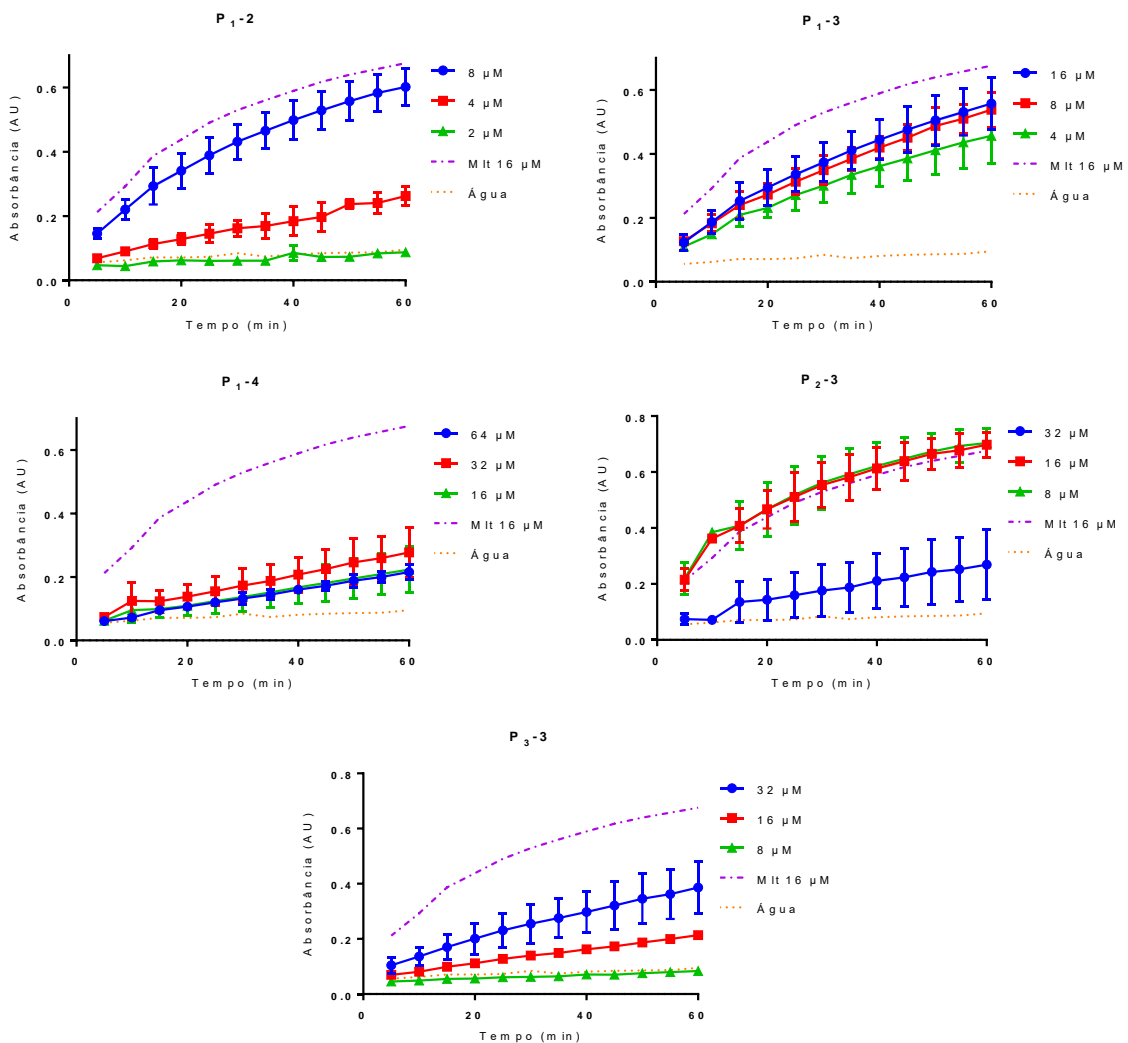


Figura 67. Gráficos de monitoramento (UV 570 nm) da atividade enzimática da β-Gal no sobrenadante da cultura de *E. coli*, na presença de diferentes PACs.

4.10. Atividade de Peptídeos das Séries P₁, P₂ e P₃ Sobre Células de Mamíferos

A atividade citotóxica dos PACs das séries P₁, P₂ e P₃ foi testada frente a linhagem de macrófagos murinos J774A.1, utilizando a metodologia MTT. A técnica mede, indiretamente, a viabilidade celular pela atividade mitocondrial, através da redução enzimática do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (sal de MTT) à 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana (formazana de MTT). Uma vez que a formazana de MTT possui coloração roxa/violeta intensa esta pode ser quantificada por absorbância no UV entre 550 e 590 nm (Figura 68) (KUMAR et al., 2018).

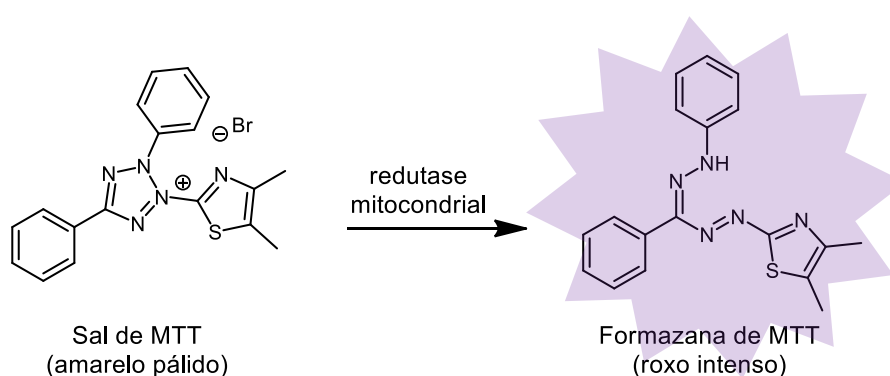


Figura 68. Reação de redução do sal de MTT por redutases mitocondriais para formação da formazana de MTT, detectável por medida de absorbância. (UV 570 nm)

Monocamadas de células J774A.1 foram tratadas com os peptídeos das séries P₁, P₂ e P₃ em diluição seriada de 32 – 0,5 µM por 24 h a 37°C e 5% CO₂, sendo, então, a viabilidade celular indiretamente medida, utilizando a metodologia MTT (KUMAR et al., 2018). Os valores de concentração efetiva em 50% (CE₅₀) para os PACs são apresentados na **Tabela 8** (média de 3 experimentos). Para os peptídeos das séries P₁ e P₃ observou-se um perfil tóxico crescente, com o aumento do comprimento da cadeia peptídica. Para os peptídeos da série P₂ não foi observada toxidez sobre macrófagos J774A.1 na concentração mais alta do experimento (32 µM).

Tabela 8. Resultados de citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1 tratados com PACs.

Série	CE ₅₀ vs. J774-A1 (µM)			
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4
P ₁ – AcYG(RRLL) _n -NH ₂	>32	33,96	3,92	2,21
P ₂ – AcYG(RLRL) _n -NH ₂	>32	>32	>32	-
P ₃ – AcG(RRWW) _n -NH ₂	>32	21,62	4,89	4,28

Também foi avaliado o perfil hemolítico dos peptídeos das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** sobre hemácias humanas. Suspensões de células vermelhas do sangue foram lavadas e diluídas em PBS (pH 7,4) antes de serem tratadas com os peptídeos em diluição seriada (40 – 1,25 μ M) e incubadas por 1 h a 37°C e 5% CO₂. Os controles negativos (10% água) e positivos (0,1% Triton X-100) foram utilizados como parâmetros para 0% e 100% de hemólise, respectivamente. O perfil hemolítico foi avaliado pela medida da absorbância da hemoglobina liberada no meio, no comprimento de onda de 405 nm. Os gráficos representativos das médias obtidas entre 3 experimentos independentes são apresentados na **Figura 69**. De forma similar ao observado para a toxicidade em células J774A.1, o perfil hemolítico foi superior para peptídeos das séries **P₁** e **P₃** e diretamente proporcional ao comprimento da cadeia. Já os peptídeos da série **P₂** apresentaram pouca ou nenhuma capacidade hemolítica, mesmo em concentrações tão altas quanto 40 μ M.

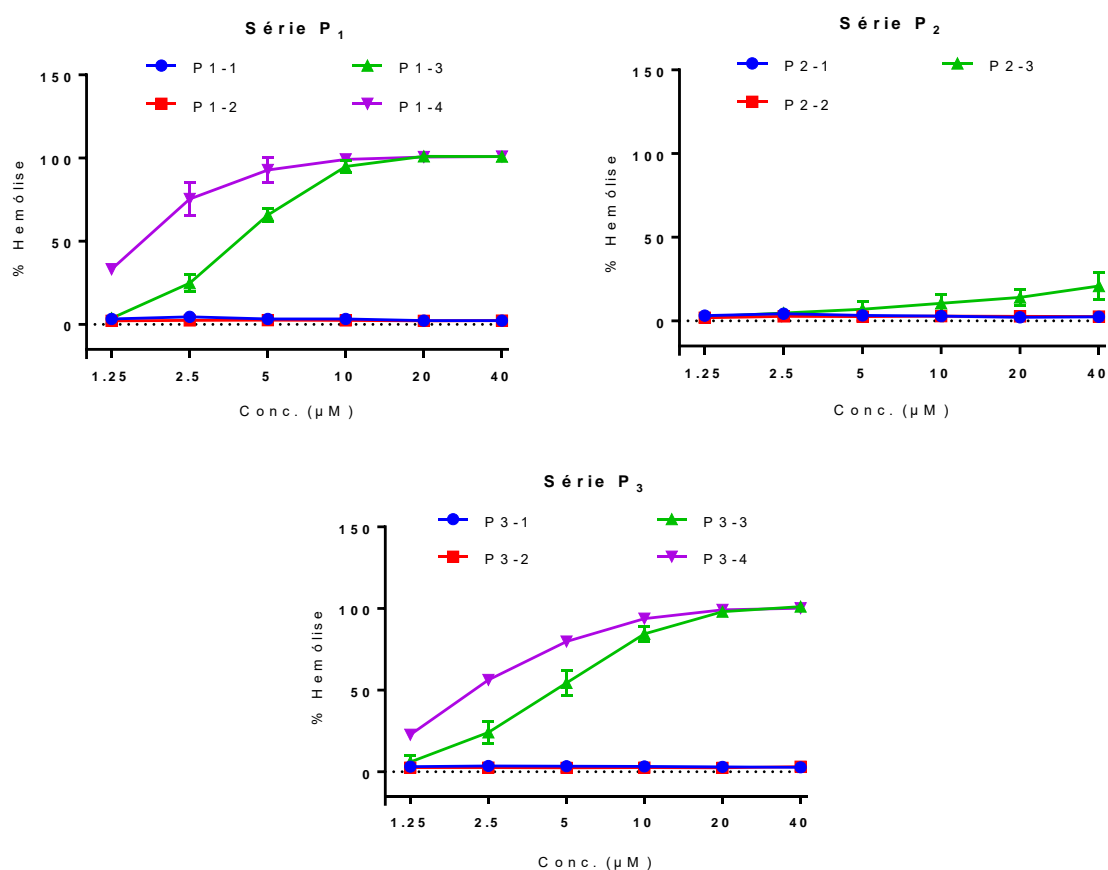


Figura 69. Atividade hemolítica de PACs das séries **P₁**, **P₂** e **P₃**.

4.11. Penetração Celular de Peptídeos da Série P₁

Os PACs da série P₁, FI-P₁₋₂, FI-P₁₋₃ e FI-P₁₋₄, marcados na porção *N*-terminal com sonda fluorescente de 5(6)-carboxifluoresceína, foram avaliados quanto à sua habilidade de permear a membrana celular de células de mamíferos. Primeiramente, foi avaliada a citotoxicidade sobre células J774A.1, utilizando a metodologia MTT, após tratamento com os PACs por 24 h, em diluição seriada (32 – 0,5 µM). Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 9** (médias de 3 experimentos) e são condizentes com o perfil tóxico das versões contendo resíduos de Tyr acetilada no *N*-terminal, P₁₋₂, P₁₋₃ e P₁₋₄, com toxidez crescente com o comprimento da cadeia.

Tabela 9. Citotoxicidade de peptídeos da série P₁ contendo sonda fluorescente sobre J774A.1.

PAC	CE ₅₀ vs. J774-A1 (µM)
FI-P ₁₋₂ – FI-G(RLL) ₂ -NH ₂	> 32
FI-P ₁₋₃ – FI-G(RLL) ₃ -NH ₂	10,6 ± 2,1
FI-P ₁₋₄ – FI-G(RLL) ₄ -NH ₂	3,9 ± 0,5

A capacidade de penetração celular dos peptídeos foi medida por leitura em citômetro de fluxo de células J774A.1 tratadas com os peptídeos por 1 h ou 3 h, em concentrações variadas. FI-P₁₋₂, foi avaliado em diluição seriada (16 – 2 µM). O peptídeo FI-P_{14LRR}, cujo perfil de penetração celular fora outrora descrito (NEPAL et al., 2015), foi utilizado como padrão de comparação, em todos os casos, nas mesmas concentrações de tratamento dos PACs fluorescentes. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS (pH 7,4), na presença ou ausência de 1 mg/L de azul de tripan (AT), imediatamente, antes da leitura por citometria de fluxo. O azul de tripan tem a capacidade de bloquear a emissão de fluorescência em 595 nm de peptídeos aderidos à membrana celular, ao passo que não bloqueia a fluorescência oriunda do interior de células viáveis (FANG e TREWYN, 2012). Os gráficos com as médias das medidas de fluorescência, em unidades arbitrárias (AFU), para as situações tratadas com FI-P₁₋₂ são mostradas na **Figura 70** (médias de 2 experimentos). Observou-se em geral, uma tendência de redução da emissão da fluorescência em células tratadas com FI-P₁₋₂ após 3 h, em comparação com 1 h após o tratamento. Por outro lado, a extensão do tempo de tratamento com FI-P_{14LRR} causa um aumento do acúmulo de peptídeo nas células. Esta observação pode estar associada à maior estabilidade metabólica da sequência peptídica de P_{14LRR} que, por ser constituída por uma sequência de resíduos de hidroxiprolina *O*-

alquilados, não são reconhecidos por proteases com especificidade para aminoácidos naturais. Outra observação interessante é que **FI-P₁-2** se localiza, majoritariamente, no interior da célula, uma vez que o tratamento com AT reduziu em menos de 50% a fluorescência relativamente às situações não tratadas.

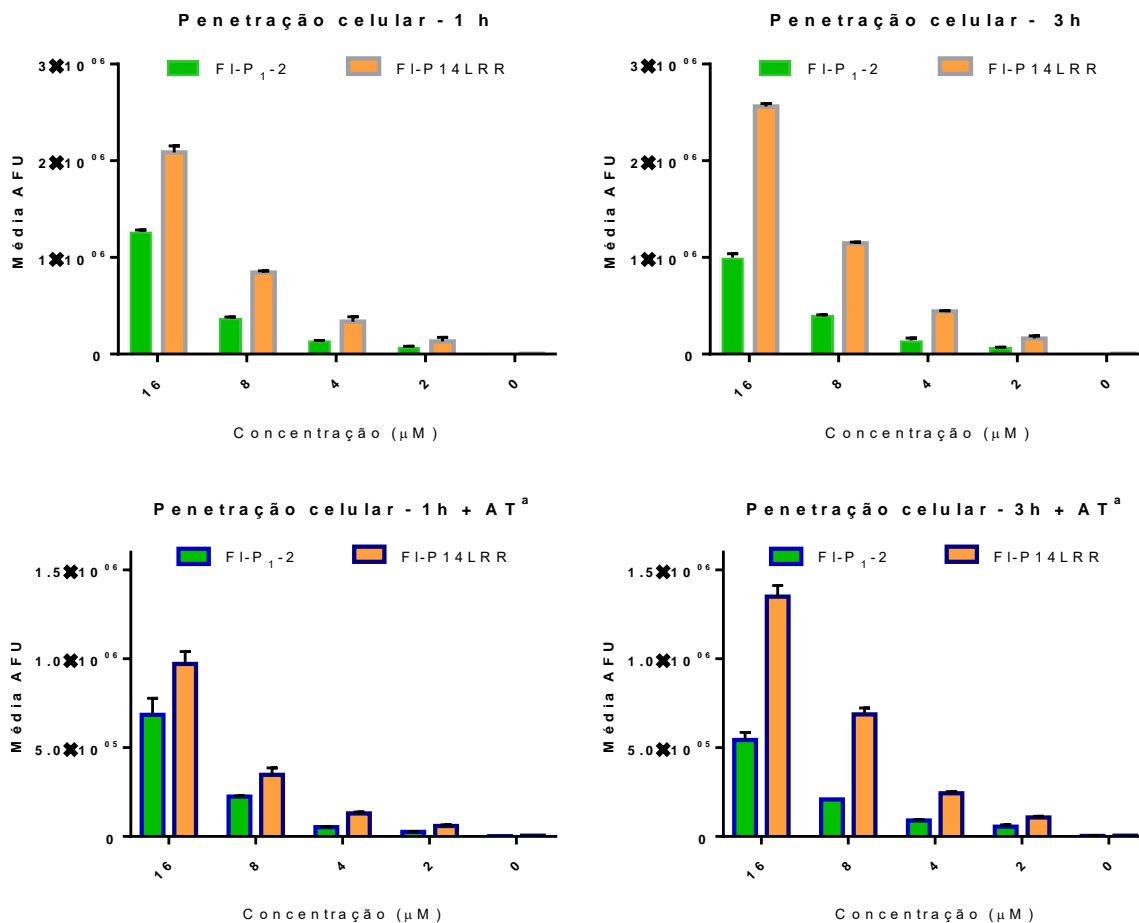


Figura 70. Gráficos das medidas médias de fluorescência, obtidos por citometria de fluxo de células J774A.1 tratadas com **FI-P₁-2** em comparação com **FI-P14LRR**. ^a = adição de 1 mg/mL de azul de tripan imediatamente antes à análise.

Os peptídeos **FI-P₁-3** e **FI-P₁-4** foram avaliados em concentrações mais baixas, iguais a 2 e 1 µM, respectivamente, devido à sua maior toxicidade contra células J774A.1. As demais condições de análise, no entanto, foram as mesmas utilizadas para a avaliação de **FI-P₁-2**. O comportamento geral dos peptídeos, sob os diferentes regimes de análise, se assemelhou ao observado para **FI-P₁-2**, com redução da medida da fluorescência com a extensão do período de incubação e ocorrência dos peptídeos majoritariamente no interior das células, em comparação à sua localização na membrana celular. Notou-se, no entanto, um acúmulo muito superior de **FI-P₁-3** e **FI-P₁-4** no ambiente intracelular, em comparação a **FI-P14LRR**, cerca de

20 – 30× superior ao peptídeo de referência, dependendo do regime de tratamento. Os gráficos da **Figura 71**, mostrando os dados de citometria obtidos para **FI-P₁-3** e **FI-P₁-4** (médias de 2 experimentos), estão em escala logarítmica para melhor visualização dos resultados.

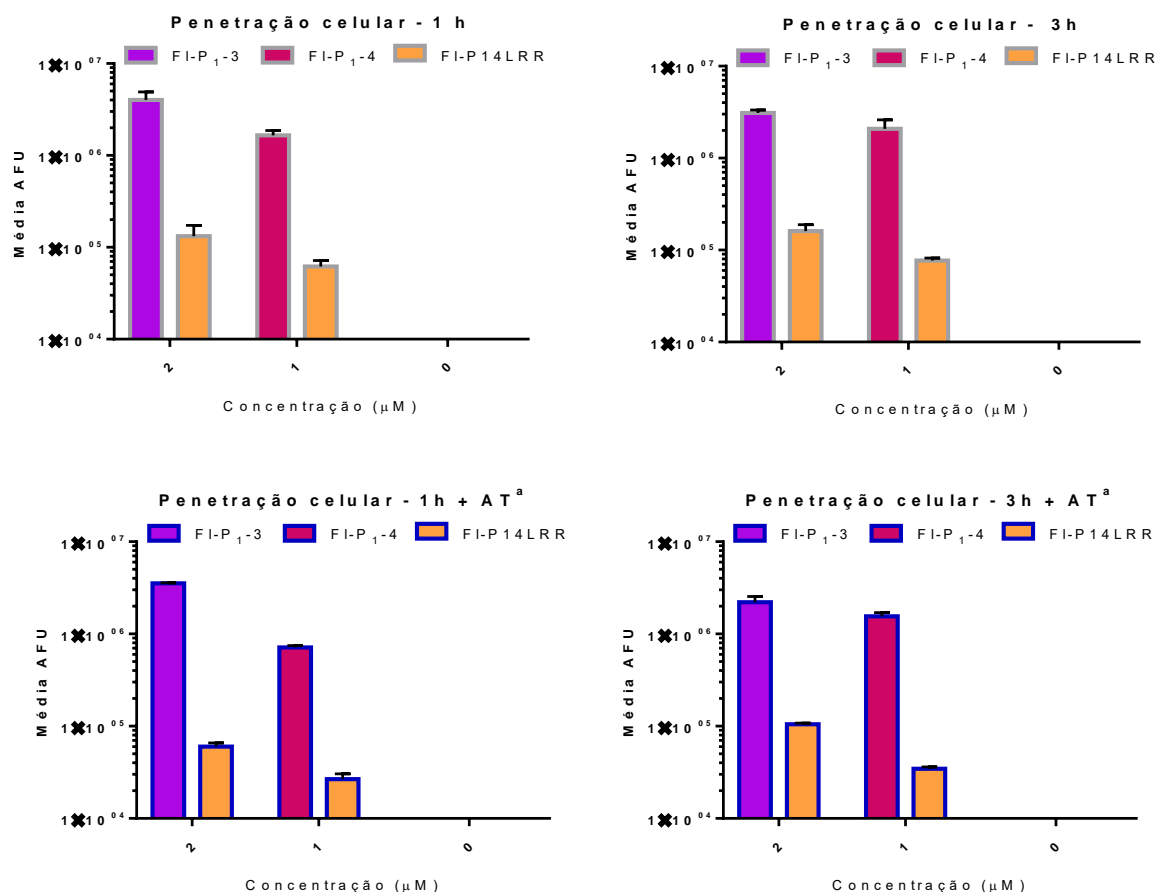


Figura 71. Gráficos das medidas médias de fluorescência, obtidos por citometria de fluxo de células J774A.1 tratadas com **FI-P₁-3** e **FI-P₁-4**, em comparação com **FI-P14LRR**. ^a = adição de 1 mg/mL de azul de tripan, imediatamente antes à análise.

Foram realizados ainda experimentos de imagem por microscopia confocal em células J774A.1 tratadas com **FI-P₁-2** a 16 µM. Os núcleos das células foram marcados em azul com Hoescht 33342. Para se investigar a colocalização de **FI-P₁-2** com estruturas específicas no citoplasma, foram adicionados os reagentes *LysoTracker*TM (vermelho) ou *MitoTracker*TM (vermelho) para identificar a presença de lisossomos e mitocôndrias, respectivamente. A colocalização entre fluoróforos verdes e vermelhos pode ser identificada como uma coloração amarelo-alaranjada. As imagens obtidas por microscopia confocal são mostradas na **Figura 72**. Embora não tenha sido possível identificar uma tendência quanto à colocalização de **FI-P₁-2**

com lisossomos ou mitocôndrias, foi possível se visualizar seu acúmulo no meio intracelular, confirmando as observações feitas a partir dos dados de citometria de fluxo.

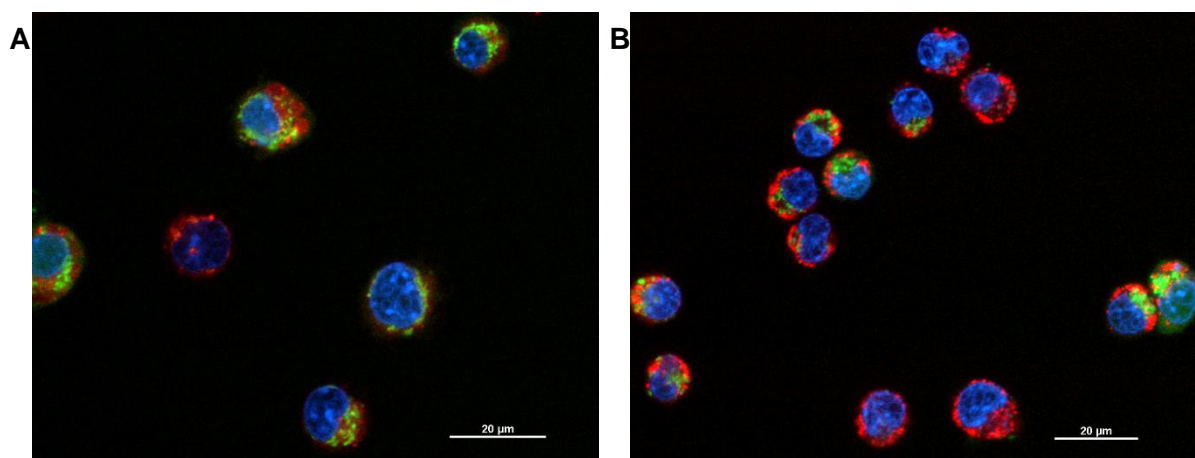


Figura 72. Imagens de microscopia confocal de células J774-A1 tratadas com **FI-P1-2** (verde), corante Hoechst 33342 (núcleo celular, azul) e **A**) *LysoTracker*TM (vermelho, lisossomos) ou **B**) *MitoTracker*TM (vermelho, mitocôndrias). Em ambos os casos as imagens são mostradas para os canais azul, vermelho e verde, individualmente, e para os 3 canais em sobreposição.

4.12. Atividade Antibacteriana e Citotóxica de Conjugados entre Fármacos e a Sequência de P1-2

O conjunto de resultados obtidos, incluindo atividade antibacteriana, citotoxicidade e perfil de penetração celular, nos estimulou à preparação de conjugados peptídeo-fármaco envolvendo a cadeia peptídica de **P1-2** (GRLLRLL-NH₂) para investigar seu perfil de atividade biológica. O conjugado **Lnz-P1-2** foi avaliado frente a *E. coli*, pelo método de microdiluição em caldo (PATEL et al., 2015); e frente a células J774A.1 a avaliação foi feita por metodologia MTT (KUMAR et al., 2018), comparado com **P1-2** e o fármaco linezolida, isolados ou em co-tratamento. Os valores de CIM em *E. coli* e de CE₅₀ para J774A.1, em cada situação de tratamento (3 experimentos independentes), são mostrados na **Tabela 10**. O conjugado **Lnz-P1-2** apresentou CIM de 8 µM, superior ao valor observado para a sequência peptídica não conjugada, mas inferior ao valor observado para o fármaco linezolida que, por ser um fármaco com atividade contra bactérias gram positivas, não possui atividade contra *E. coli* (gram negativa). O co-tratamento entre **P1-2** e linezolida não apresentou diferenças em relação ao tratamento somente com o peptídeo. Em relação à citotoxicidade contra J774A.1, somente **Lnz-P1-2** apresentou de CE₅₀ na faixa do experimento, com valor de 11,8 ± 1,5 µM.

Tabela 10. Valores de CIM contra *E. coli* e CE₅₀ contra J774A.1 para **Lnz-P1-2** e situações correlatas.

Composto	CIM vs. <i>E. coli</i> (μM)	CE ₅₀ vs. J774A.1 (μM)
Lnz-P1-2	8	11,8 ± 1,5
P1-2	2-4	> 32
Linezolida	> 32	> 32
P1-2 + linezolida	2-4	> 32

A capacidade lítica de **Lnz-P1-2** sobre *E. coli* e foi avaliada por ensaio de quantificação de β-Gal no ambiente extracelular (DIETSCHE et al., 2020). Observou-se que o conjugado possui acentuada capacidade de romper a membrana celular a 16 e 32 μM, excedendo a capacidade lítica da melitina. O perfil hemolítico de **Lnz-P1-2** também foi avaliado. Em comparação aos peptídeos da **Série P1**, o conjugado apresentou perfil lítico intermediário, maior que os observados para **P1-1** e **P1-2**, mas inferior aos observados para **P1-3** e **P1-4**. Os gráficos mostrando os perfis de liberação de β-Gal no meio por **Lnz-P1-2** (2 experimentos independentes) e capacidade a hemolítica de **Lnz-P1-2** (3 experimentos independentes), em comparação com outros peptídeos da **Série P1**, são mostrados na **Figura 73**.

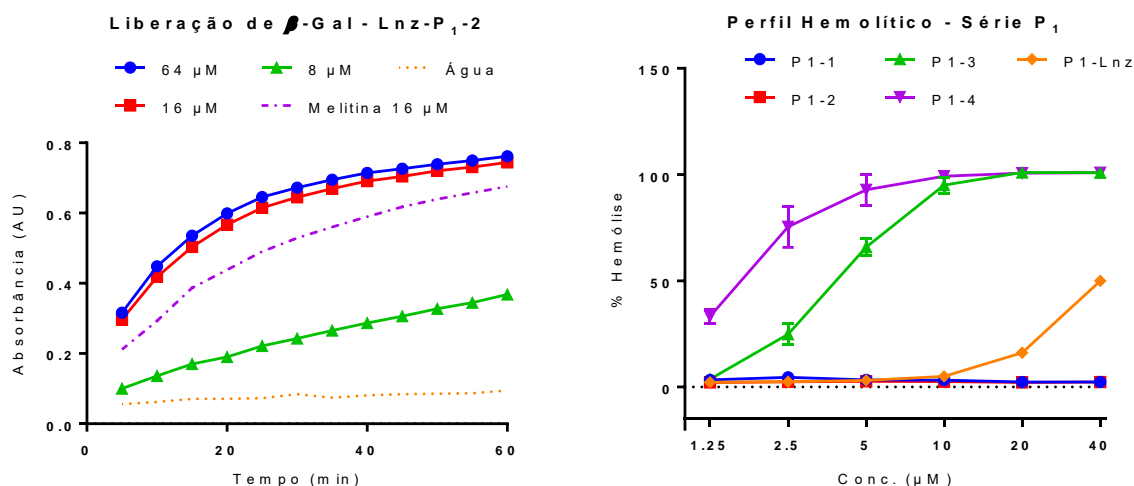


Figura 73. Liberação de β-Gal e perfil hemolítico pelo tratamento com **Lnz-P1-2**.

O perfil de atividade *in vitro* de **Lnz-P1-2** se assemelha mais ao conjunto de resultados obtidos para peptídeos de cadeia mais longa dentro da série, **P1-3** e **P1-4**, que apresentaram menor atividade bacteriana, maior citotoxicidade e maior perfil lítico de bactérias e hemácias do que **P1-2**. O comportamento observado para **Lnz-P1-2** pode estar associado ao aumento da

cadeia na direção do *N*-terminal, o que cria uma extensão de caráter hidrofóbico nesta região, marcada em vermelho na **Figura 74**, de modo que o comprimento da cadeia do conjugado é intermediário aos comprimentos das cadeias dos peptídeos **P₁₋₃** e **P₁₋₄**.

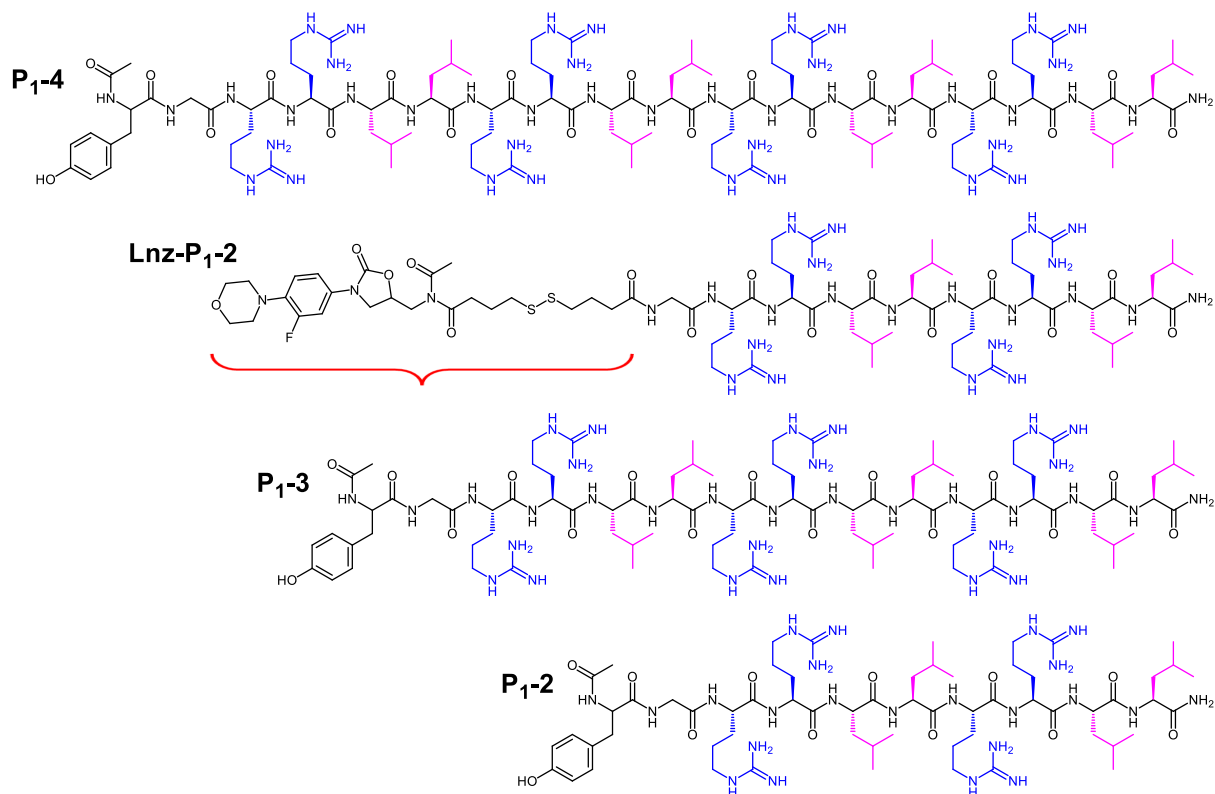


Figura 74. Comparação da extensão da cadeia do conjugado **Lnz-P₁₋₂** com outros peptídeos da Série **P₁**.

O benzimidazol, fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas, possui também atividade antimicrobiana (HOF, 1989). Dessa forma, os conjugados **Bzd(S)-P₁₋₂** e **Bzd(R)-P₁₋₂** tiveram seu perfil antibacteriano testado contra *E. coli* por microdiluição (PICOLI et al. 2017) e sua citotoxicidade foi avaliada em células J774A.1, por metodologia MTT (KUMAR et al., 2018). Os valores de CIM para ambos os estereoisômeros foi de 8 μM , enquanto o CE_{50} observado foi superior a 32 μM , obtidos a partir de 3 experimentos independentes em ambos os casos (**Tabela 11**).

Tabela 11. Valores de CIM (*E. coli*) e CE_{50} (J774A.1) para conjugados peptídeo-benzimidazol.

Composto	CIM vs. <i>E. coli</i> (μM)	CE_{50} vs. J774A.1 (μM)
Bzd(S)-P₁₋₂	8	> 32
Bzd(R)-P₁₋₂	8	> 32
P₁₋₂	2–4	> 32

Ao se analisar os dados de viabilidade celular, utilizados nos cálculos dos valores de CE_{50} mostrados na **Tabela 11**, é possível notar uma diferença significativa entre os valores de viabilidade observados a 32 μM para **P₁₋₂** ($61,1 \pm 13,7 \%$) e **Bzd(R)-P₁₋₂** ($92,6 \pm 6,2 \%$), com $P = 0,0084$ (ANOVA). Já a diferença entre os valores de viabilidade a 32 μM entre **P₁₋₂** e **Bzd(R)-P₁₋₂** ($59,4 \pm 3,1 \%$) não foi estatisticamente significativa ($P = 0,9637$). A **Figura 75** mostra os gráficos com os valores de viabilidade observados para **Bzd(S)-P₁₋₂**, **Bzd(R)-P₁₋₂** e **P₁₋₂** nas condições do experimento.

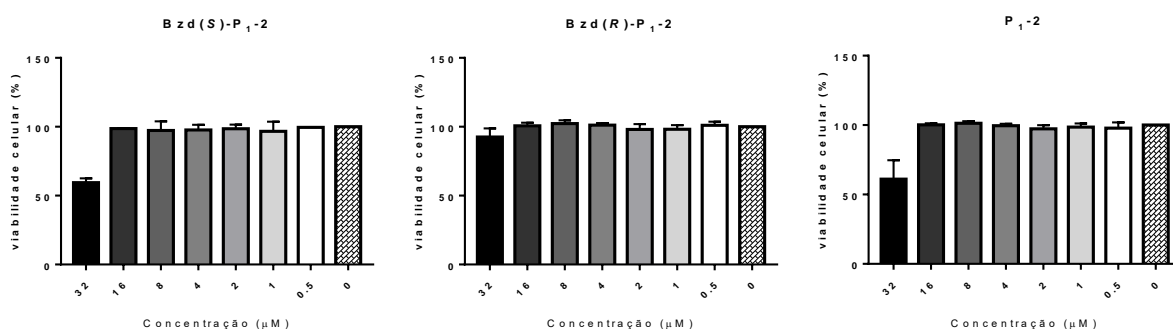


Figura 75. Viabilidade celular de células J774A.1 após tratamento com **P₁₋₂** e respectivos os conjugados peptídeo-fármaco com benznidazol.

4.13. Atividade Antibacteriana *In Vitro* e Penetração em Células da Linhagem J774.A1 do Conjugado Lnz-P14LRR

O conjugado **Lnz-P14LRR** foi avaliado contra *E. coli* (ATCC 25922) pelo método de microdiluição em caldo e comparado com o conjugado **Lnz-FI-P14LRR**, com o peptídeo **FI-P14LRR**, com o fármaco linezolida e com a combinação equimolar de peptídeo e fármaco. O peptídeo melitina foi utilizado como padrão de comparação (PATEL et al., 2015). Os resultados obtidos, referentes a um tempo de incubação de 20 h a 37°C e agitação (3 experimentos independentes), são mostrados na **Tabela 12**. O fármaco linezolida, aplicável em infecções por bactérias gram positivas, não é ativo contra *E. coli*. O conjugado **Lnz-P14LRR**, se mostrou tão efetivo quanto a sequência peptídica **FI-P14LRR** (CIM = 4 μM), indicando que a conjugação não interfere na atividade antibacteriana oriunda da porção peptídica do conjugado. O co-tratamento peptídeo/fármaco 1 : 1 também forneceu CIM = 4 μM . Já a inclusão de um resíduo de aminoácido contendo sonda fluorescente (**Lnz-FI-P14LRR**) causou a redução da efetividade (CIM = 8 μM).

Tabela 12. Valores de CIM (*E. coli*) para conjugados peptídeo-linezolida.

Composto	CIM vs. <i>E. coli</i> (μM)
Lnz-P14LRR	4
Lnz-FI-P14LRR	8
FI-P14LRR	4
Linezolida	> 32
FI-P14LRR + linezolida 1:1	4
Melitina	2–4

O peptídeo FI-P14LRR tem atividade antibacteriana, no entanto não age desestabilizando a membrana celular (KURIAKOSE et al., 2013). Para se verificar a capacidade de danificar a membrana bacteriana do conjugado **Lnz-P14LRR** foi realizado experimento de liberação de β -Gal no meio (DIETSCHE et al., 2020), cujos resultados são mostrados na **Figura 76** (experimento conduzido em duplicata pela Dra. Samantha Zeiders, na Purdue University, West Lafayette, IN, EUA). Nota-se que o conjugado **Lnz-P14LRR** mantém o perfil não-lítico da membrana, tal qual o peptídeo **FI-P14LRR**.

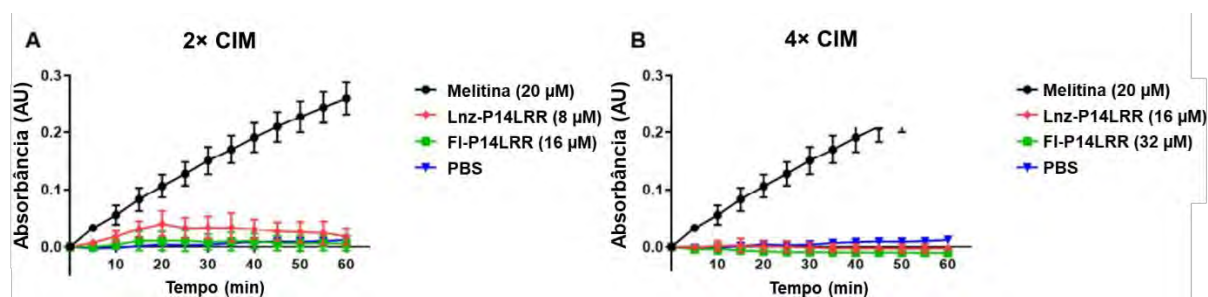
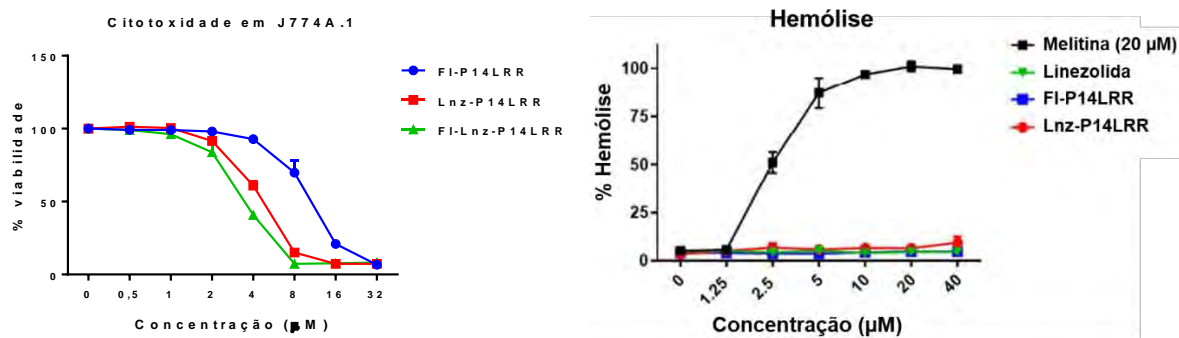


Figura 76. Experimento de liberação de β -Gal promovida por **Lnz-P14LRR** e **FI-P14LRR**, conduzido pela Dra. Samantha Zeiders na Purdue University, West Lafayette, IN, EUA.

A atividade tóxica foi avaliada em células J774A.1 pelo método MTT, após incubação por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (KUMAR et al., 2018). A atividade hemolítica também foi avaliada em hemácias humanas, incubadas por 1 h a 37°C em presença dos compostos (conduzido pela Dra. Samantha Zeiders) (DIETSCHE et al., 2020). Os resultados obtidos de 3 experimentos independentes são mostrados na **Figura 77**.



Composto	CE ₅₀ vs. J774A.1 (µM)
Lnz-P14LRR	4,3 ± 0,2
Lnz-FI-P14LRR	3,6 ± 0,1
FI-P14LRR	10,1 ± 0,8

Figura 77. Resultados de toxidez sobre células de mamíferos: J774A.1, após 24 h, por metodologia MTT, e hemácias humanas, por liberação de hemoglobina, conduzido pela Dra. Samantha Zeiders.

Para se avaliar a capacidade de penetração celular do conjugado peptídeo-fármaco, células J774A.1 foram tratadas com o composto **Lnz-FI-P14LRR**, em diferentes concentrações, por 1 h ou 3 h, sendo em seguida analisadas por citometria de fluxo. Nos casos indicados, azul de tripan (AT) foi adicionado imediatamente antes à leitura, para se bloquear a fluorescência proveniente fluoróforos aderidos à membrana plasmática. Os resultados deste experimento, realizado em duplicata pela Dra. Samantha Zeiders, constam na **Figura 78**. Em todas as situações avaliadas, os valores de fluorescência com ou sem a adição de AT foram equiparáveis, indicando que que o conjugado **Lnz-FI-P14LRR** ocorre quase exclusivamente no ambiente intracelular, não ficando retido na membrana. Foi observado ainda um comportamento concentração-dependente, ocorrendo uma maior internalização do conjugado com o aumento da sua concentração no meio extracelular.

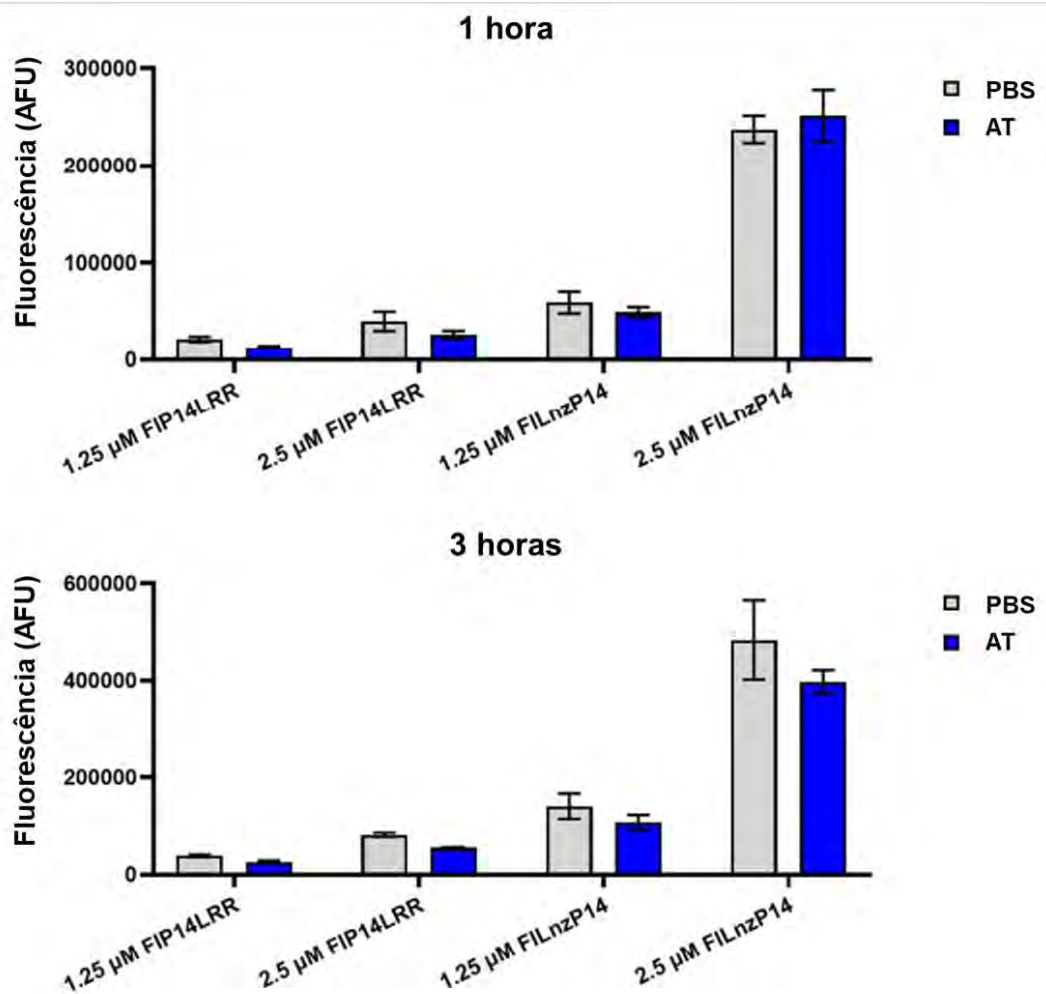


Figura 78. Experimento para verificar a internalização do conjugado **Lnz-FI-P14LRR** em células J774A.1 por citometria de fluxo, conduzido pela Dra. Samantha Zeiders.

Foram realizados ainda experimentos de visualização por microscopia confocal de células J774A.1, tratadas com **Lnz-FI-P14LRR** (verde). Foram também adicionados reagentes para marcação dos núcleos das células (Hoescht 33342, azul), e de lisossomos (LysoTracker™, vermelho), ou ainda de mitocôndrias (MitoTracker™, vermelho) (DIETSCHE et al., 2020) (**Figura 79**). Observou-se o acúmulo do conjugado no ambiente intracelular, conforme indicado por experimento de citometria de fluxo. É possível observar ainda uma forte tendência de o conjugado **Lnz-FI-P14LRR** se encontrar colocalizado com lisossomos (**Figura 79.B**) mas não com mitocôndrias (**Figura 79.A**). A colocalização do peptídeo com os compartimentos subcelulares indicados pode ser visualizada como uma coloração amarelo-alaranjada nas imagens obtidas por microscopia confocal.

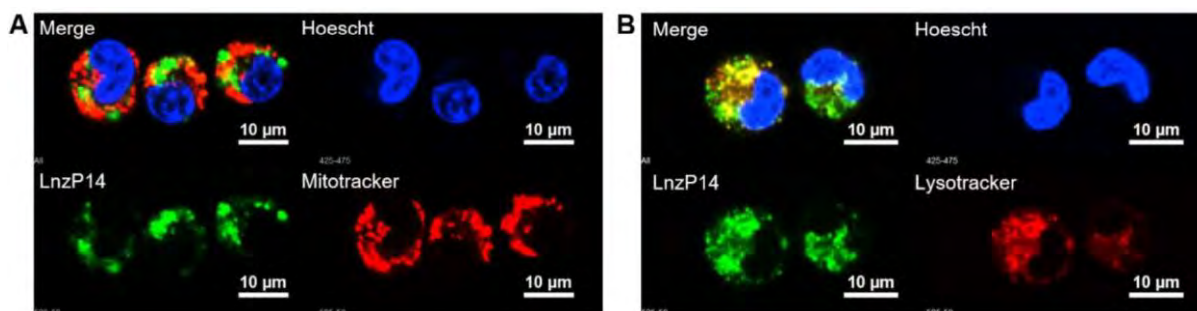


Figura 79. Imagens de microscopia confocal, obtidas a partir de células tratadas com **Lnz-Fl-P14LRR** (verde), Hoescht 33342 (azul), e **A**) MitoTracker™ (vermelho), ou **B**) LysoTracker™ (vermelho). Cada situação está dividida para mostrar os canais verde, azul e vermelho separadamente, e com os 3 canais em sobreposição (Obtidas pela Dra. Samantha Zeiders).

4.14. Atividade Anti-*T. cruzi* de Peptídeos e Conjugados

Peptídeos e conjugados foram avaliados contra *Trypanosoma cruzi*. A cepa utilizada (Tulahuen C2C4 LacZ) foi transfectada com plasmídeo contendo o gene responsável pela expressão de beta-galactosidase em *E. coli*. Uma vez que a β -Gal não ocorre comumente em células de mamíferos, uma estratégia para realizar a quantificação indireta do parasito é através da hidrólise enzimática de galactosídeos, como o CPRG. Desta forma é possível realizar a quantificação do parasito por métodos colorimétricos, mesmo ele estando internalizado em células hospedeiras (BUCKNER et al., 1996).

Para se avaliar a atividade de PACs e conjugados contra amastigotas uma monocamada de células LLC-MK2 fora previamente infectada com tripomastigotas *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ), e os parasitos não internalizados removidos após 24 h a 37°C e 5% CO₂. Seguiu-se tratamento com os compostos a 50 μM e incubação por 96 h a 37°C e 5% CO₂ e quantificação dos parasitos por hidrólise enzimática de CPRG (BUCKNER et al., 1996). A citotoxicidade sobre as células LLC-MK2, na ausência de parasitos e sob as mesmas condições de tratamento, foi determinada pelo método MTT (KUMAR et al., 2018). Os resultados de viabilidade relativa ao controle negativo são mostrados na **Figura 80**. Observou-se que os PACs e conjugados não foram capazes de reduzir de forma significativa a viabilidade de parasitos no interior da célula, em relação à citotoxicidade na célula hospedeira.

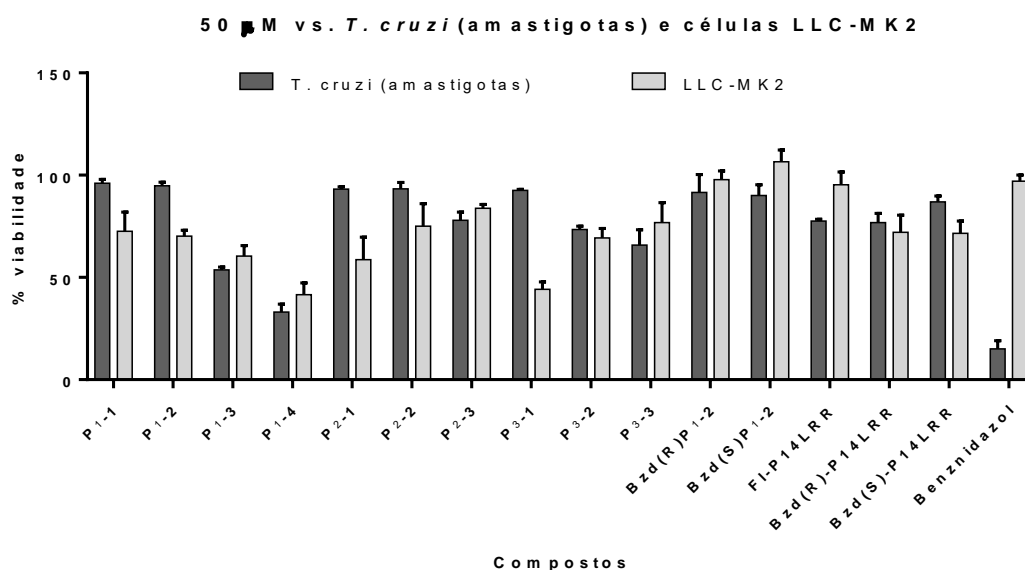


Figura 80. Viabilidade de amastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) e de células LLC-MK2, após 96 h de tratamento com os compostos indicados a 50 μ M.

O *T. cruzi* realiza naturalmente a sialização de sua superfície celular com o objetivo de evadir o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Neste processo, unidades sacarídicas de ácidos siálicos são homologadas às proteínas de superfície do parasito. Como consequência, há um acúmulo de regiões negativamente carregadas na superfície do parasito, devido à porção ionizada carboxilato na estrutura dos ácidos siálicos (FREIRE-DE-LIMA et al., 2012; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000). Desta forma, investigamos também a toxidez dos PACs e conjugados contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*, forma infectiva do parasito, de importância clínica, que realiza o processo de sialização.

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) foram incubados por 24 h a 37°C e 5% CO₂ na presença dos compostos a 50 μ M e a viabilidade celular quantificada pela metodologia MTT (adaptado de SERENO e LEMESRE ALVES, 1997; ALVES PASSOS et al., 2017). Os resultados obtidos de 3 experimentos independentes são mostrados na **Figura 81**. Nestes experimentos os compostos **P1-2**, **P1-4**, **P3-2**, **Bzd(R)-P1-2** e **Bzd(S)-P1-2** se mostraram os mais ativos contra tripomastigotas de *T. cruzi*.

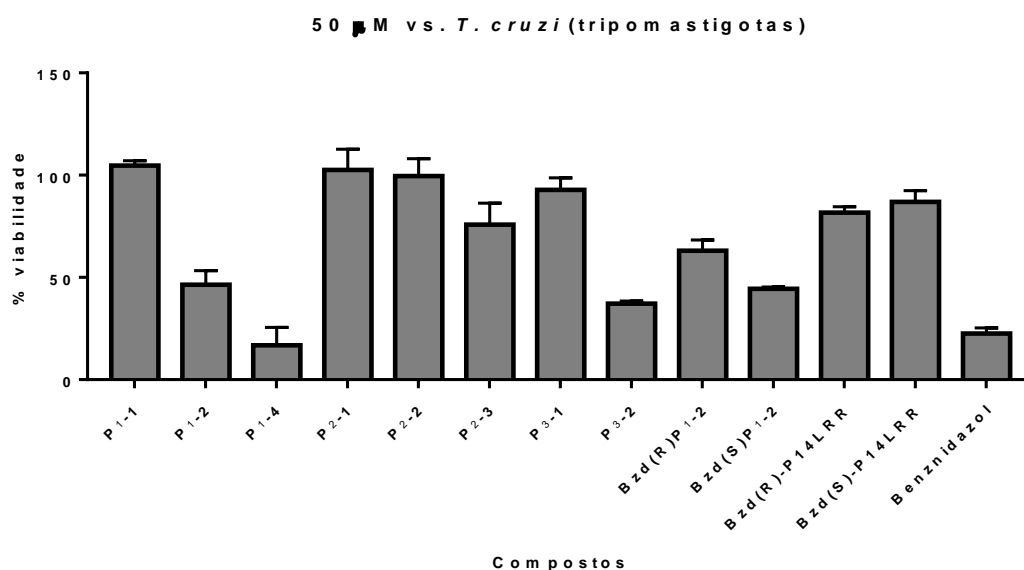


Figura 81. Viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ), após 24 h de tratamento quantificada pelo método MTT.

Os compostos mais ativos, identificados no experimento sob regime de tratamento a 50 μ M, foram selecionados para determinação do CE_{50} . As condições do experimento foram as mesmas, variando-se o regime de tratamento com os compostos para diluição seriada de 50 – 0,5 μ M (6 concentrações). O peptídeo **P1-4** foi avaliado na faixa de 5,0 – 0,05 μ M (6 concentrações). Os resultados de CE_{50} obtidos de experimentos em triplicata são mostrados na **Tabela 13**. O peptídeo **P1-4** foi o mais ativo da série, com $CE_{50} = 1,0 \pm 0,2 \mu$ M. O peptídeo **P1-2** e o conjugado **Bzd(S)-P1-2** apresentaram atividades comparáveis contra tripomastigotas de *T. cruzi*, ao passo que **Bzd(R)-P1-2** não pode ter seu CE_{50} definido na faixa de concentrações avaliada no experimento ($CE_{50} > 50 \mu$ M). Este resultado indica que a estereoquímica da conexão do fármaco benznidazol ao *N*-terminal do peptídeo é um parâmetro relevante para a atividade anti-tripomastigota.

Tabela 13. Valores de CE_{50} para toxidez sobre tripomastigotas de *T. cruzi*.

Composto	CE_{50} vs. <i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)
P1-2	$36,3 \pm 6,9$
P1-4	$1,0 \pm 0,2$
P3-2	$18,9 \pm 7,3$
Bzd(S)-P1-2	$32,2 \pm 7,2$
Bzd(R)-P1-2	> 50
Benznidazol	$32,9 \pm 4,4$

Além da toxicidade direta, os PACs podem também atuar inibindo a infectividade do parasito, se ligando à sua superfície, por atração eletrostática, e assim interferindo no processo de adesão parasito-célula hospedeira (JACOBS et al., 2003). Desta forma, foi avaliada também a capacidade inibitória dos PACs e conjugados contra a infectividade de tripomastigotas. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) foram pré-incubados com os compostos em concentrações variadas, por 30 min a 37°C e 5% CO₂, antes de serem adicionados à uma monocamada de células LLC-MK2. Os parasitos permaneceram em contato com as células por 24 h a 37°C e 5% CO₂. A monocamada foi então lavada para remover os parasitos não internalizados, bem como o excesso de PACs ou conjugados. Os amastigotas internalizados foram cultivados por 96 h a 37°C e 5% CO₂ sendo, em seguida, quantificados por hidrólise enzimática de CPRG (BUCKNER et al., 1996). A citotoxicidade sobre as células LLC-MK2, na ausência de parasitos e sob as mesmas condições de tratamento, foi determinada pelo método MTT (KUMAR et al., 2018). Os resultados dos testes de inibição de infectividade e citotoxicidade sobre células LLC-MK2, obtidos de 3 experimentos independentes, são apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Valores de CE₅₀ para inibição da infectividade de tripomastigotas de *T. cruzi* e de citotoxicidade em células LLC-MK2.

Composto	CE ₅₀ (μM)		SI
	<i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)	LLC-MK2	
P₁₋₁	> 50	> 50	-
P₁₋₂	8,5 ± 2,4	26,7 ± 4,9	3,1
P₁₋₄	0,299 ± 0,086	4,0 ± 0,6	13,2
P₂₋₁	> 50	> 50	-
P₂₋₂	> 50	> 50	-
P₂₋₃	39,3 ± 8,1	> 50	> 1,3
P₃₋₁	> 50	> 50	-
P₃₋₂	10,9 ± 3,0	27,3 ± 2,7	2,6
Bzd(S)-P₁₋₂	9,3 ± 1,0	27,5 ± 1,5	2,9
Bzd(R)-P₁₋₂	20,3 ± 3,6	49,5 ± 2,5	2,4
Bzd(S)-P14LRR	25,8 ± 9,0	> 50	> 1,9
Bzd(R)-P141LRR	23,3 ± 4,4	> 50	> 2,1
Benznidazol	7,7 ± 0,9	> 200	> 26

Analisando-se os resultados da **Tabela 14**, observa-se novamente que o PAC **P₁₋₄** foi o mais promissor da série, sendo capaz de inibir a infectividade em 50% a 299 ± 86 nM, com seletividade de 13,2× em relação à célula hospedeira. Outra observação confirmada nestes

experimentos foi a semelhança entre as atividades do conjugado **Bzd(S)-P1-2** e do peptídeo **P1-2**, ao passo que o conjugado foi **Bzd(S)-P1-2** foi cerca de 2× menos eficaz. Os peptídeos mais curtos (**P1-1**, **P2-1** e **P3-1**) não se mostraram eficazes na inibição da infectividade. Já os conjugados entre o benznidazol e as hélices poliprolina, **Bzd(S)-P14LRR** e **Bzd(R)-P14LRR**, foram capazes de inibir a infectividade do parasito, mas sem que se observassem diferenças significativas entre os estereoisômeros de configurações *R* e *S* na região de conjugação entre o peptídeo e o fármaco.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A síntese dos compostos propostos foi, em sua maior parte, bem sucedida. Os peptídeos e conjugados peptídeo-fármaco foram sintetizados utilizando a metodologia Fmoc de SPFS, que se adequou à demanda deste trabalho, como confirmado pelas técnicas de caracterização, após a purificação dos compostos obtidos.

Os PACs das séries **P₁**, **P₂** e **P₃** foram sintetizados e caracterizados por EM-MALDI-ToF e CLAE-FR. À exceção de **P₂-4**, que apresentou problemas de solubilidade após a precipitação em éter, os demais PACs foram obtidos avaliação do perfil de atividade biológica. Peptídeos da série **P₁** e **P₂**, planejados respectivamente para assumir conformações de alfa-hélice e folha-beta em solução, foram caracterizados por espectroscopia de dicroísmo circular, confirmando nosso planejamento estrutural. Nossa hipótese é a de que a organização da estrutura secundária dos peptídeos é orientada pela interação das cadeias laterais caiônicas [*C*] ou hidrofóbicas [*H*] conforme os respectivos padrões de repetição dos aminoácidos utilizados, [*CCHH*]_n para a série **P₁** e [*CHCH*]_n para a série **P₂**.

A síntese da sequência peptídica **P14LRR**, via SPFS, demandou a preparação prévia de aminoácidos não naturais. Para a síntese de **Fmoc-PL-OH**, foi reproduzido protocolo sintético disponível na literatura, com rendimentos e dados de caracterização condizentes com o previamente reportado. Para **Fmoc-PR(Boc)₂-OH** foi proposta uma rota sintética alternativa, adaptada da rota originalmente prevista. A aplicação da nova proposta possibilitou a síntese em 3 etapas reacionais (contra 5 do protocolo original), com rendimentos globais de 60% (contra 19% do protocolo original). Adicionalmente, a rota alternativa desenvolvida neste trabalho, permitiu que a etapa final de purificação do aminoácido protegido ocorresse sem a utilização de ácido acético, cuja ocorrência residual em SPFS é indesejável. A utilização dos aminoácidos **Fmoc-PL-OH** e **Fmoc-PR(Boc)₂-OH** sintetizados permitiu a construção da cadeia peptídica **P14LRR** por SPFS, que foi modificada em sua porção *N*-terminal também por SPFS para fornecer os compostos planejados.

Para a síntese de conjugados entre peptídeos e o fármaco linezolida, via SPFS, foi necessária a síntese prévia do conjugado peptídeo-espaçador autoimolativo **Lnz-DTBA**, com grupo ácido carboxílico livre. A síntese foi realizada, adaptada de protocolos disponíveis na literatura, e permitiu a obtenção do intermediário desejado em rendimentos adequados para sua utilização em SPFS para a construção dos CPFs **Lnz-P₁-2** e **Lnz-P14LRR**. A conectividade

entre o fármaco e o conector autoimolativo DTBA, via uma ligação imida, sem precedentes na literatura, foi avaliada quanto à sua capacidade e cinética de liberação de linezolida. Os resultados indicam que a liberação do fármaco, promovida pelo ataque intramolecular do conector reduzido, ocorreu tão ou mais rapidamente que a própria reação com DTT, considerado um redutor de ação rápida.

As diversas tentativas para viabilizar a síntese de conjugados entre peptídeos e o fármaco benznidazol via conector autoimolativo e ligação imida não foram bem sucedidas. Foi possível, no entanto, a síntese de conjugados peptídeo-fármaco com estrutura modificada do benznidazol, contendo grupo carboxila ligado ao carbono benzílico da estrutura do fármaco. A síntese se deu por SPFS e foi possível a preparação de produtos com controle da estereoquímica da ligação entre o fármaco e a cadeia peptídica: **Bzd(R)-P1-2**, **Bzd(S)-P1-2**, **Bzd(R)-P14LRR** e **Bzd(S)-P14LRR**.

Os PACs e CPFs obtidos foram avaliados quanto ao seu perfil biológico em um painel variado de tipos celulares.

A citotoxicidade de PACs das séries **P1**, **P2** e **P3** em células de mamíferos foi avaliada em células de linhagem, J774A.1 e LLC-MK2, bem como em hemácias humanas. Para os PACs das séries **P1** e **P3**, com construção da cadeia do tipo $[CCHH]_n$, foi observado um perfil tóxico crescente com o aumento do comprimento da cadeia peptídica. Já os PACs da série **P2**, de constituição $[CHCH]_n$, não mostraram toxidez apreciável nas concentrações de 32 μM contra células J774A.1, 40 μM contra hemácias humanas e 50 μM contra células LLC-MK2. O perfil de penetração celular de PACs de série **P1**, marcados com sondas fluorescentes, foi avaliado em células J774A.1, tanto por citometria de fluxo, quanto por microscopia confocal. Foi observado que os peptídeos têm a capacidade de se acumular, preferencialmente, no meio intracelular, demonstrando seu potencial para aplicação como peptídeos de penetração celular.

A caracterização do perfil de penetração celular do CPF **Lnz-F1-P14LRR** ocorreu de forma similar. Foi demonstrada a sua capacidade de penetração e acúmulo no meio intracelular, observando-se um perfil de colocalização com lisossomos. Esses resultados são interessantes especialmente em face ao perfil de liberação do fármaco linezolida, já comentado. As características de penetração celular do CPF, associadas à capacidade de liberação rápida do fármaco a partir da redução do conector autoimolativo, apontam para um potencial promissor desta estratégia de conjugação para sua utilização contra infecções bacterianas persistentes no interior de células.

A atividade antibacteriana de PACs e CPFs foi avaliada contra *E. coli*. Os PACs das séries **P₁** [**AcYG(RRLL)**_n] **P₂** [**AcYG(RLRL)**_n] e **P₃** [**AcYG(RRWW)**₃] mostraram perfil de atividade dependente da estrutura. Peptídeos com n = 1 não demonstraram atividade antibacteriana. Peptídeos com n = 2 e n = 3 se mostraram os mais ativos, enquanto uma redução da atividade antibacteriana foi observada com o aumento da cadeia peptídica (n = 4). Ensaio de liberação de β-galactosidase do citoplasma de *E. coli* indicam que o dano à membrana bacteriana é um mecanismo de ação importante, mas provavelmente não o único para os peptídeos **P₁₋₂** e **P₃₋₂**.

O CPF **Lnz-P₁₋₂** apresentou um conjunto de atividades, antibacteriana e citotóxica, mais próxima ao conjunto observado para os peptídeos mais longos da série **P₁**, **P₁₋₃** e **P₁₋₄**. Já o CPF **Lnz-P14LRR** apresentou um conjunto de atividades mais similar ao peptídeo parental, **Fl-P14LRR**. Esta observação pode ter relação com a maior rigidez da cadeia de **P14LRR**, baseada em esqueleto de PPII, em comparação aos peptídeos da série **P₁**. Assim, conjugações na porção N-terminal tem um maior potencial de alterar a conformação em nível de estrutura secundária das sequências peptídicas da série **P₁** do que em conjugados com o peptídeo **P14LRR**, alterando também seu perfil de atividade.

A avaliação do perfil de atividade de PACs e CPFs em *T. cruzi* mostrou uma baixa eficácia contra formas amastigotas intracelulares, possivelmente associada à instabilidade de peptídeos compostos unicamente de aminoácidos naturais em ambiente proteolítico. Já o perfil de atividade sobre formas tripomastigotas em suspensão se mostrou dependente do comprimento das cadeias peptídicas, apresentando-se maior com o crescimento das cadeias. Foram observadas diferenças entre os perfis de toxidez e inibição da infectividade sobre tripomastigotas de *T. cruzi*, indicando que os PACs e conjugados podem inibir a infecção em concentrações em que não apresenta toxidez ao parasito. Uma observação interessante deste experimento foi o perfil de atividade superior do conjugado **Bzd(S)-P₁₋₂**, em comparação ao **Bzd(R)-P₁₋₂**, que pode estar à melhor acomodação da L-Phg à cadeia peptídica do que a D-Phg, que possui configuração estereoquímica diferente dos demais aminoácidos da cadeia. Destaca-se nesse sentido a atividade do PAC **P₁₋₄**, que apresentou atividade sobre tripomastigotas: CE₅₀ = 1,0 ± 0,2 μM para toxidez e CE₅₀ = 299 ± 86 nM para inibição da infectividade.

Cabe salientar que a realização deste trabalho foi importante para sedimentar a linha de investigação utilizando peptídeos como base molecular em nosso grupo de pesquisa. Desta forma, foi estabelecida a base para trabalhos futuros, derivados ou não do conjunto de resultados

apresentado nesta Tese. Como perspectivas futuras deste trabalho podem-se incluir a investigação quanto ao perfil de atividade de PACs com modificações na porção apolar da cadeia, visando ajustar o binômio toxidez contra células de mamíferos *versus* atividade contra patógenos. Também a ampliação da investigação quanto à atividade de penetração celular de PACs das séries **P₂** e **P₃**, bem como sua conjugação com outros fármacos, cujo acúmulo no ambiente intracelular seja interessante. Neste sentido, novas rotas sintéticas para conjugação do benznidazol a um PPC, via um espaçador autoimolativo podem ser propostas para a obtenção de um CPF mais eficiente contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. As perspectivas incluem ainda uma descrição mais fina do perfil de atividade biológica do CPF **Lnz-P14LRR**, incluindo a avaliação em um painel de espécies bacterianas de cepas clinicamente relevantes, especialmente *gram*-positivas. Também serão feitas avaliações em modelos de infecção bacteriana intracelular e contra biofilmes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADADE, Camila M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227-239, 2013.
- AGER, Sally; GOULD, Kate. Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Infection and drug resistance**, v. 5, p. 87, 2012.
- AITKEN, Alastair; LEARMONTH, Michèle P. Protein determination by UV absorption. In: **The protein protocols handbook**. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. p. 3-6.
- AKSNES, Henriette; HOLE, Kristine; ARNESEN, Thomas. Molecular, cellular, and physiological significance of N-terminal acetylation. **International review of cell and molecular biology**, v. 316, p. 267-305, 2015.
- ALSINA, Jordi; ALBERICIO, Fernando. Solid-phase synthesis of C-terminal modified peptides. **Peptide Science**, v. 71, n. 4, p. 454-477, 2003.
- ALVES PASSOS, Carlos Luan et al. Anti-Leishmania amazonensis activity of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. **Parasitology international**, 2017.
- ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- AVALOS, Martin et al. NMR Studies of sugar amides and thioamides. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 12, p. 2205-2215, 1992.
- AVALOS, Martin et al. Reaction of thioamides with silver carboxylates in aprotic media. A nucleophilic approach to the synthesis of imides, amides, and nitriles. **Tetrahedron letters**, v. 35, n. 3, p. 477-480, 1994.
- AVALOS, Martín et al. Reactions of thioamides with metal carboxylates in organic media. **Tetrahedron**, v. 53, n. 42, p. 14463-14480, 1997.
- BANGSTAD, Hans-Jacob et al. Insulin treatment. 2007.
- BANTING, Frederick Grant et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 12, n. 3, p. 141, 1922.
- BEHRENDT, Raymond; WHITE, Peter; OFFER, John. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 1, p. 4-27, 2016.
- BODKIN, Michael J.; GOODFELLOW, Julia M. Hydrophobic solvation in aqueous trifluoroethanol solution. **Biopolymers**, v. 39, n. 1, p. 43-50, 1996.
- BÖHME, David; BECK-SICKINGER, Annette G. Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 186-200, 2015.
- BRADY, Kieran; HEGARTY, Anthony F. The isoimide-imide rearrangement. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 1, p. 121-126, 1980.

BRAY, Brian L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 7, p. 587-593, 2003.

BREZDEN, Anna et al. Dual targeting of intracellular pathogenic bacteria with a cleavable conjugate of kanamycin and an antibacterial cell-penetrating peptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 34, p. 10945-10949, 2016.

BROWN, Tyler D.; WHITEHEAD, Kathryn A.; MITRAGOTRI, Samir. Materials for oral delivery of proteins and peptides. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 2, p. 127-148, 2020.

BUCKNER, Frederick S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

CAREY, Francis A. **Química Orgânica-Vol. 2**. AMGH Editora, 2011.

CARPINO, Louis A. et al. The 2, 2, 4, 6, 7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. **Tetrahedron letters**, v. 34, n. 49, p. 7829-7832, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL - <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAN, David I.; PRENNER, Elmar J.; VOGEL, Hans J. Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1184-1202, 2006.

CHEN, Yuxin et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1398-1406, 2007.

CLANCY, Cornelius J.; NGUYEN, M. Hong. Coronavirus disease 2019, superinfections, and antimicrobial development: what can we expect?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 10, p. 2736-2743, 2020.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 641-645, 2011.

DA'SAN MM, Jaradat. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. **Amino acids**, v. 50, n. 1, p. 39-68, 2018.

DE SOUZA, Rita de Cássia Moreira et al. Chagas disease in the context of the 2030 agenda: Global warming and vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e200479, 2021.

DENG, Zhengyu; HU, Jinming; LIU, Shiyong. Disulfide-Based Self-Immolative Linkers and Functional Bioconjugates for Biological Applications. **Macromolecular rapid communications**, v. 41, n. 1, p. 1900531, 2020.

DESLOUCHES, Berthony et al. Engineered cationic antimicrobial peptides (eCAPs) to combat multidrug-resistant bacteria. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 501, 2020.

DIETSCHE, Thomas A. et al. Targeting Intracellular Pathogenic Bacteria Through N-Terminal Modification of Cationic Amphiphilic Polyproline Helices. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 7468-7475, 2020.

DUBEY, Sunil Kumar et al. Oral peptide delivery: Challenges and the way ahead. **Drug discovery today**, 2021.

ECHEVERRÍA, Luis Eduardo et al. WHF IASC roadmap on Chagas disease. **Global heart**, v. 15, n. 1, 2020.

FANG, I.-Ju; TREWYN, Brian G. Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins. **Methods in Enzymology**, v. 508, p. 41-59, 2012.

FIELDS, Gregg B. **Methods in enzymology. Vol. 289, Solid-phase peptide synthesis**. Academic Press, 1997.

FILLON, Yannick A.; ANDERSON, Jason P.; CHMIELEWSKI, Jean. Cell penetrating agents based on a polyproline helix scaffold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 33, p. 11798-11803, 2005.

FORNS, Pilar; ALBERICIO, Fernando. Merrifield Resin. **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis**, 2001.

FREIRE-DE-LIMA, Leonardo et al. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Immunology**, 3, e356, 2012.

GAJDÁCS, Márió. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 892, 2019.

GAO, Xinli et al. Membrane potential drives direct translocation of cell-penetrating peptides. **Nanoscale**, v. 11, n. 4, p. 1949-1958, 2019.

GATLIN, Larry A. et al. Freeze-Drying Concepts: The Basics. In: **Protein Formulation and Delivery**. CRC Press, 2007. p. 195-214.

GEISLER, Iris M.; CHMIELEWSKI, Jean. Dimeric cationic amphiphilic polyproline helices for mitochondrial targeting. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 11, p. 2797-2807, 2011.

GEISLER, Iris; CHMIELEWSKI, Jean. Cationic amphiphilic polyproline helices: side-chain variations and cell-specific internalization. **Chemical biology & drug design**, v. 73, n. 1, p. 39-45, 2009.

GESTIN, Maxime; DOWAIDAR, Moataz; LANGEL, Ülo. Uptake mechanism of cell-penetrating peptides. In: **Peptides and peptide-based biomaterials and their biomedical applications**. Springer, Cham, 2017. p. 255-264.

GIULIANI, Andrea; PIRRI, Giovanna; NICOLETTO, Silvia. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Open Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.

GNAIM, Samer; SHABAT, Doron. Quinone-methide species, a gateway to functional molecular systems: from self-immolative dendrimers to long-wavelength fluorescent dyes. **Accounts of chemical research**, v. 47, n. 10, p. 2970-2984, 2014.

GOODWIN, D.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 26, p. 4451-4461, 2012.

GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GWADZ, R. W. et al. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infection and immunity**, v. 57, n. 9, p. 2628-2633, 1989.

HABAULT, Justine; POYET, Jean-Luc. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 927, 2019.

HALLAL, Pedro C.; VICTORA, Cesar G. Overcoming Brazil's monumental COVID-19 failure: an urgent call to action. **Nature Medicine**, v. 27, n. 6, p. 933-933, 2021.

HANSEN, Lars H.; KNUDSEN, Steen; SØRENSEN, Søren J. The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. **Current microbiology**, v. 36, n. 6, p. 341-347, 1998.

HARRINGTON, John M. Antimicrobial peptide killing of African trypanosomes. **Parasite immunology**, v. 33, n. 8, p. 461-469, 2011.

HARTRAMPF, Nina et al. Synthesis of proteins by automated flow chemistry. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 980-987, 2020.

HENNRICH, Ute; KOPKA, Klaus. Lutathera®: the first FDA-and EMA-approved radiopharmaceutical for peptide receptor radionuclide therapy. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 114, 2019.

HERNANDEZ-GORDILLO, Victor; GEISLER, Iris; CHMIELEWSKI, Jean. Dimeric unnatural polyproline-rich peptides with enhanced antibacterial activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 556-559, 2014.

HOF, Herbert. Antibacterial activities of the antiparasitic drugs nifurtimox and benznidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 404-405, 1989.

<https://www.anm.org.br/carlos-justiniano-ribeiro-das-chagas>: acessado em 30/12/2021.

HU, Gaowei et al. A novel CAV derived cell-penetrating peptide efficiently delivers exogenous molecules through caveolae-mediated endocytosis. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2018.

ISIDRO-LLOBET, Albert; ALVAREZ, Mercedes; ALBERICIO, Fernando. Amino acid-protecting groups. **Chemical reviews**, v. 109, n. 6, p. 2455-2504, 2009.

JACOBS, Thomas et al. NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against Trypanosoma cruzi. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 607-613, 2003.

JESBERGER, Martin; DAVIS, Thomas P.; BARNER, Leonie. Applications of Lawesson's reagent in organic and organometallic syntheses. **Synthesis**, v. 2003, n. 13, p. 1929-1958, 2003.

JOSSE, Olivier; LABAR, Daniel; MARCHAND-BRYNAERT, Jacqueline. A Convenient Synthesis of Ethyl 3-Aminopropanedithioate (β -Alanine Ethyl Dithioester). **Synthesis**, v. 1999, n. 03, p. 404-406, 1999.

JUBAN, Martha M.; JAVADPOUR, Maryam M.; BARKLEY, Mary D. Circular dichroism studies of secondary structure of peptides. In: **Antibacterial peptide protocols**. Humana Press, 1997. p. 73-78.

JUNG, David et al. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. **Chemistry & biology**, v. 11, n. 7, p. 949-957, 2004.

KAISER, Emil Thomas. The 1984 Nobel Prize in Chemistry. **Science**, v. 226, n. 4679, p. 1151-1153, 1984.

KAKSONEN, Marko; ROUX, Aurélien. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 313-326, 2018.

KARDANI, Kimia et al. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers. **Expert opinion on drug delivery**, v. 16, n. 11, p. 1227-1258, 2019.

KAWAGUCHI, Yoshimasa et al. Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides. **Bioconjugate chemistry**, v. 27, n. 4, p. 1119-1130, 2016.

KENTZIS, Alex; SOSNICK, Tobin R. Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding. **Biochemistry**, v. 37, n. 41, p. 14613-14622, 1998.

KIRKBY, Melissa; HUTTON, Aaron RJ; DONNELLY, Ryan F. Microneedle mediated transdermal delivery of protein, peptide and antibody based therapeutics: current status and future considerations. **Pharmaceutical research**, v. 37, p. 1-18, 2020.

KITANI, Hiroshi et al. Synthetic nonamer peptides derived from insect defensin mediate the killing of African trypanosomes in axenic culture. **Parasitology research**, v. 105, n. 1, p. 217-225, 2009.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

KURIAKOSE, Jerrin et al. Targeting intracellular pathogenic bacteria with unnatural proline-rich peptides: coupling antibacterial activity with macrophage penetration. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 37, p. 9664-9667, 2013.

LACERDA, Ariane F. et al. Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 91, 2016.

LANGEL, Ülo. Clinical Trials and Commercialization Using CPPs. In: **CPP, Cell-Penetrating Peptides**. Springer, Singapore, 2019. p. 395-408.

- LEE, Ming-Tao et al. Process of inducing pores in membranes by melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.
- LEI, Jun et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 3919, 2019.
- LIANG, Chen et al. Phenylglycine racemization in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis: Stereochemical stability is achieved by choice of reaction conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 24, p. 2325-2329, 2017.
- LIDANI, Kárita Cláudia Freitas et al. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 166, 2019.
- LÖFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2008.
- LYDDIARD, Dane; JONES, Graham L.; GREATREX, Ben W. Keeping it simple: lessons from the golden era of antibiotic discovery. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 8, 2016.
- MA, Q. Q. et al. Rational design of cationic antimicrobial peptides by the tandem of leucine-rich repeat. **Amino Acids**, v. 44, n. 4, p. 1215-1224, 2013.
- MANGONI, Maria Luisa et al. Effect of natural L-to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**, v. 45, n. 13, p. 4266-4276, 2006.
- MARTIN, Vincent et al. Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective. **RSC Advances**, v. 10, n. 69, p. 42457-42492, 2020.
- MAYA, Juan Diego et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.
- MCGWIRE, Bradford S.; KULKARNI, Manjusha M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 397-405, 2010.
- MEDONE, Paula et al. The impact of climate change on the geographical distribution of two vectors of Chagas disease: implications for the force of infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1665, p. 20130560, 2015.
- MENDEZ-SAMPERIO, Patricia; DE-LA-ROSA-ARANA, J. L. Antimicrobial peptides as parasiticidal against human trypanosomatids: mechanisms of action and current status in development. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 195-208, 2013.
- MERRIFIELD, Robert B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.
- MILLER, David S. et al. ZoptEC: Phase III study of zoptarelin doxorubicin (AEZS-108) in platinum-taxane pretreated endometrial cancer (Study AEZS-108-050). 2014.

MOHAMED, Mohamed F. et al. Targeting biofilms and persisters of ESKAPE pathogens with P14KanS, a kanamycin peptide conjugate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 848-859, 2017.

MOLYNEUX, David H. et al. The history of the neglected tropical disease movement. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 2, p. 169-175, 2021.

MOOKHERJEE, Neeloffer et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nature reviews Drug discovery**, v. 19, n. 5, p. 311-332, 2020.

MORADI, Mahmoud et al. A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers. **The Journal of chemical physics**, v. 133, n. 12, p. 09B614, 2010.

MULANI, Mansura S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 539, 2019.

MUTTENTHALER, Markus et al. Trends in peptide drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 4, p. 309-325, 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NEPAL, Manish et al. A library approach to cationic amphiphilic polyproline helices that target intracellular pathogenic bacteria. **ACS infectious diseases**, v. 4, n. 9, p. 1300-1305, 2018.

NEPAL, Manish et al. Targeting intracellular bacteria with an extended cationic amphiphilic polyproline helix. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5930-5936, 2015.

NIKAIDO, Hiroshi. Multidrug resistance in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

NOBLE, James E.; BAILEY, Marc JA. Quantitation of protein. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 73-95, 2009.

NUSSBAUM, K. et al. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1594-1617, 2010.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. Disponível em: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>. Acesso em 17/12/2021

ONOUE, Satomi; HASHIMOTO, Naofumi; YAMADA, Shizuo. Dry powder inhalation systems for pulmonary delivery of therapeutic peptides and proteins. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 4, p. 429-442, 2008.

OZTURK, Turan; ERTAS, Erdal; MERT, Olcay. Use of Lawesson's reagent in organic syntheses. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 5210-5278, 2007.

PACE, C. Nick et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein science**, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PALLADINO, Pasquale; STETSENKO, Dmitry A. New TFA-free cleavage and final deprotection in Fmoc solid-phase peptide synthesis: Dilute HCl in fluoro alcohol. **Organic letters**, v. 14, n. 24, p. 6346-6349, 2012.

PALOMO, Jose M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. **Rsc Advances**, v. 4, n. 62, p. 32658-32672, 2014.

PATEL, Jean B.; COCKERILL, F. R.; BRADFORD, Patricia A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement. 2015.

PELFRENE, Eric; BOTGROS, Radu; CAVALERI, Marco. Antimicrobial multidrug resistance in the era of COVID-19: a forgotten plight?. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2021.

PEREIRA, Paulo Câmara Marques; NAVARRO, Elaine Cristina. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, p. 1-17, 2013.

PEREIRA-CHIOCCOLA, Vera Lucia et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of cell science**, v. 113, n. 7, p. 1299-1307, 2000.

PICOLI, Tony et al. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 57-62, 2017.

PINTO, Erika Gracielle et al. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 4, p. 655-660, 2013.

POGLIANO, Joe; POGLIANO, Nicolas; SILVERMAN, Jared A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4494-4504, 2012.

RAMI, Marouan et al. Hypoxia-targeting carbonic anhydrase IX inhibitors by a new series of nitroimidazole-sulfonamides/sulfamides/sulfamates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 21, p. 8512-8520, 2013.

REDKA, Dar'ya S. et al. Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis. **Molecular biology of the cell**, v. 29, n. 1, p. 53-65, 2018.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 856, 2001.

RICE, Louis B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S11-S19, 2006.

ROUX, Stéphane et al. Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 14, n. 3, p. 354-359, 2008.

RUGGIERO, Michael T. et al. Measuring the Elasticity of Poly-L-Proline Helices with Terahertz Spectroscopy. **Angewandte Chemie**, v. 128, n. 24, p. 6991-6995, 2016.

SABNIS, Ram Wasudeo. **Handbook of fluorescent dyes and probes**. John Wiley & Sons, 2015.

SERENO, Denis; LEMESRE, Jean-Loup. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitology research**, v. 83, n. 4, p. 401-403, 1997.

SHANG, Jing et al. Steric and electronic effects in the synthesis and regioselective hydrolysis of unsymmetrical imides. **Australian Journal of Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 1854-1858, 2015.

SINGH, Rajeeva et al. [14] Reagents for rapid reduction of disulfide bonds. **Methods in enzymology**, v. 251, p. 167-173, 1995.

SOLOMONS, TW Graham; FRYHLE, Craig B; SNYDER, Scott A. **Química Orgânica. Vol 2..** LTC Editora, 2018.

SOUZA, André LA et al. Temporizin and Temporizin-1 peptides as novel candidates for eliminating *Trypanosoma cruzi*. **Plos one**, v. 11, n. 7, p. e0157673, 2016.

SREERAMA, Narasimha; WOODY, Robert W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.

STAECKER, Hinrich et al. Efficacy and safety of AM-111 in the treatment of acute unilateral sudden deafness—a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 3 study. **Otology & Neurotology**, v. 40, n. 5, p. 584, 2019.

STEPHENS, Liam J. et al. Antimicrobial innovation: a current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2035-2065, 2020.

STEVEN, S. Yu et al. A phase II trial of AEZS-108 in castration-and taxane-resistant prostate cancer. **Clinical genitourinary cancer**, v. 15, n. 6, p. 742-749, 2017.

THANGAMANI, Shankar et al. Antibacterial activity and therapeutic efficacy of FI-PRPRPL-5, a cationic amphiphilic polyproline helix, in a mouse model of staphylococcal skin infection. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 5749, 2015.

THIBODEAU, Stacey A.; FANG, Rui; JOUNG, J. Keith. High-throughput β -galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems. **Biotechniques**, v. 36, n. 3, p. 410-415, 2004.

TIPPIN, Brigitte; PHAM, Phuong; GOODMAN, Myron F. Error-prone replication for better or worse. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 6, p. 288-295, 2004.

TRAVKOVA, Oksana G.; MOEHWALD, Helmuth; BREZESINSKI, Gerald. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in colloid and interface science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

TSAI, Chia-Lung et al. Preparation and conformational analysis of polyproline tri-helix macrocycle nanoscaffolds of varied sizes. **Nanoscale**, v. 13, n. 8, p. 4592-4601, 2021.

TULLA-PUCHE, Judit et al. Methods for the peptide synthesis and analysis. **Peptide Chemistry and Drug Design; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA**, p. 11-73, 2015.

VHORA, Imran et al. Protein–and peptide–drug Conjugates: an emerging drug delivery technology. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 98, p. 1-55, 2015.

WANG, Guangshun; LI, Xia; WANG, Zhe. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1087-D1093, 2016.

WEI, Yang; THYPARAMBIL, Aby A.; LATOUR, Robert A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2331-2337, 2014.

WINKLER, Dirk FH. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis. In: **Peptide Synthesis**. Humana, New York, NY, 2020. p. 59-94.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases**. World Health Organization, 2013.

XIE, Jing et al. Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: From preclinical research to clinical application. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 697, 2020.

YANG, Guang et al. The chirality induction and modulation of polymers by circularly polarized light. **Symmetry**, v. 11, n. 4, p. 474, 2019.

YAVARI, Bahram et al. The potential use of peptides in cancer treatment. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, n. 8, p. 759-770, 2018.

ZAIMA, Nobuhiro et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 12, p. 5040-5055, 2010.

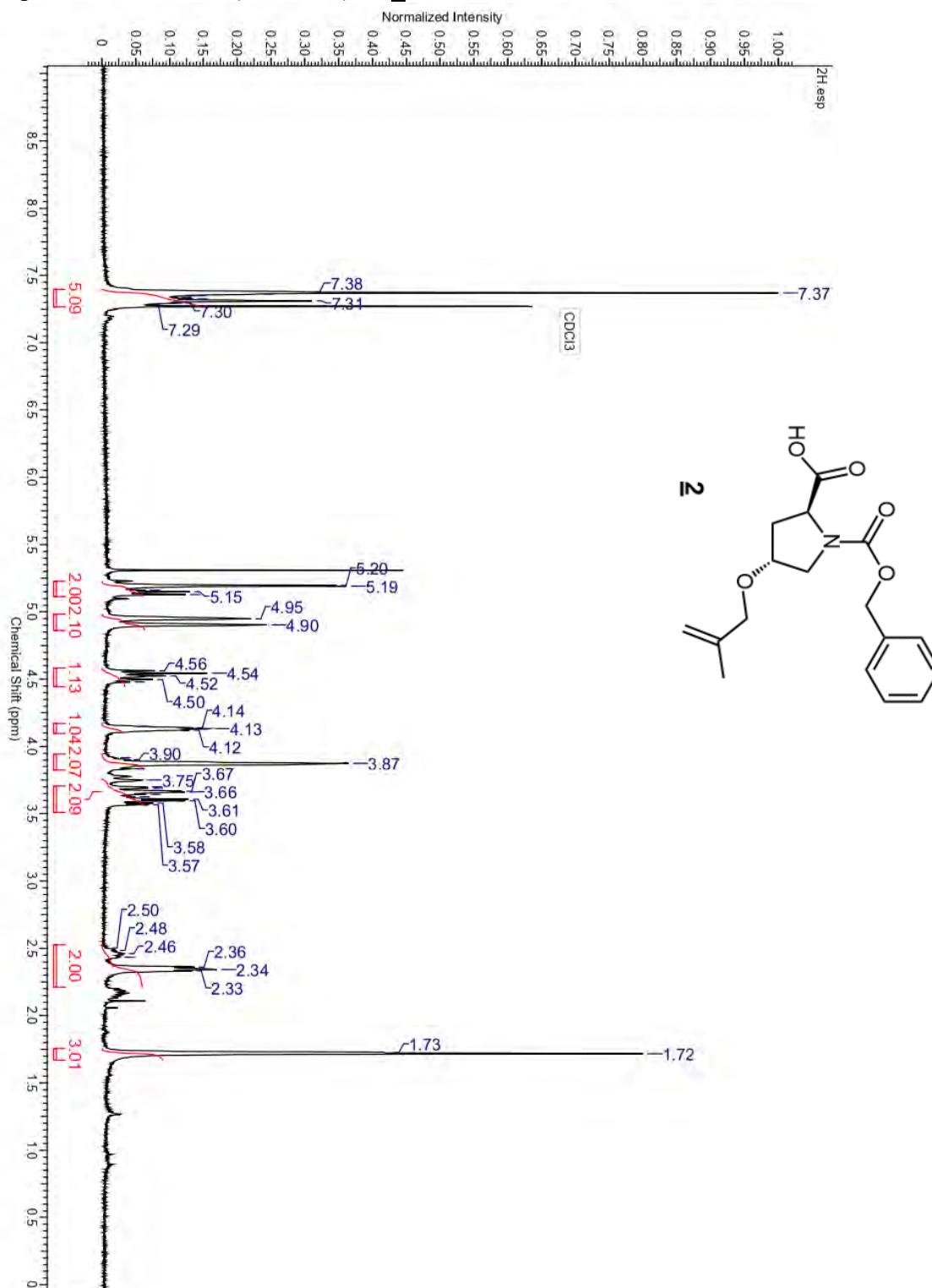
ZHANG, Yajie et al. Just how prevalent are peptide therapeutic products? A critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 119491, 2020.

7. ANEXOS

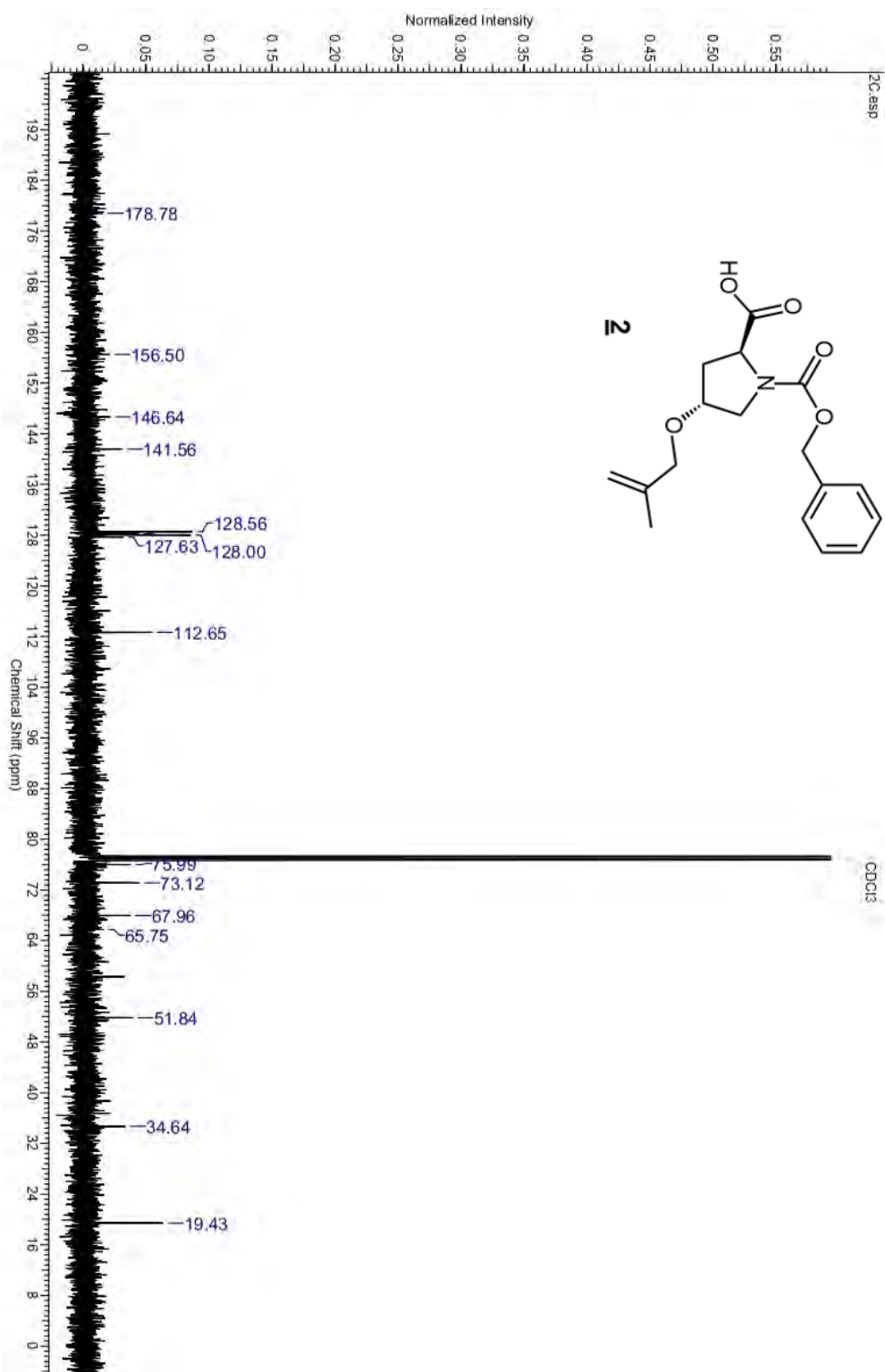
7.1. Espectros de Caracterização de Produtos e Intermediários

7.1.1. Intermediário **2**

Ácido (2S,4R)-1-((benziloxi)carbonil)-4-((2-metilalil)oxi)pirrolidina-2-carboxílico
Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de **2**

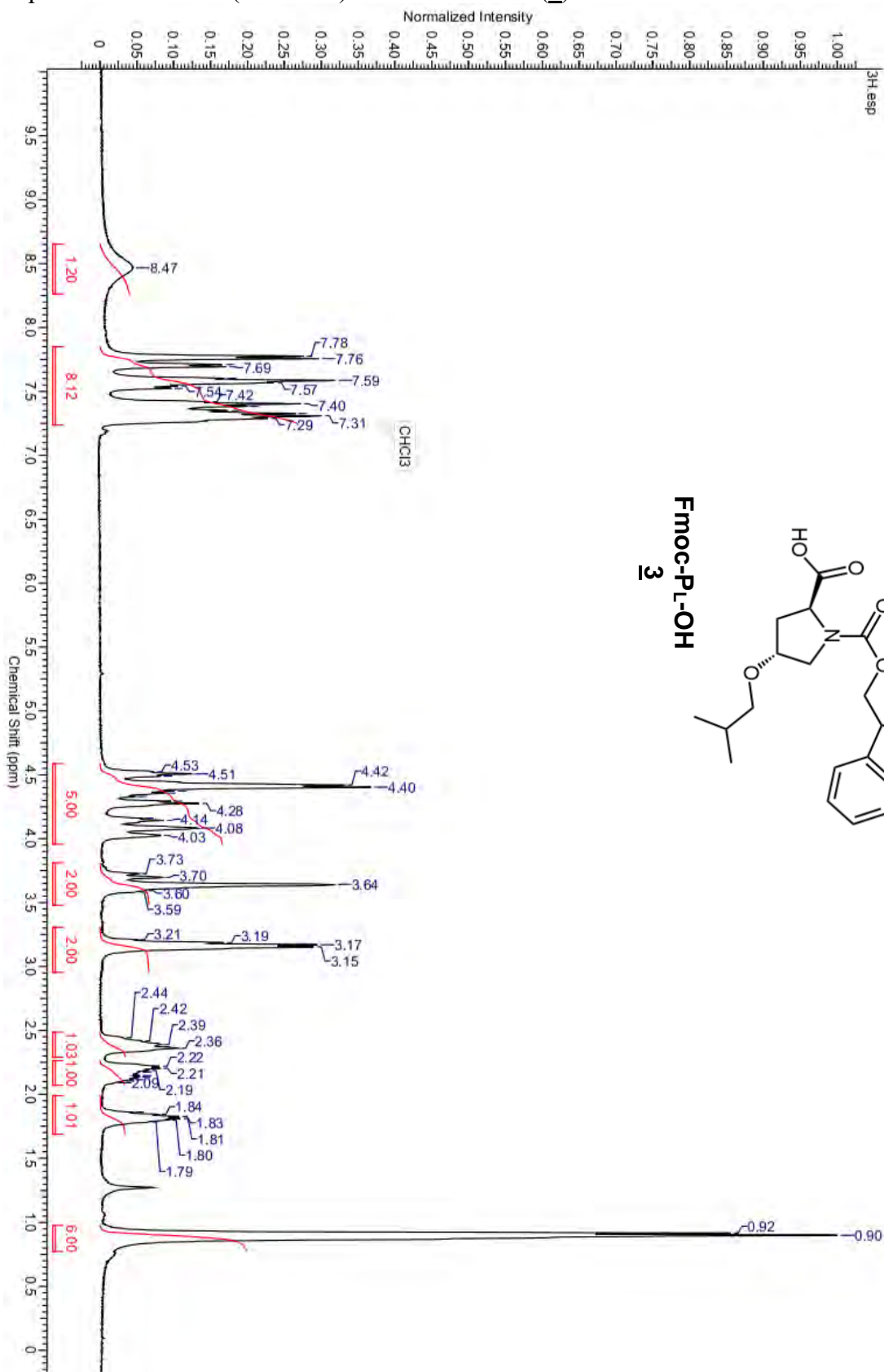


Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **2**

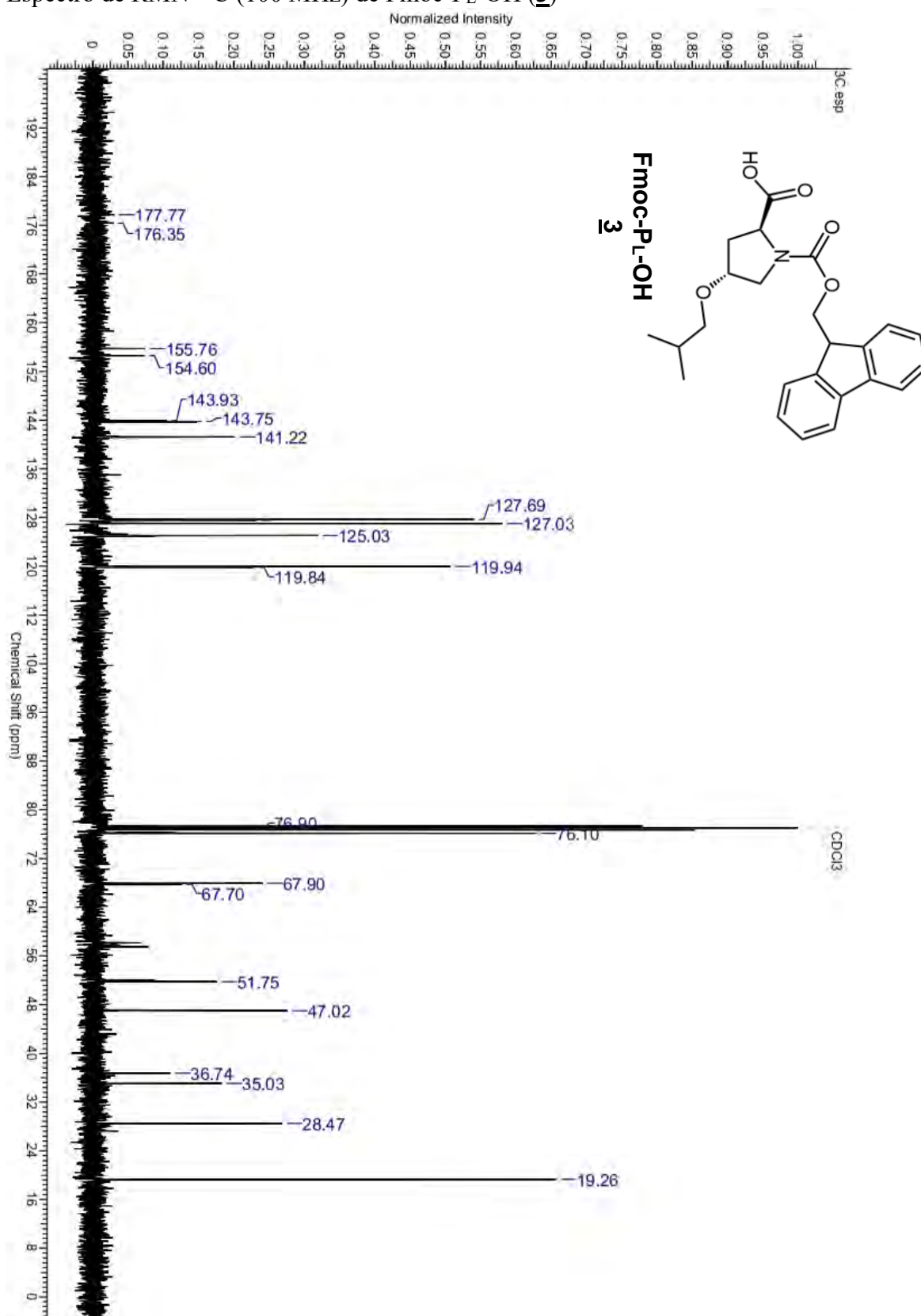


7.1.2. Fmoc-PL-OH (3)

Ácido (2S,4R)-1-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)-4-isobutoxipirrolidina-2-carboxílico
Espectro de RMN ^1H (400 MHz). de Fmoc-PL-OH (3)



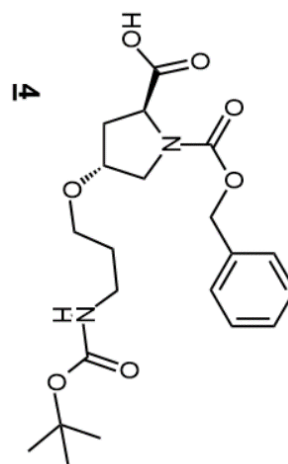
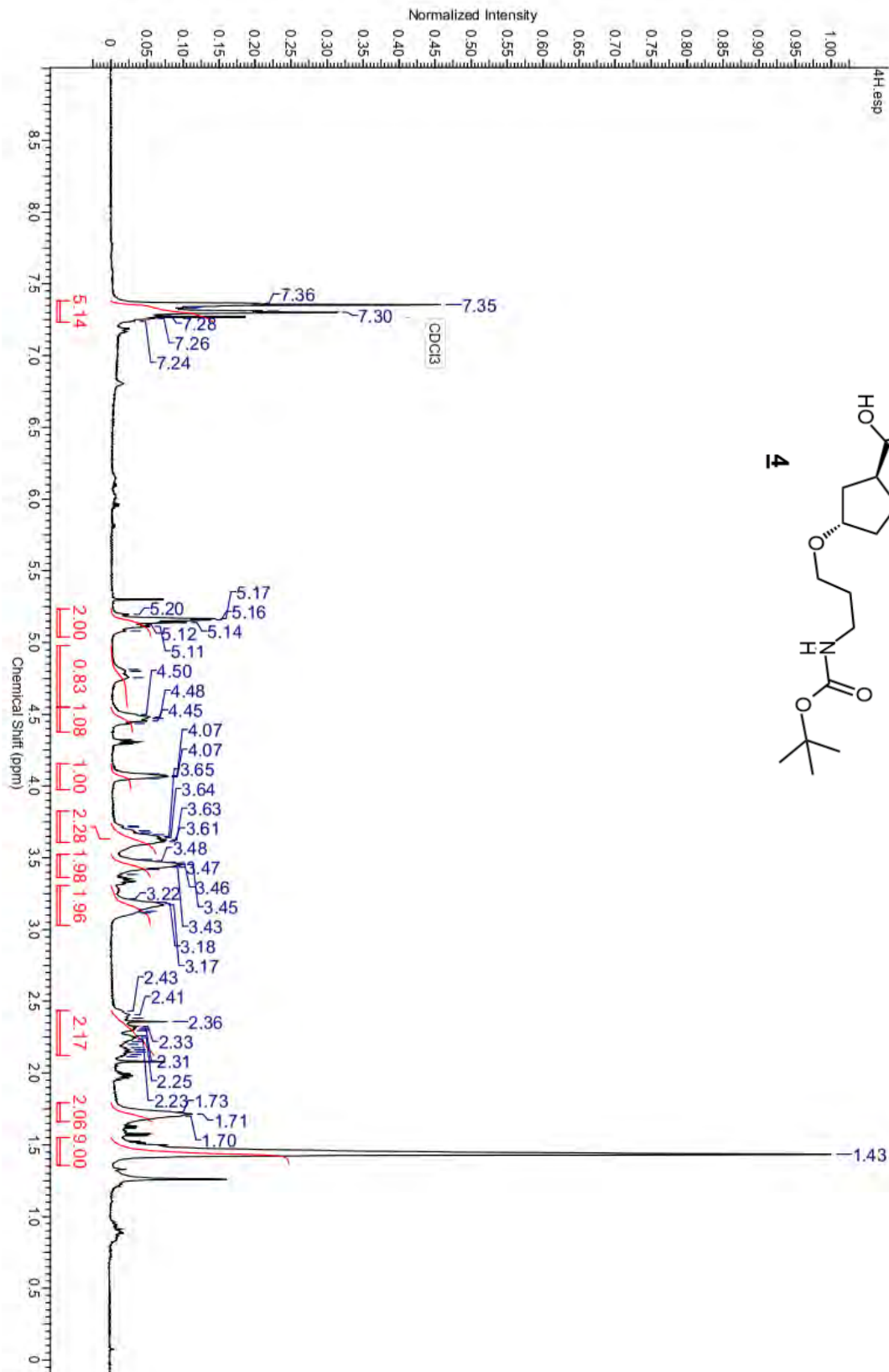
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de Fmoc-PL-OH (**3**)



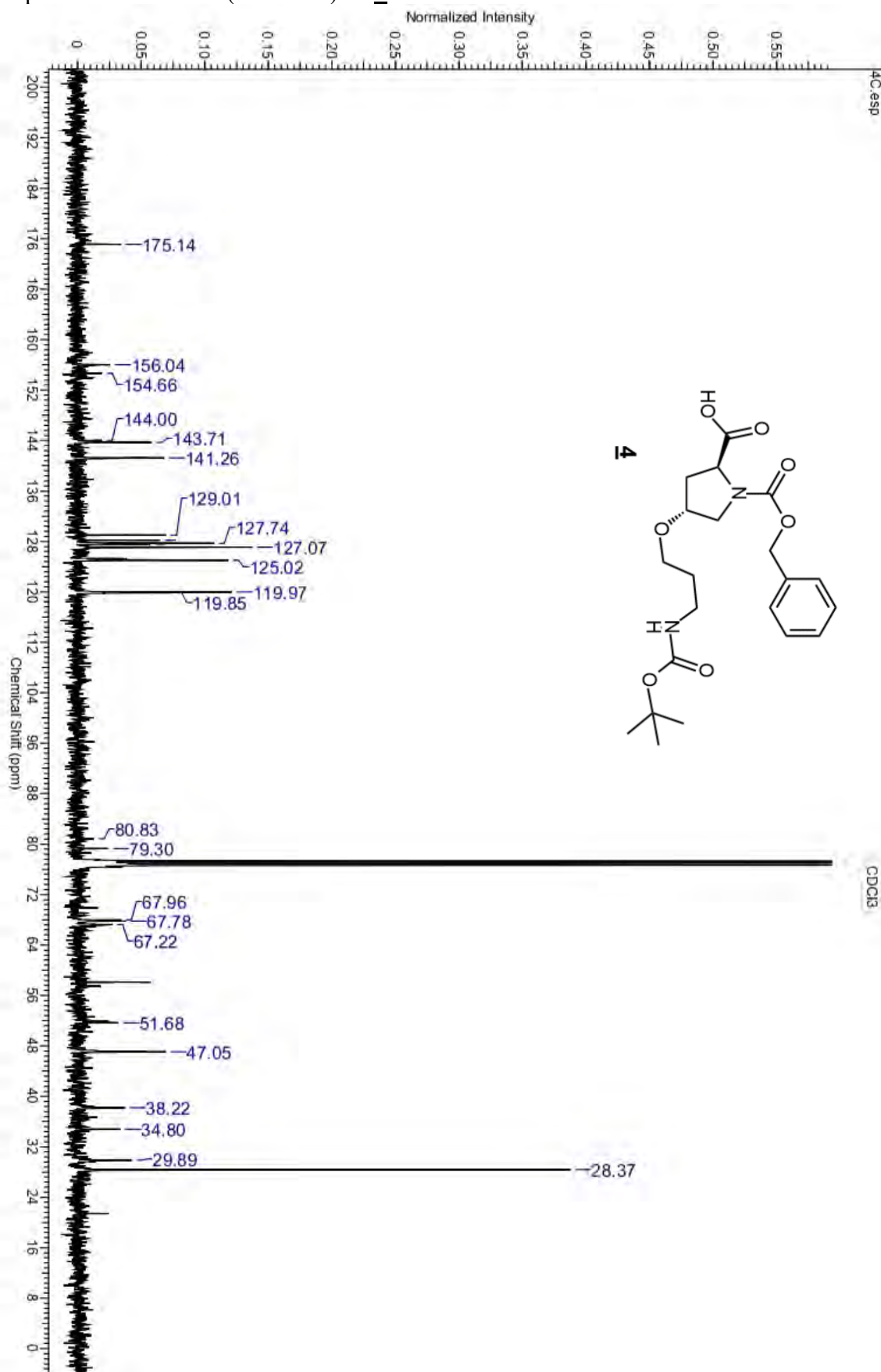
7.1.3. Intermediário **4**

Ácido (2S,4R)-1-((benziloxi)carbonil)-4-(3-((tert-butoxicarbonil)amino)proxi)pirrolidina-2-carboxílico

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de **4**.



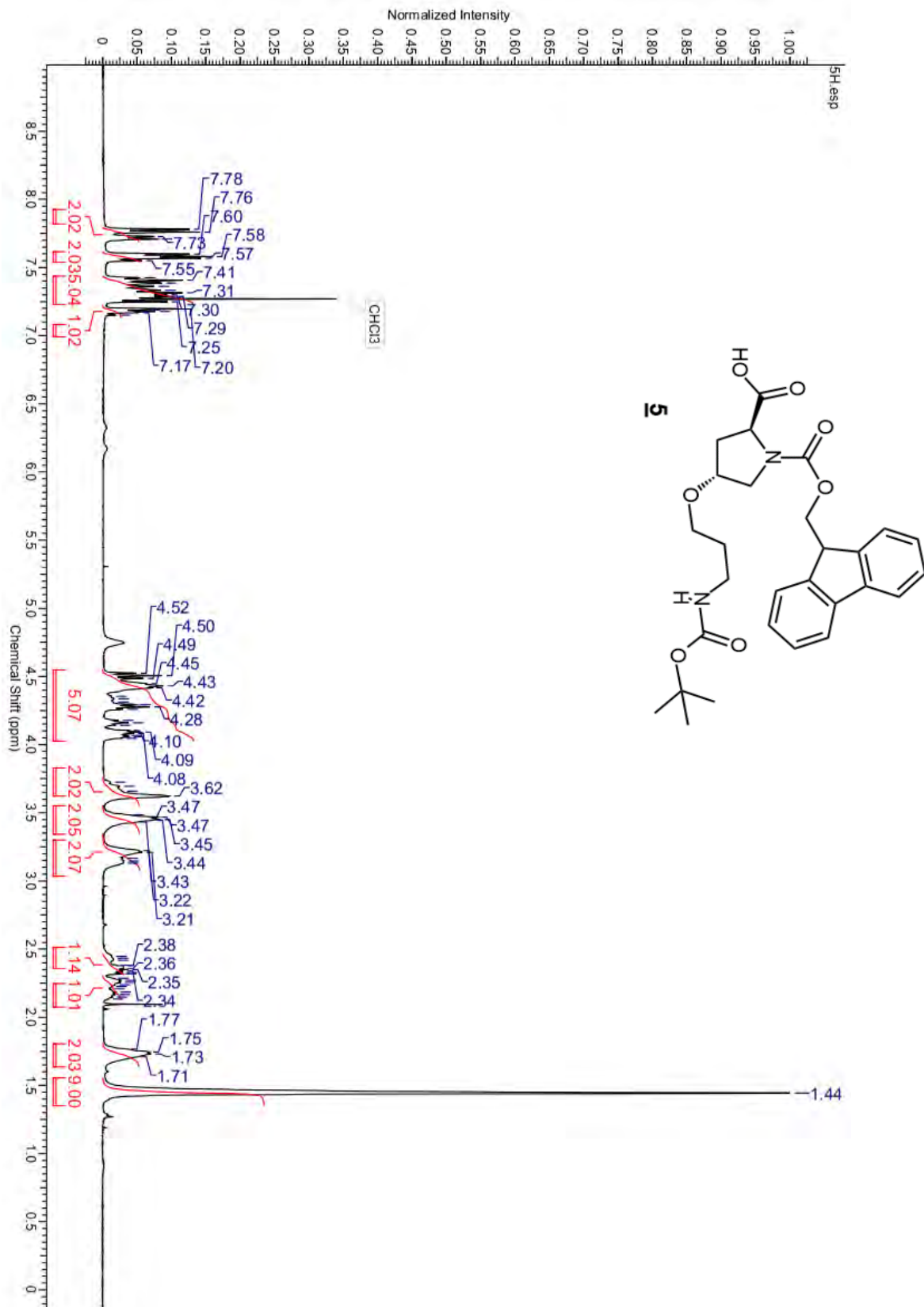
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **4**.



7.1.4. Intermediário **5**

Ácido (2S,4R)-1-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-4-(3-((tert-butoxicarbonil)amino)-propoxi)pirrolidina-2-carboxílico

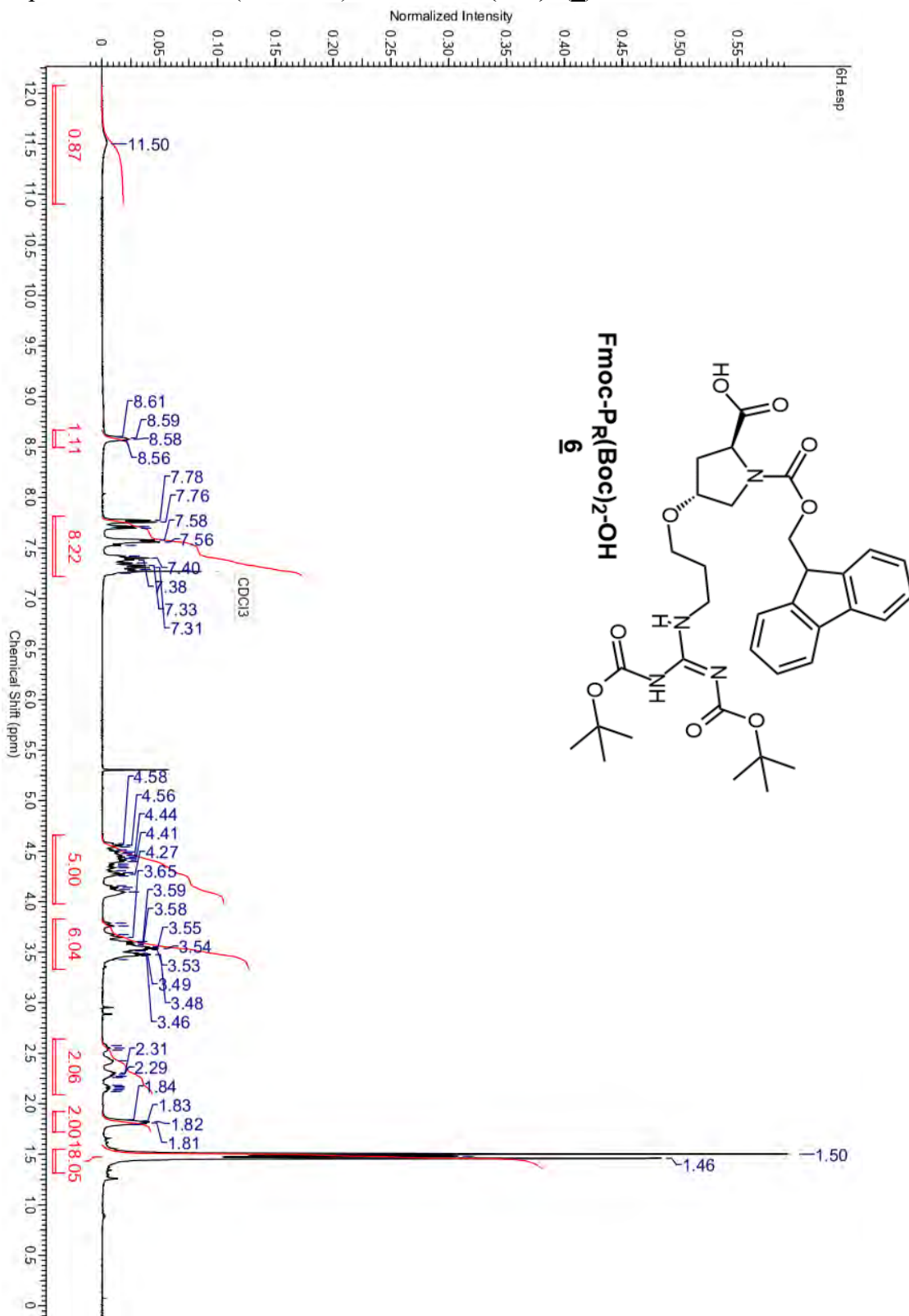
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de **5**.



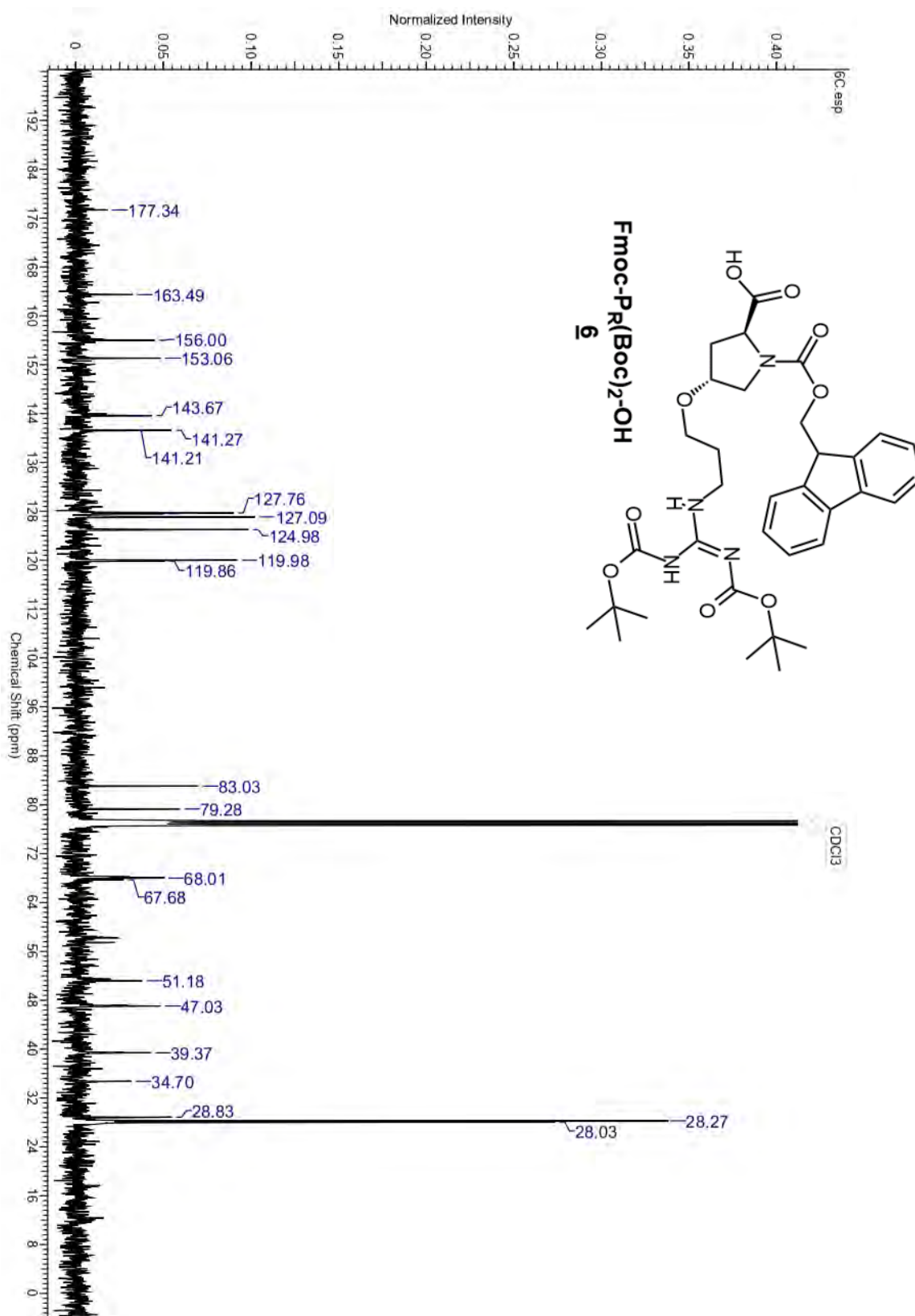
7.1.5. Fmoc-Pr(Boc)₂-OH (**6**)

Ácido (2S,4R)-1-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-4-(3-((Z)-2,3-bis(tert-butoxicarbonil)-guanidino)-propoxi)pirrolidina-2-carboxílico

Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de Fmoc-Pr(Boc)₂ (**6**).



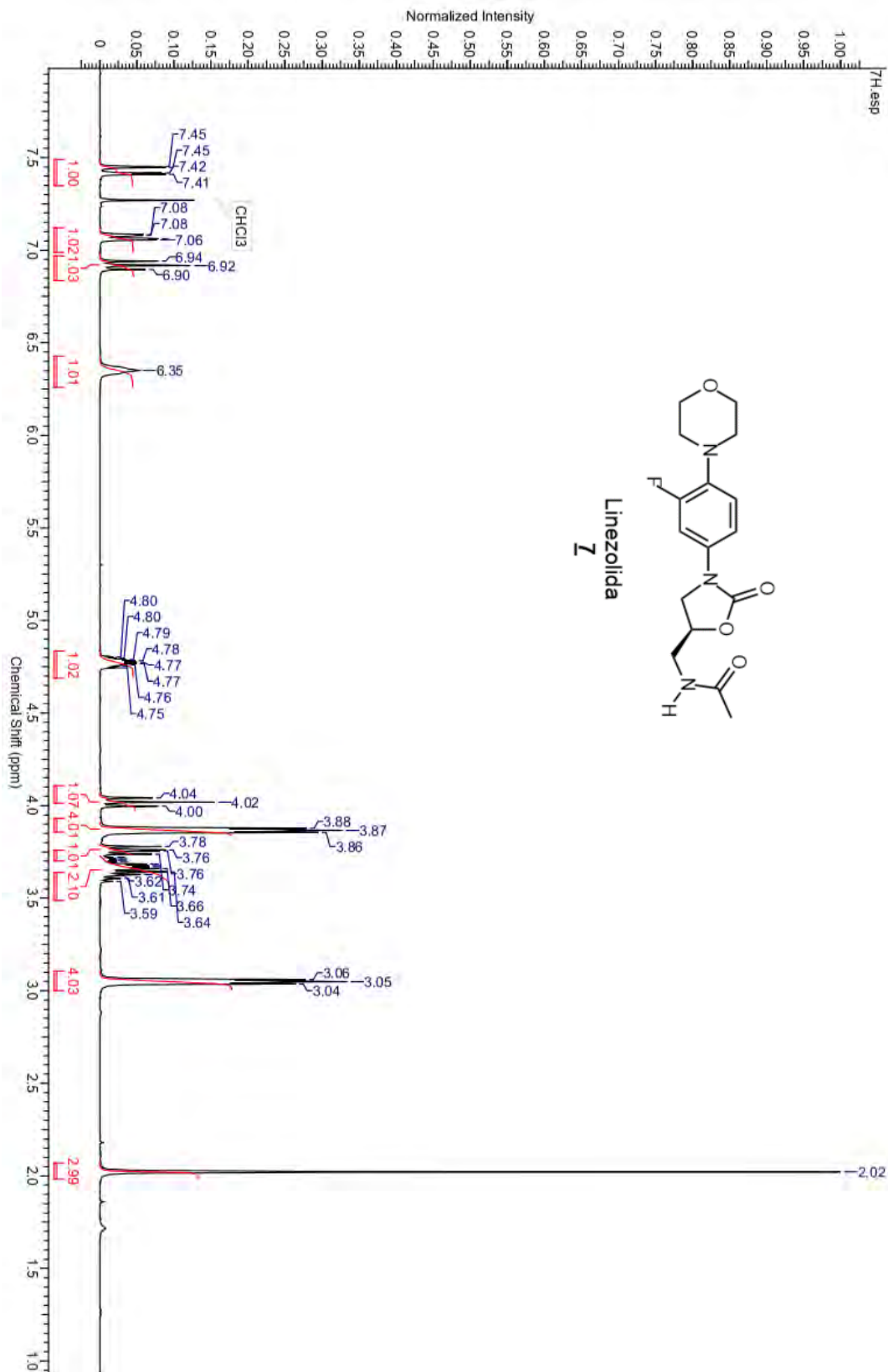
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de Fmoc-Pr(Boc) $_2$ (**6**).



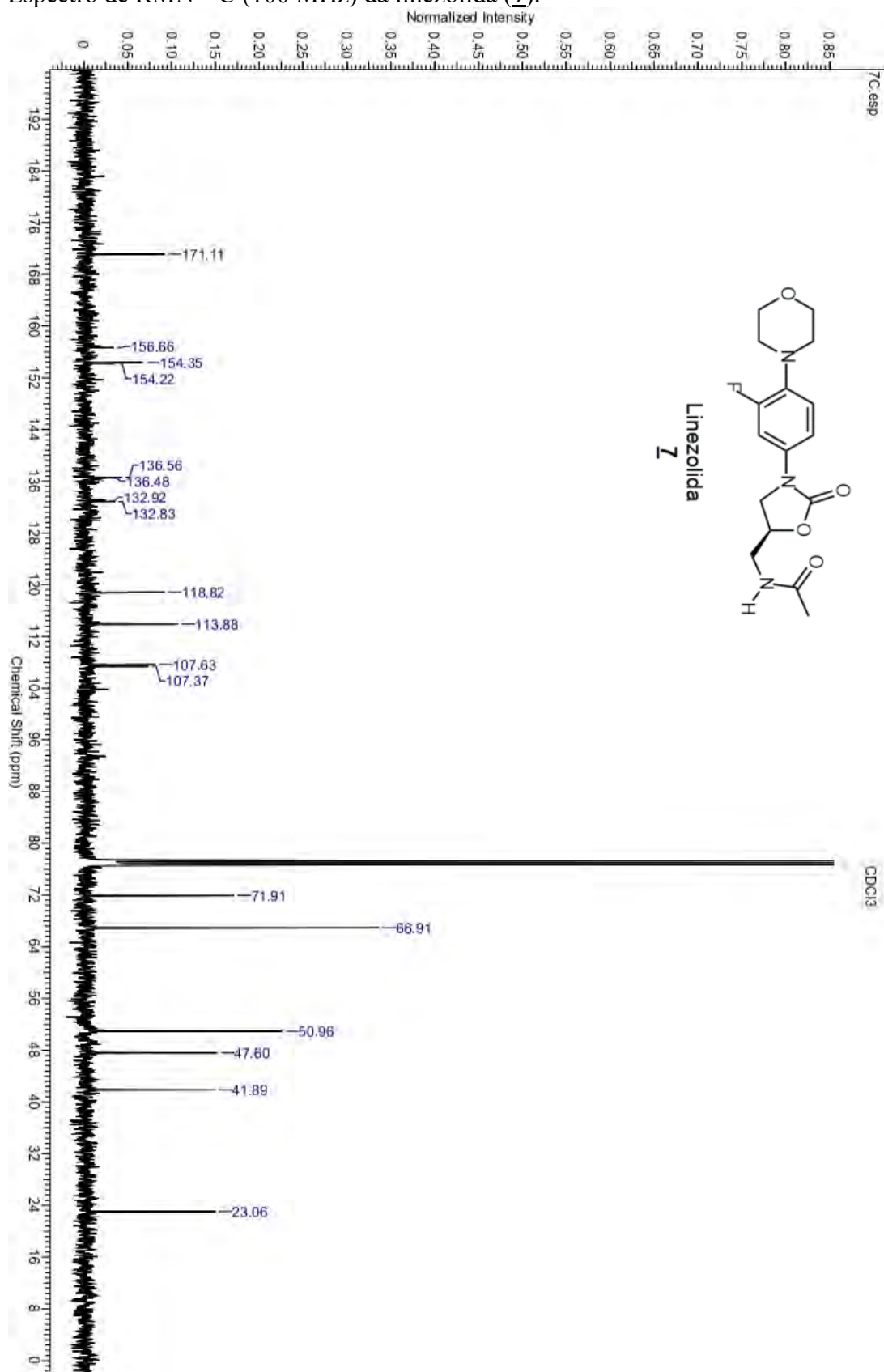
7.1.6. Linezolida (7)

(S)-N-((3-(3-fluoro-4-morfolinofenil)-2-oxooxazolidin-5-il)metil)acetamida

Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da linezolida (7).

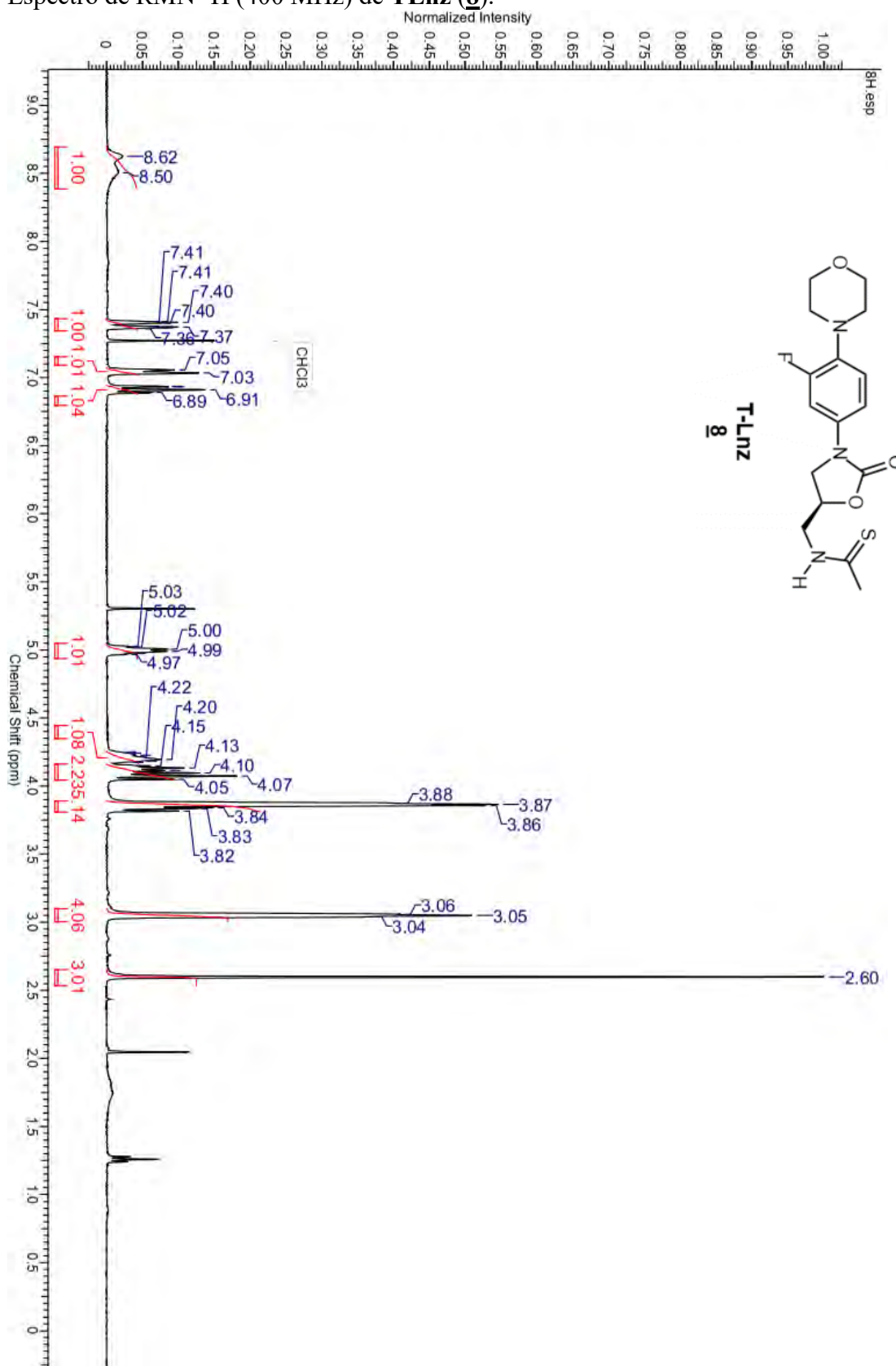


Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da linezolida (**7**).

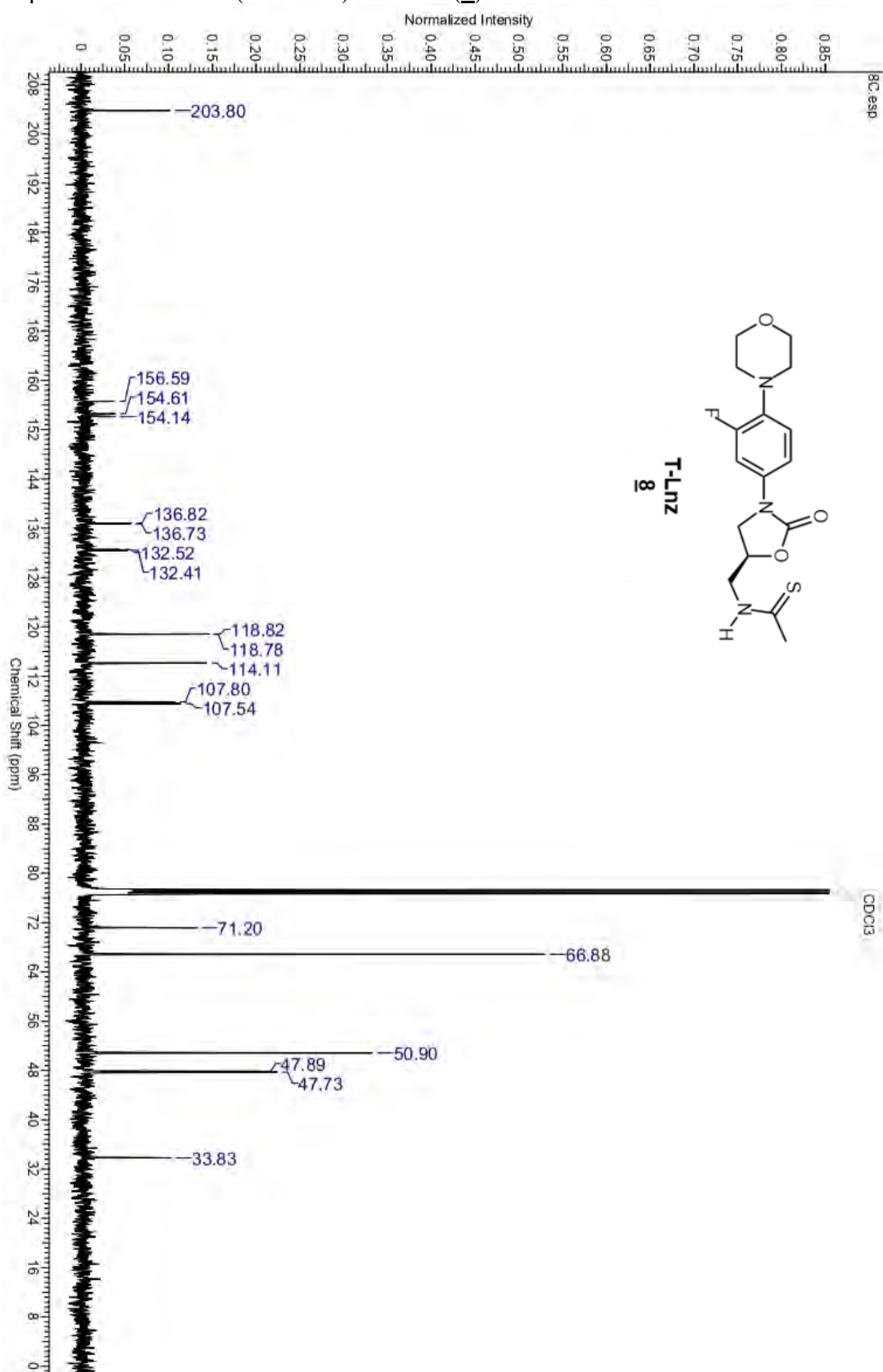


7.1.7. Intermediário TLnz (8)
(S)-N-((3-(3-fluoro-4-morfolinofenil)-2-oxooxazolidin-5-il)metil)etanotioamida

Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de **TLnz (8)**.



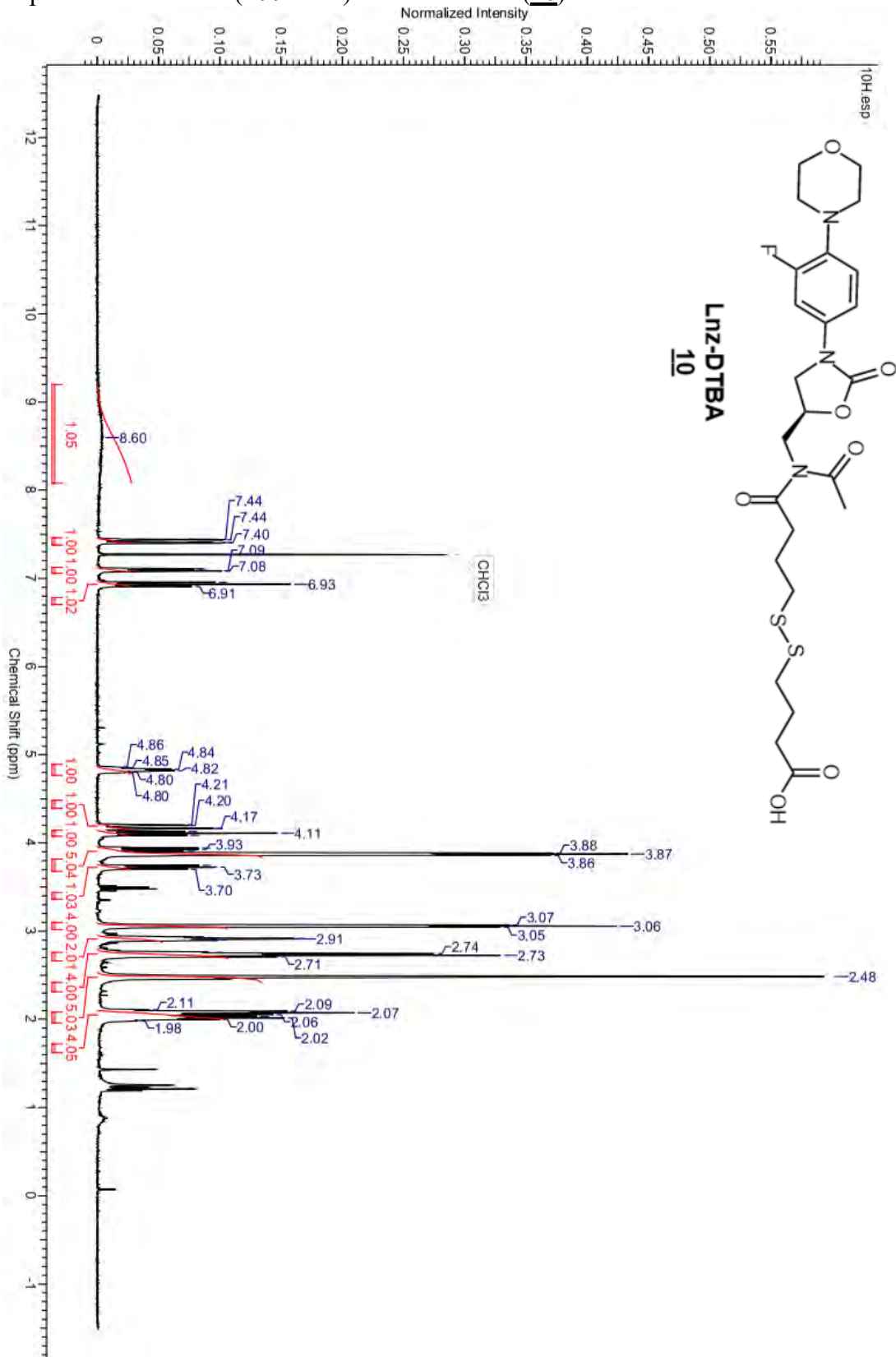
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **TLnz (8)**.



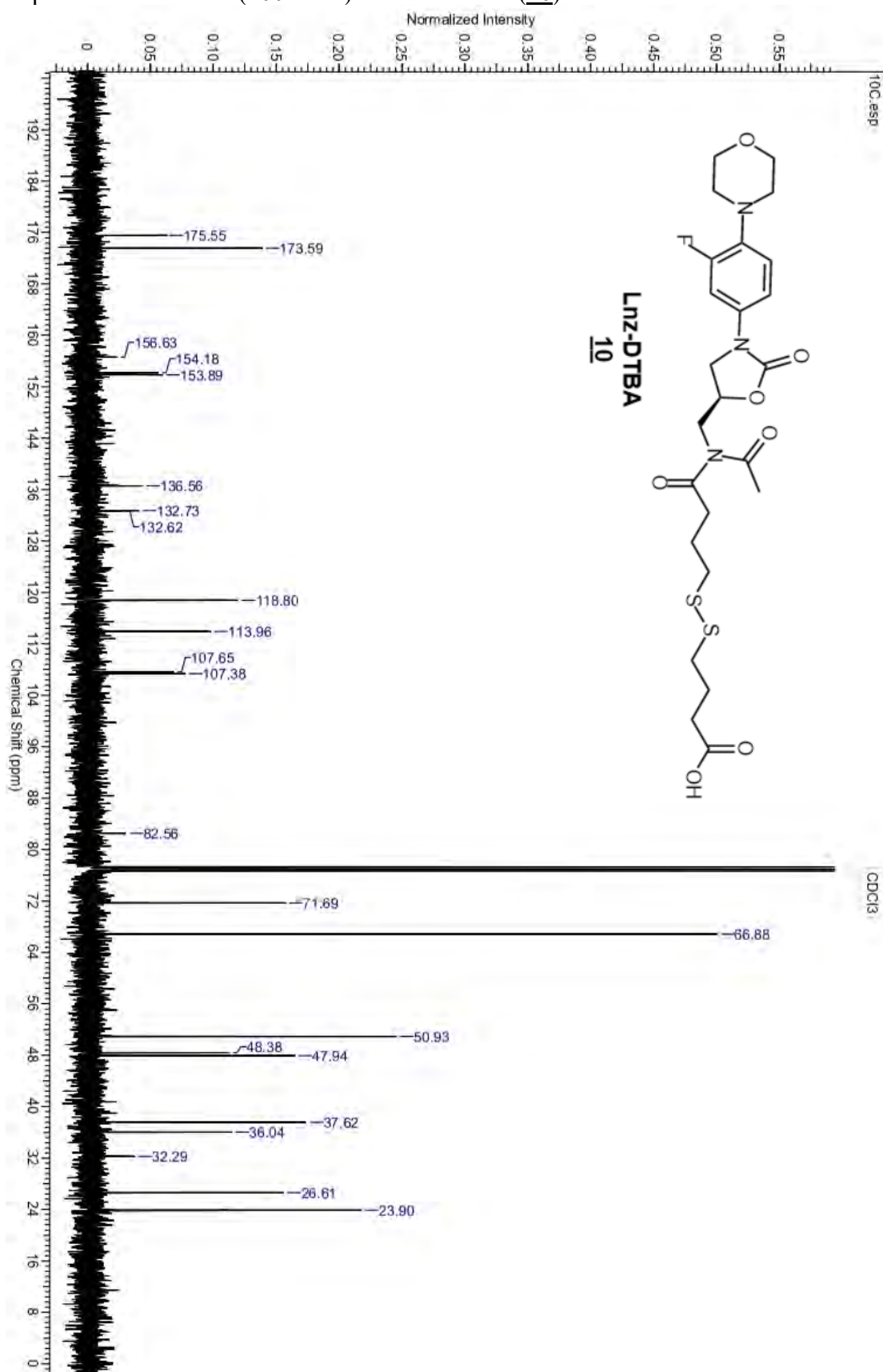
7.1.8. Lnz-DTBA (10)

Ácido (*S*)-*N*-((3-(3-fluoro-4-morfolinofenil)-2-oxooxazolidin-5-il)metil)acetamido)-4-oxobutil)disulfanil)butanóico

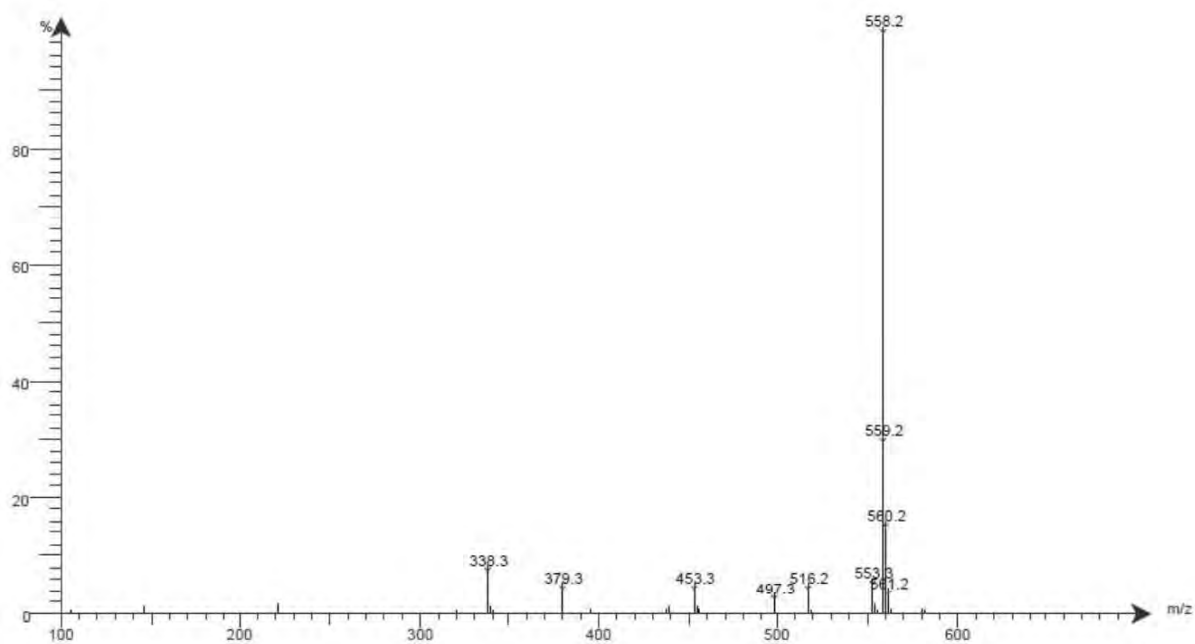
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de Lnz-DTBA (10).



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **Lnz-DTBA (10)**.

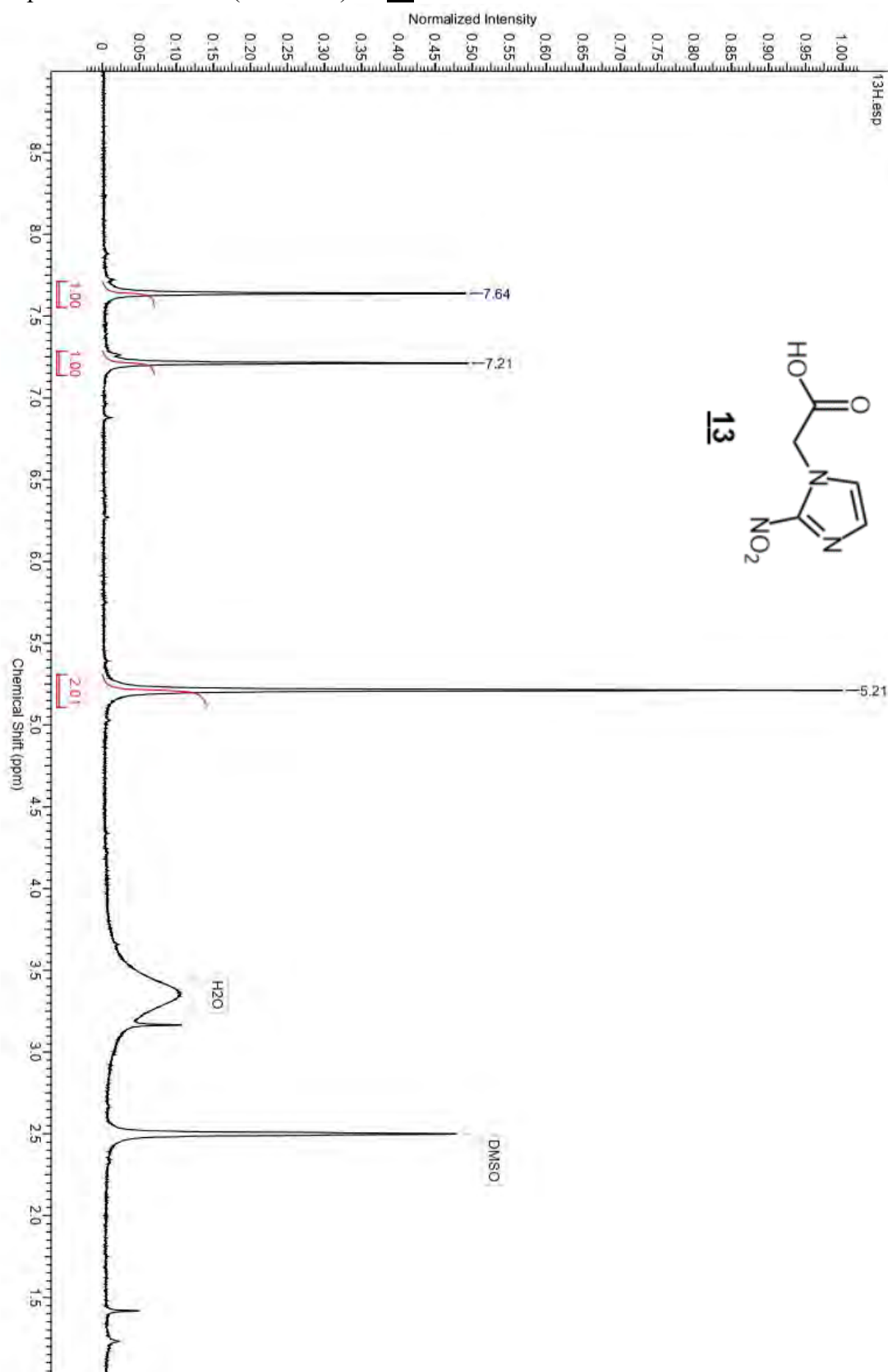


Espectro de massa (EM) (ESI+) de **Lnz-DTBA (10)**; m/z calculado para $C_{24}H_{33}FN_3O_7S_2^+$, 558,2 [M+1]

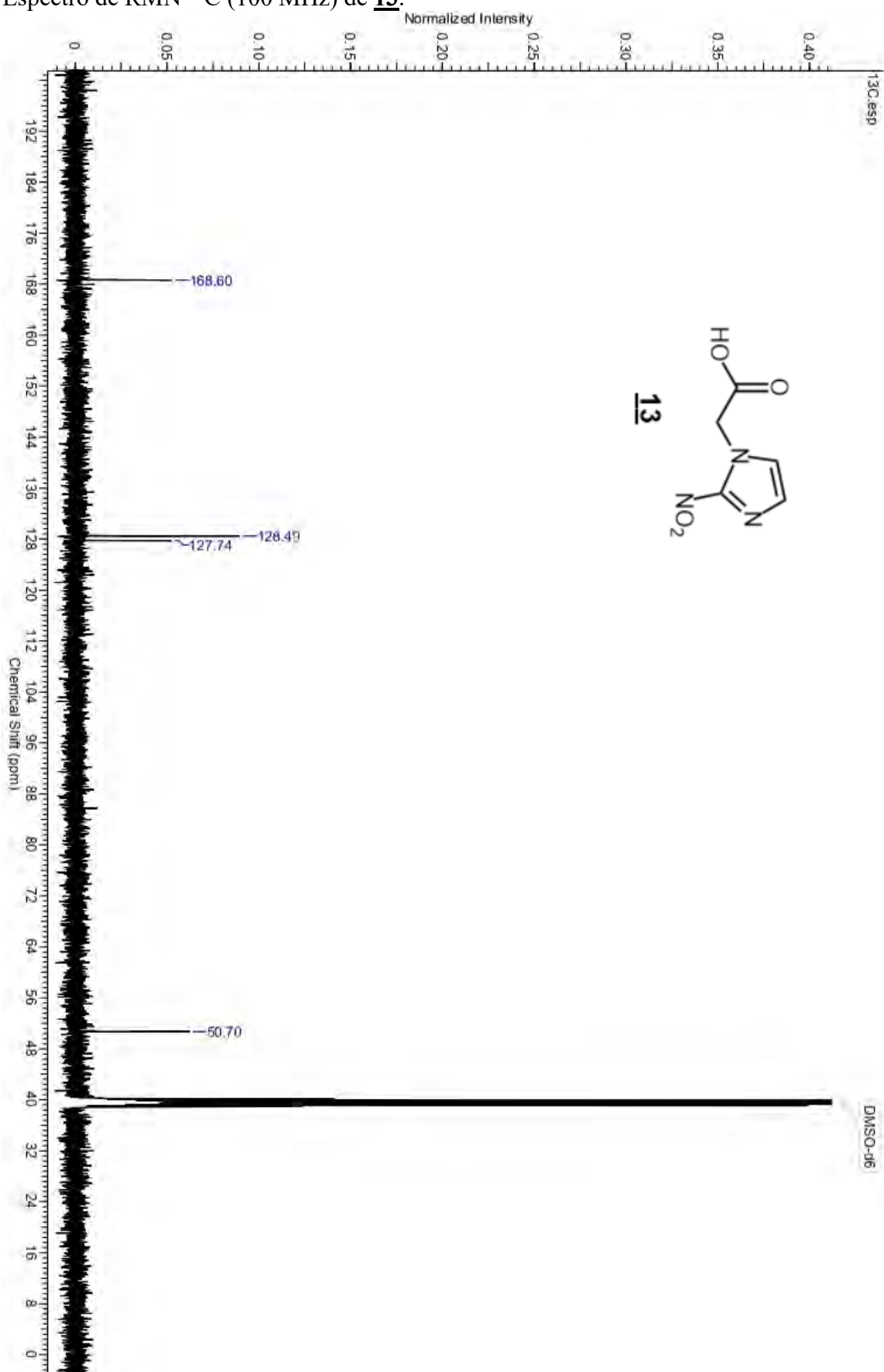


7.1.9. Ácido 2-nitroimidazolil-acético (**13**) Ácido 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acético

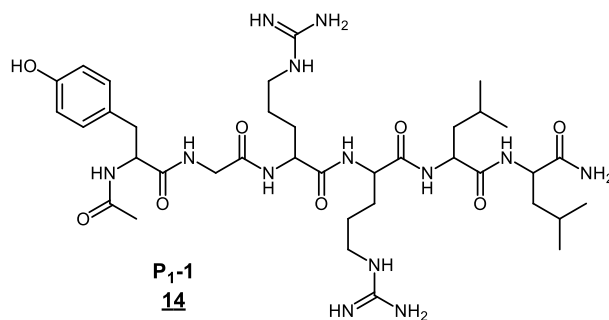
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de **13**.



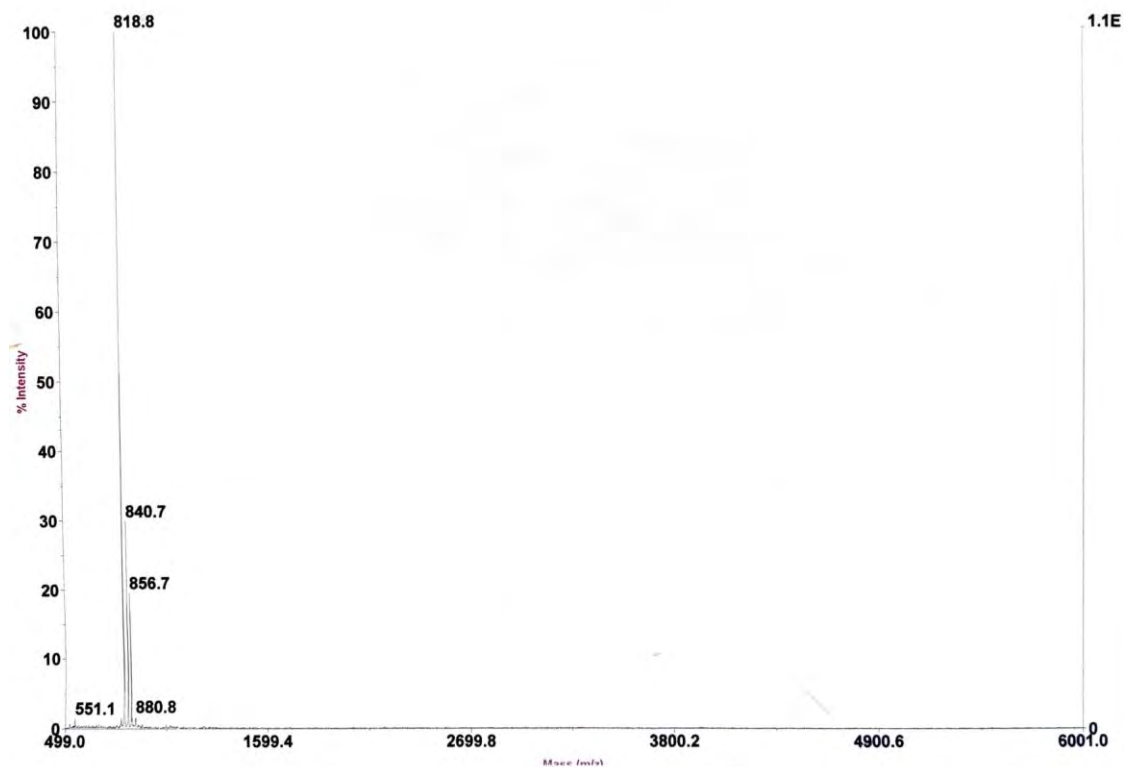
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **13**.



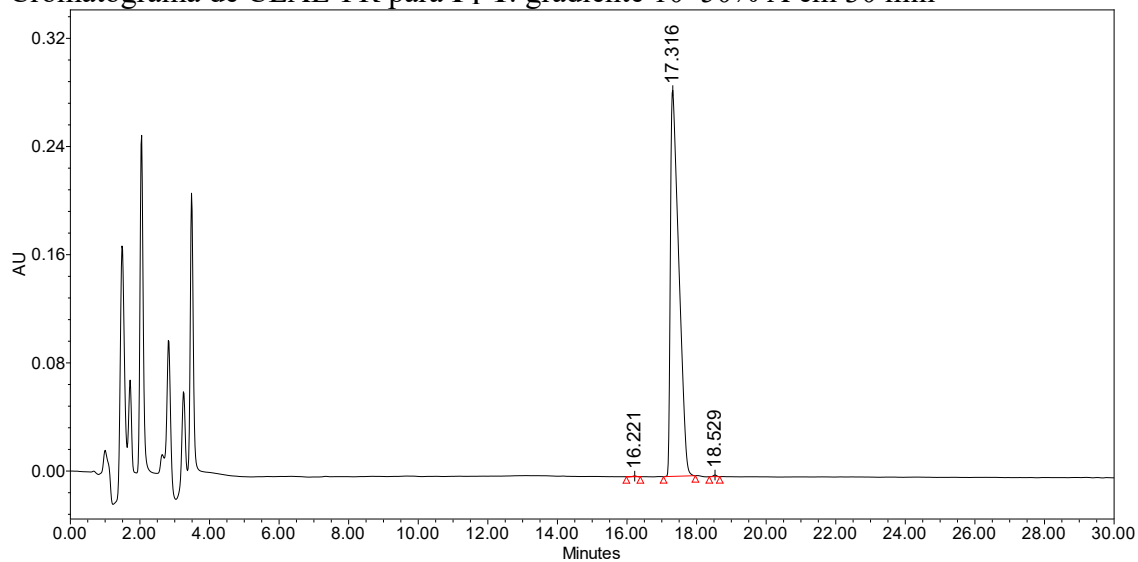
7.1.10. P₁-1 – AcYGR^RLL-NH₂ (**14**)



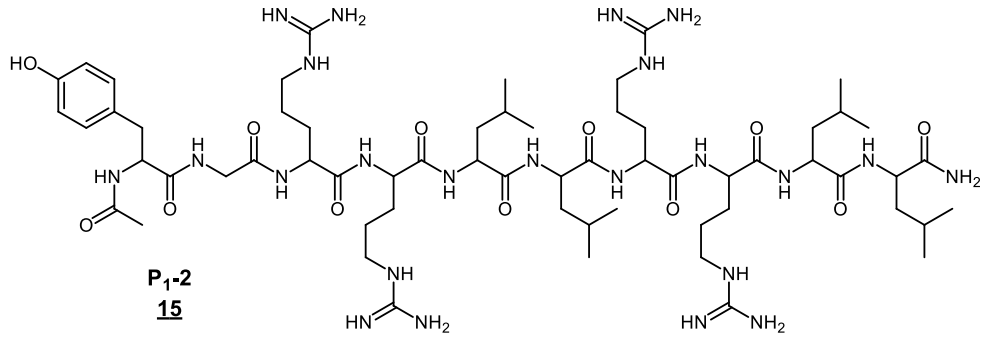
EM-MALDI-ToF de P₁-1 (AcYGR^RLL-NH₂) m/z calculado para C₃₇H₆₄N₁₃O₈⁺ 818,5 [M+H].



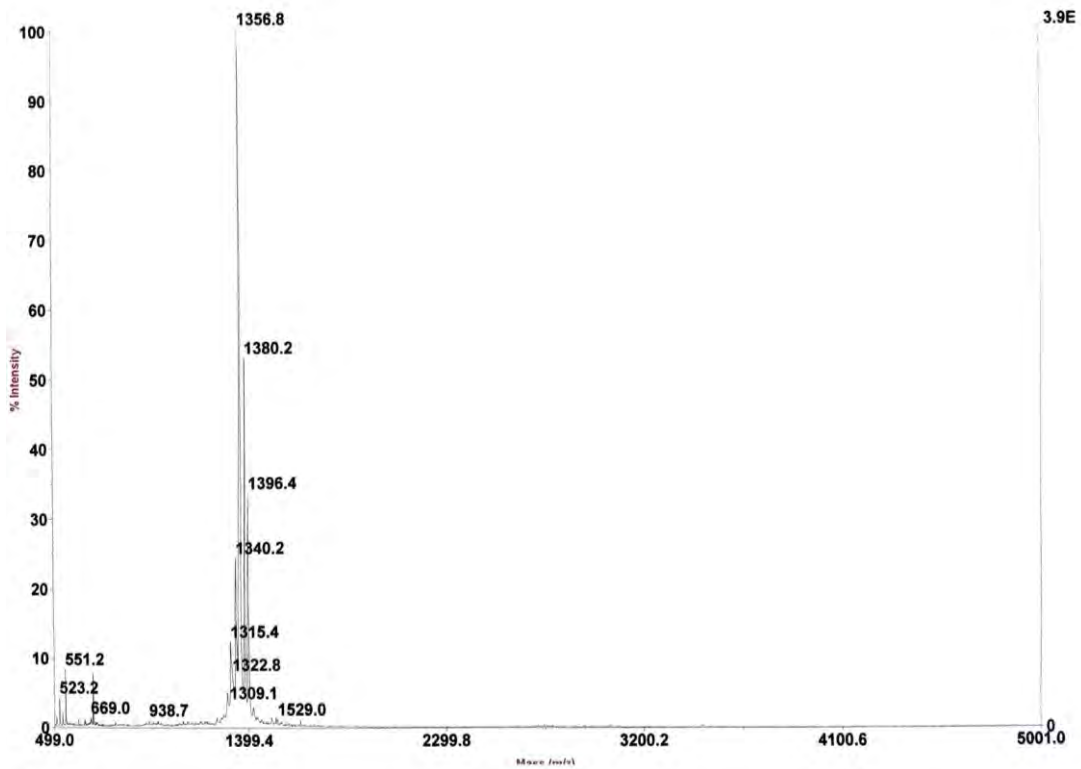
Cromatograma de CLAE-FR para P₁-1: gradiente 10–50% A em 30 min



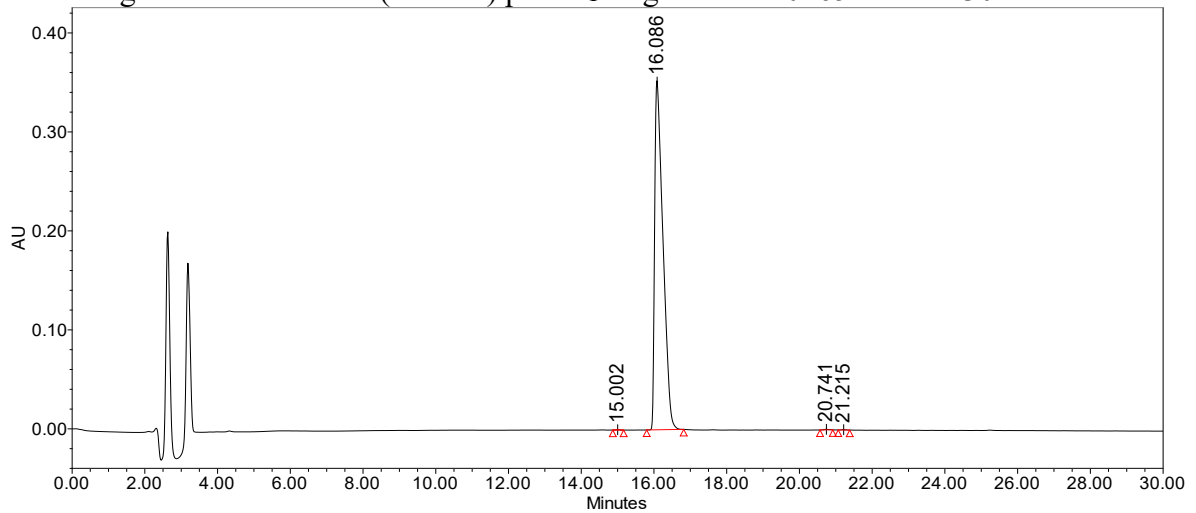
7.1.11. P₁-2 – AcYGRLLRLL-NH₂ (**15**)



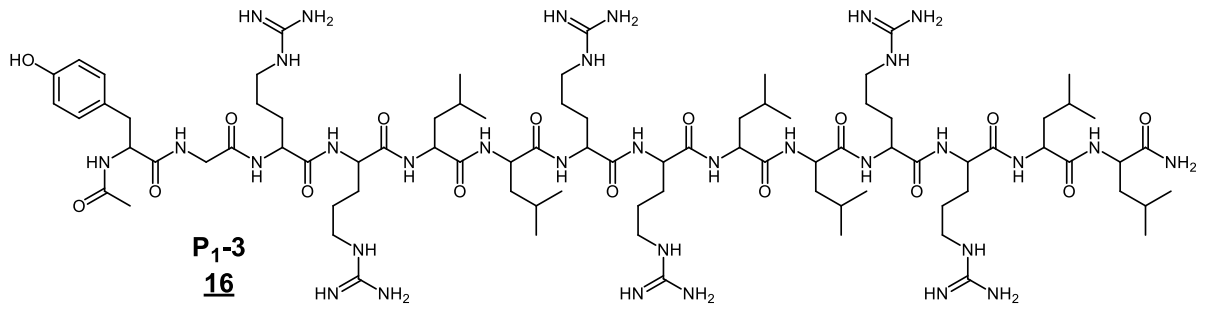
EM-MALDI-ToF de P₁-2 (AcYGRLLRLL-NH₂) m/z calculado para C₆₁H₁₁₀N₂₃O₁₂⁺ 1356,9 [M+H].



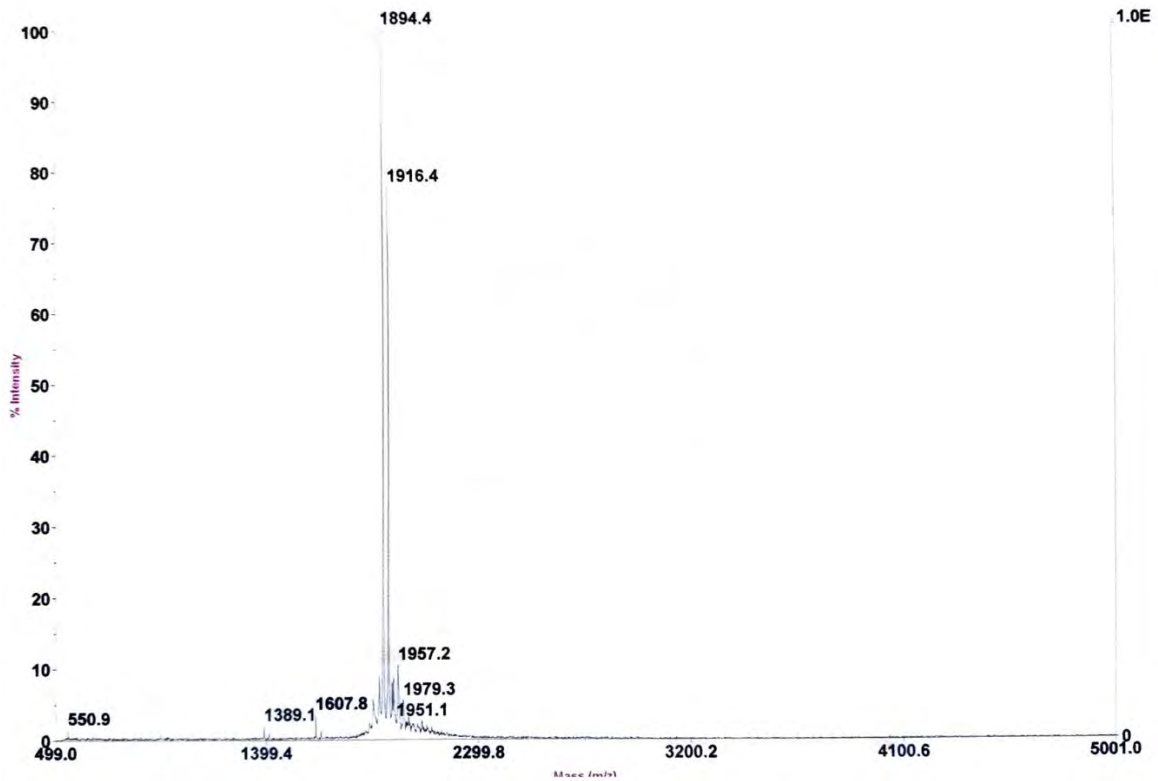
Cromatograma de CLAE-FR(214 nm) para P₁-2: gradiente 20–65% A em 30 min



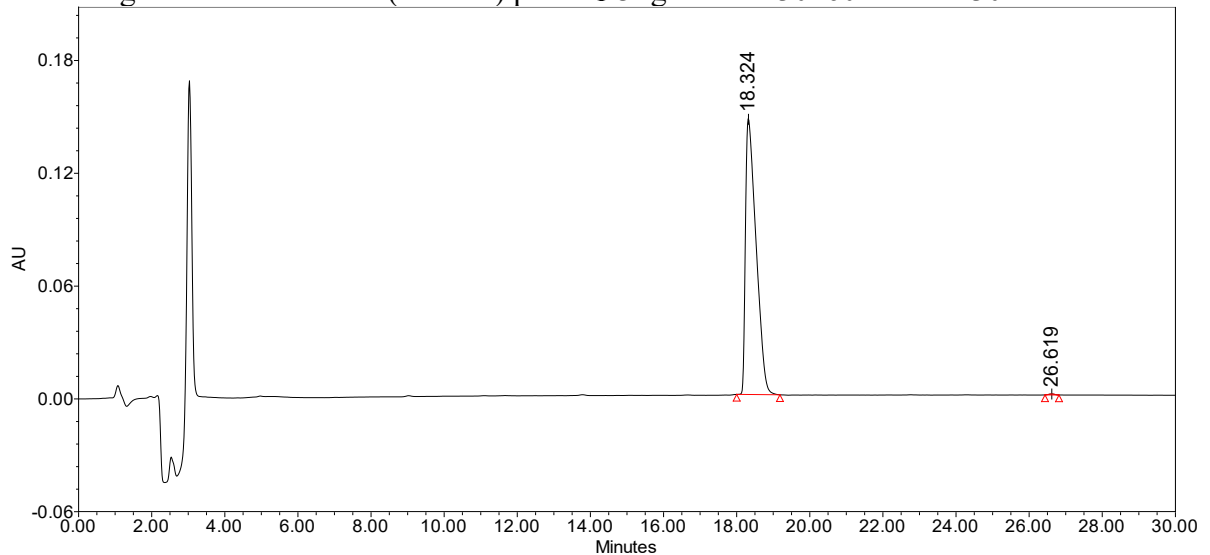
7.1.12. **P₁₋₃ – AcYGRLLRLLRLL-NH₂ (16)**



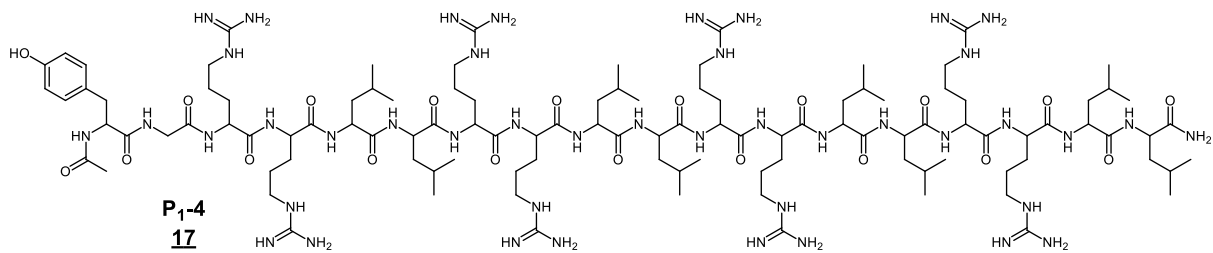
EM (MALDI-ToF) de **P₁₋₃** (AcYGRLLRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₈₅H₁₅₆N₃₃O₁₆ 1895,2 [M+H].



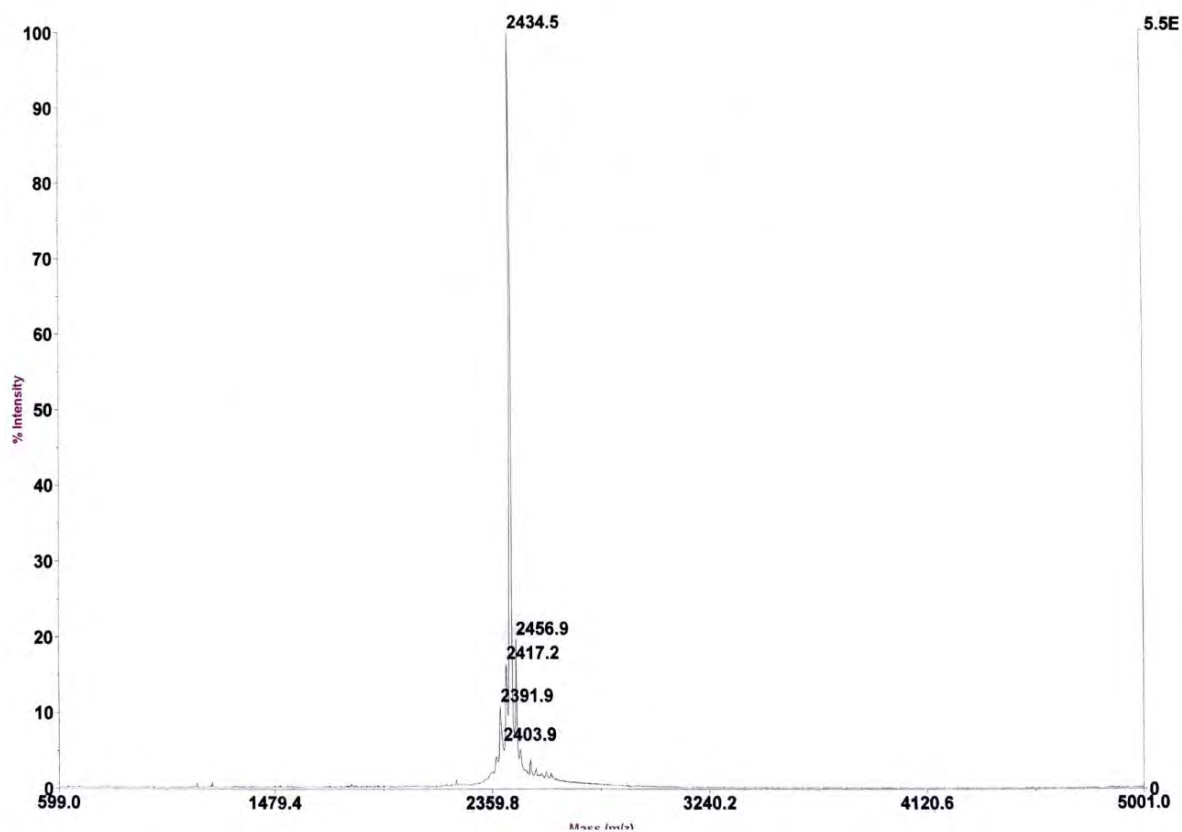
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **P₁₋₃**: gradiente 30–60% A em 30 min



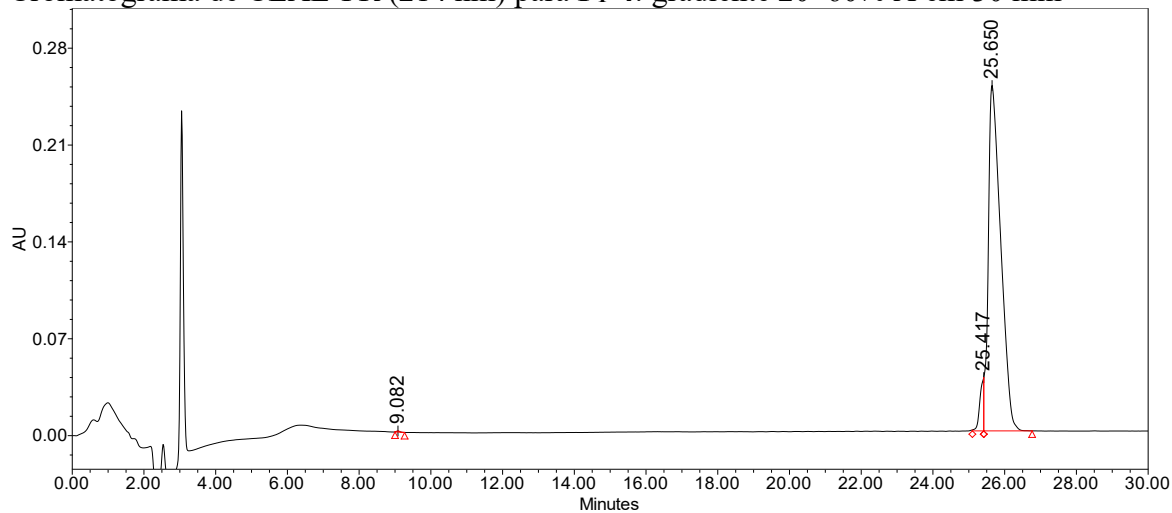
7.1.13. P₁-4 – AcYGRLLRLLRLLRLLRLL-NH₂ (**17**)



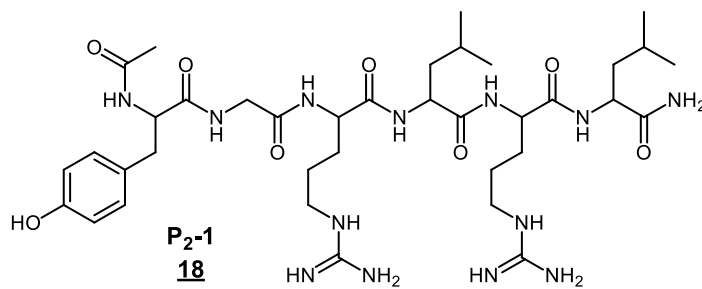
EM-MALDI-ToF de **P₁-4** (**17**) (AcYGRLLRLLRLLRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₁₀₉H₂₀₂N₄₃O₂₀⁺ 2433,6 [M+H].



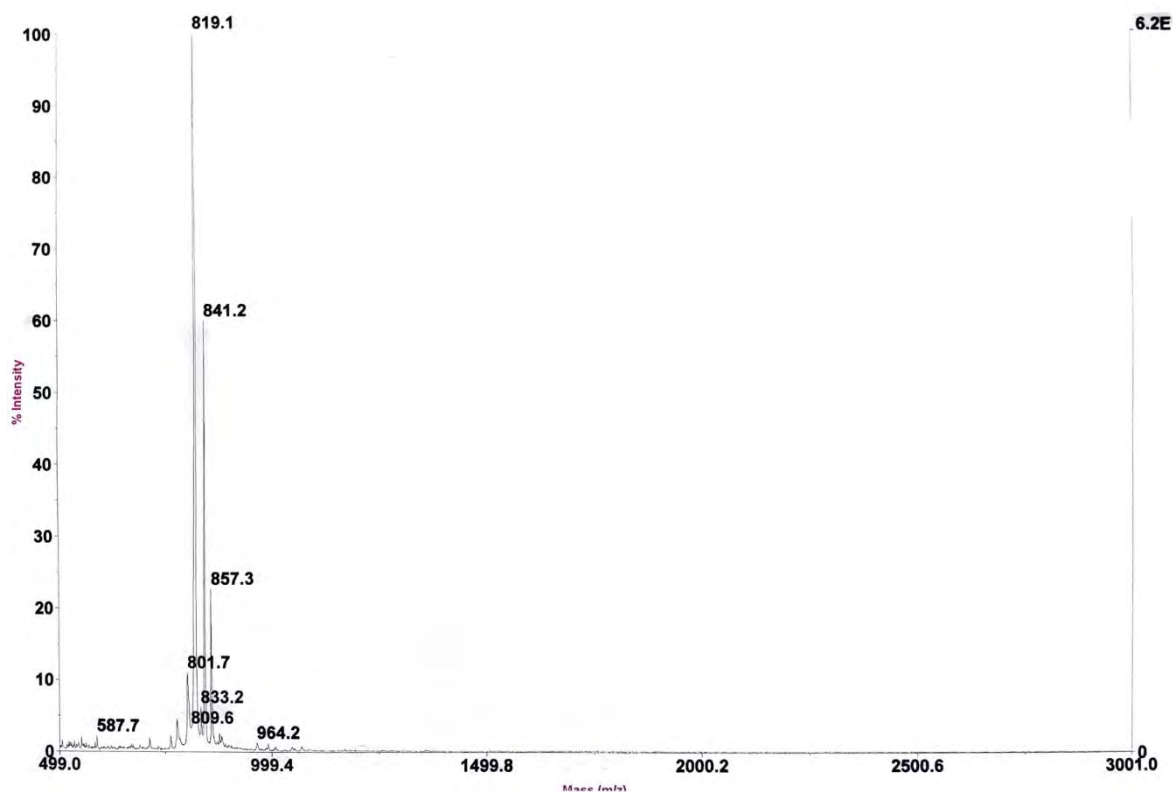
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **P₁-4**: gradiente 20–60% A em 30 min



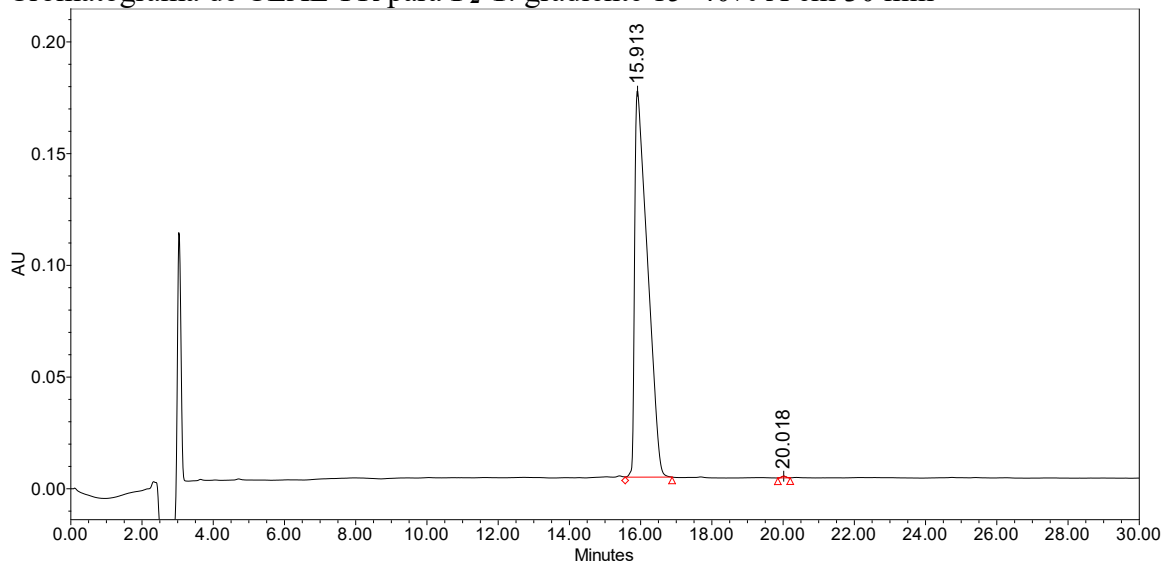
7.1.14. P₂-1 – AcYGRLRL-NH₂ (**18**)



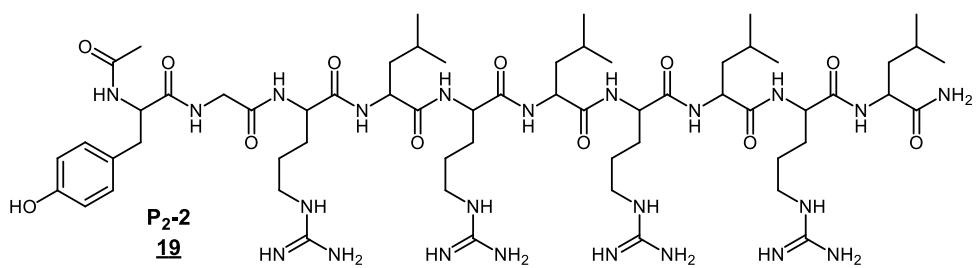
EM-MALDI-ToF de **P₂-1** (AcYGRLRL-NH₂) m/z calculado para C₃₇H₆₄N₁₃O₈⁺ 818,5 [M+H].



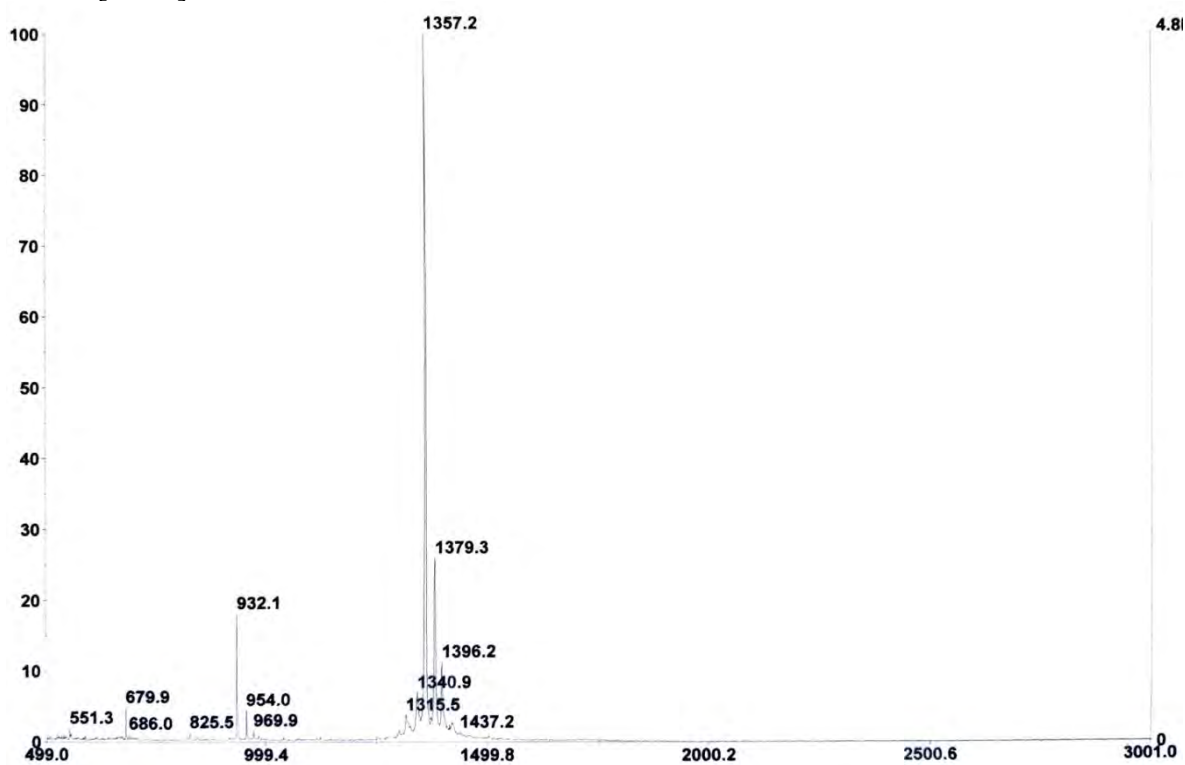
Cromatograma de CLAE-FR para **P₂-1**: gradiente 15–40% A em 30 min



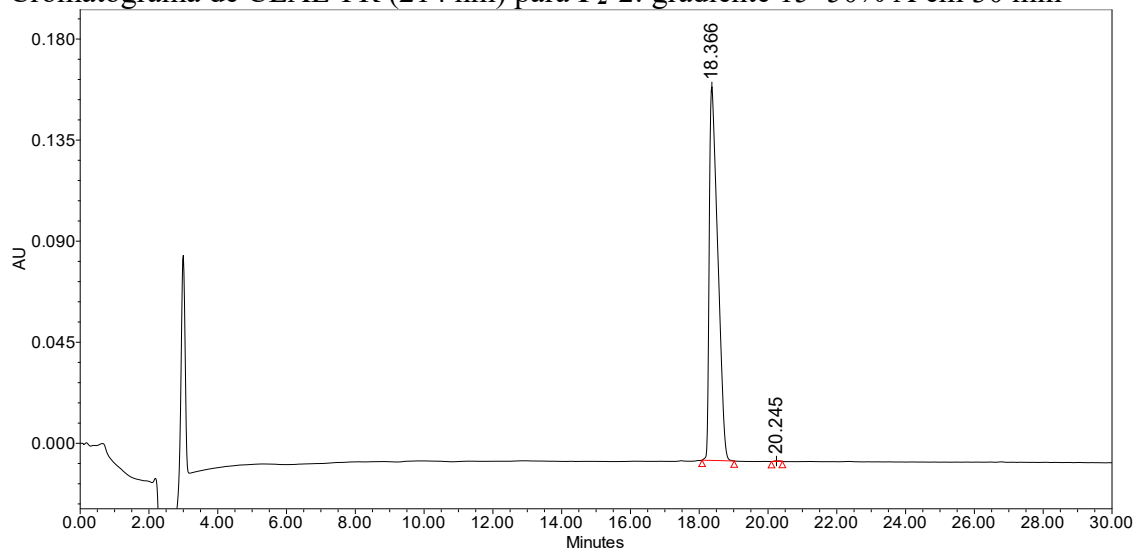
7.1.15. P₂-2 – AcYGRLRLRLRL-NH₂ (**19**)



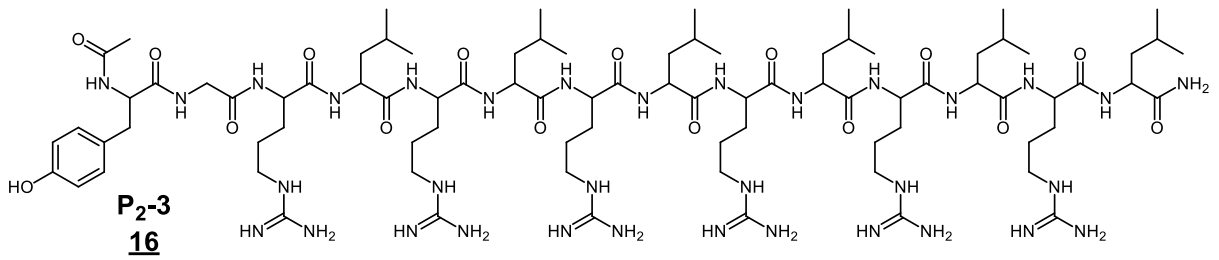
EM-MALDI-ToF de P₂-2 (AcYGRLRLRLRL-NH₂) m/z calculado para C₆₁H₁₁₀N₂₃O₁₂⁺ 1356,9 [M+H]



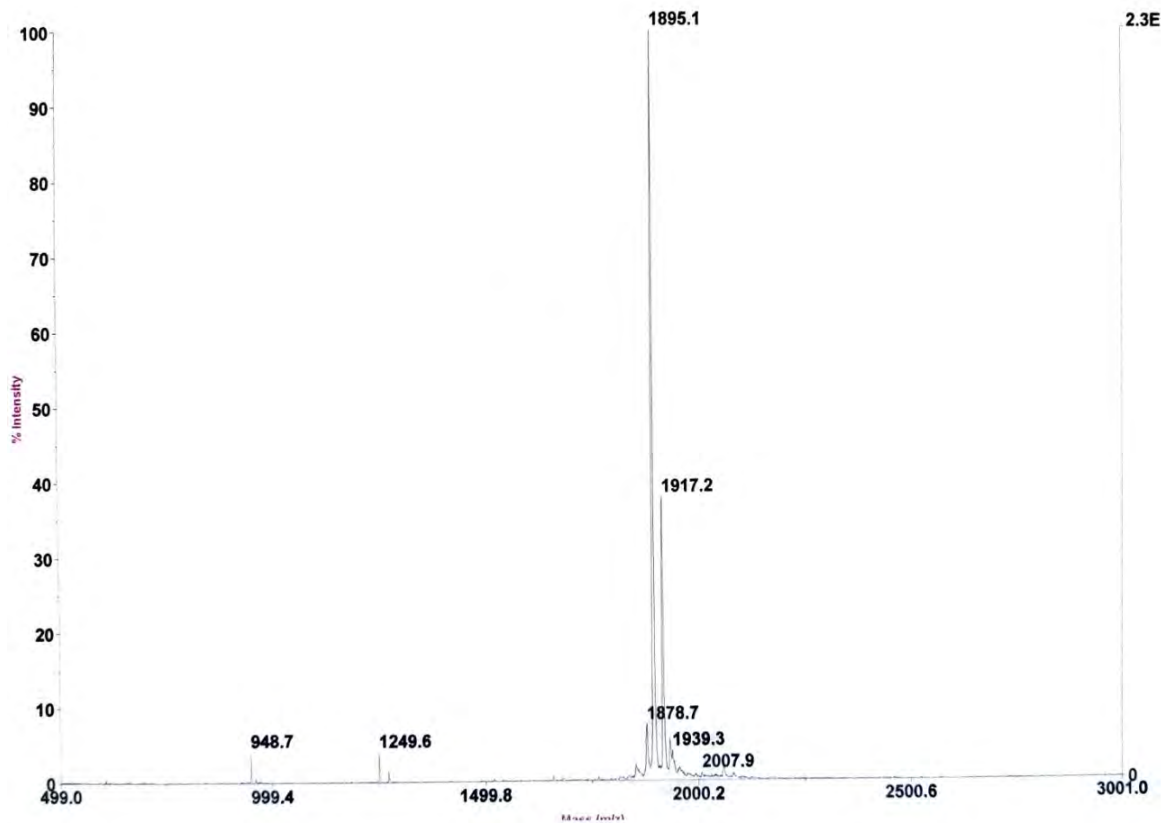
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para P₂-2: gradiente 15–50% A em 30 min



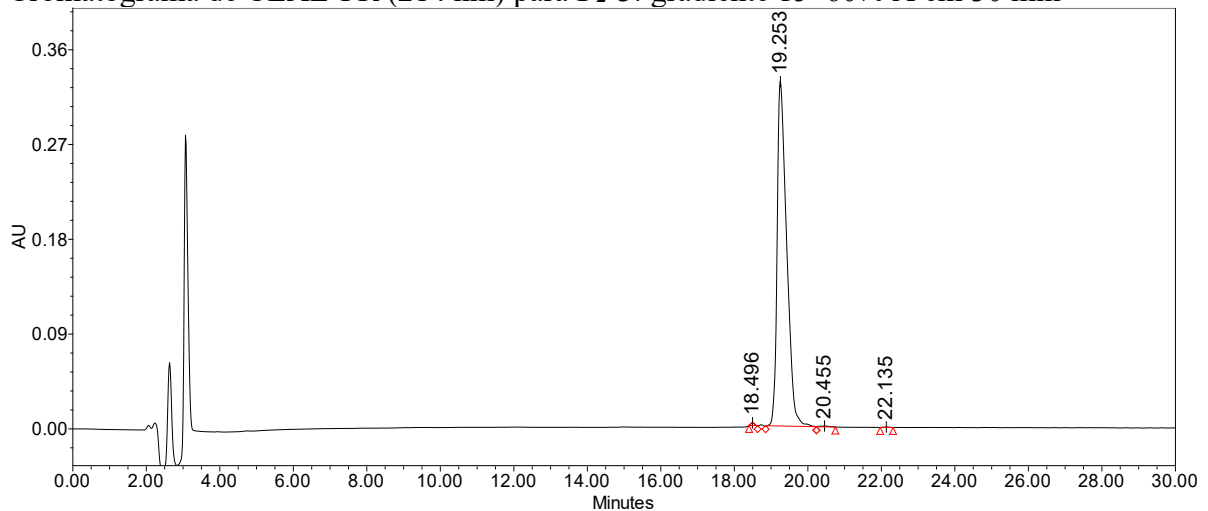
7.1.16. **P₂-3 – AcYGRLRLRLRLRL-NH₂ (20)**



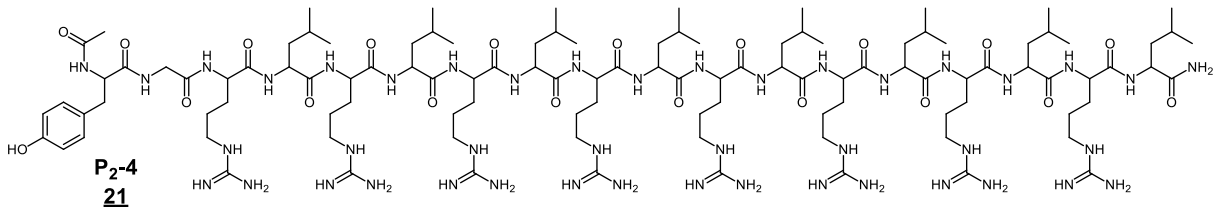
EM-MALDI-ToF de **P₂-3** (AcYGRLRLRLRLRL-NH₂) m/z calculado para C₈₅H₁₅₆N₃₃O₁₆ 1895,2 [M+H].



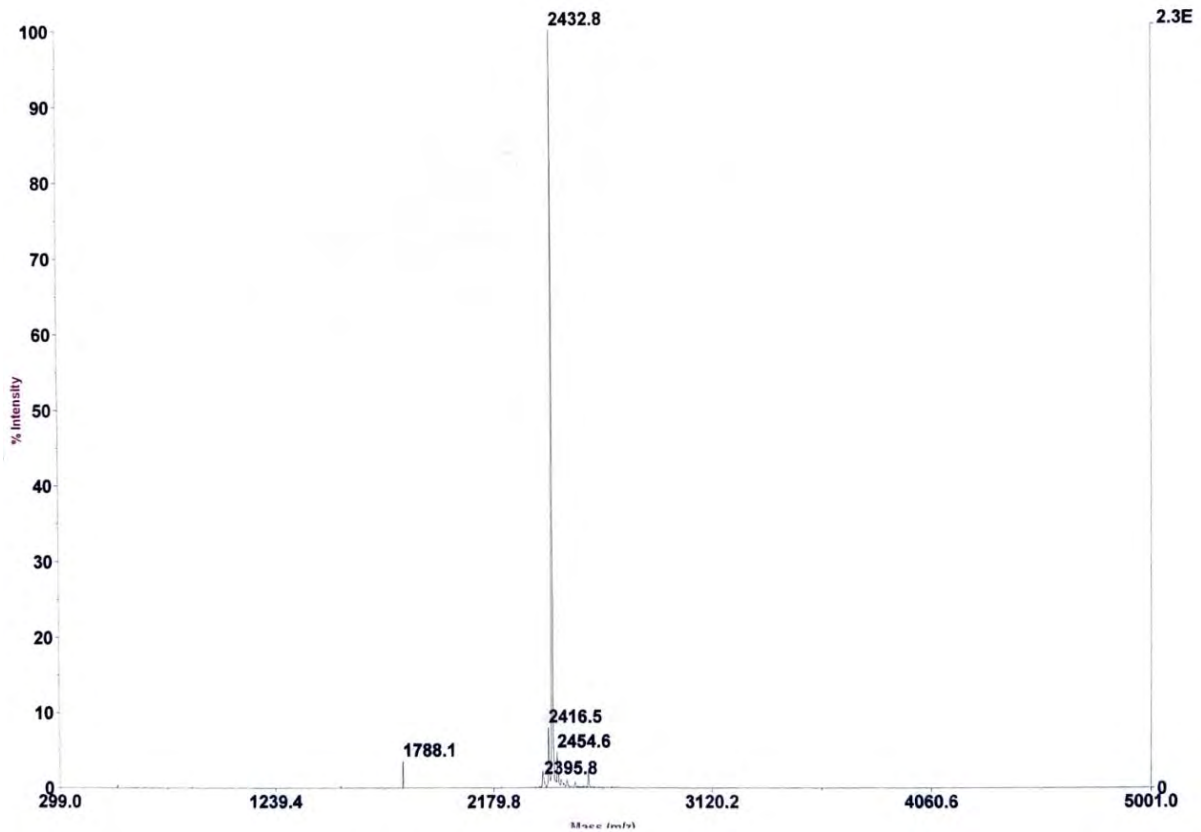
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **P₂-3**: gradiente 15–60% A em 30 min



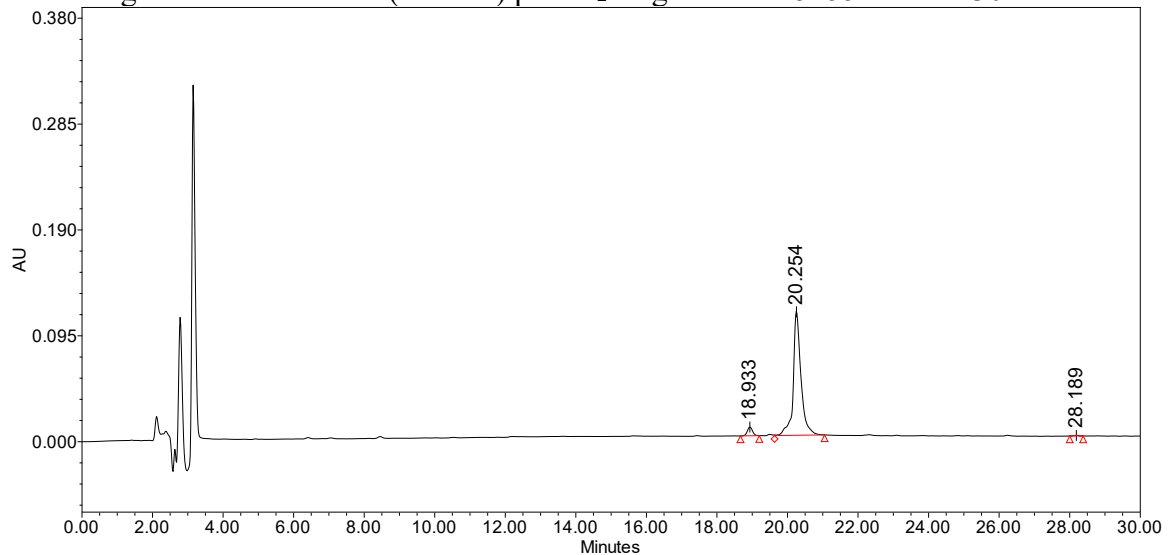
7.1.17. P₂-4 – AcYGRLRLRLRLRLRLRL-NH₂ (**21**)



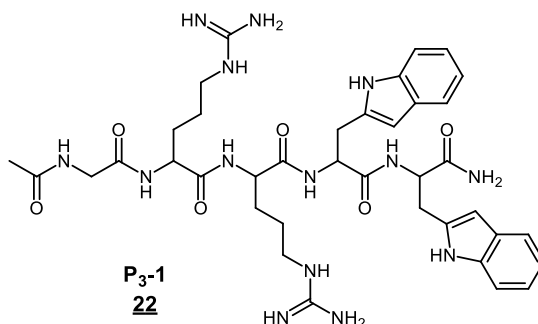
EM- MALDI-ToF de **P₂-4** (**21**) (AcYGRLRLRLRLRLRLRL-NH₂), m/z calculado para C₁₀₉H₂₀₂N₄₃O₂₀⁺ 2433,6 [M+H].



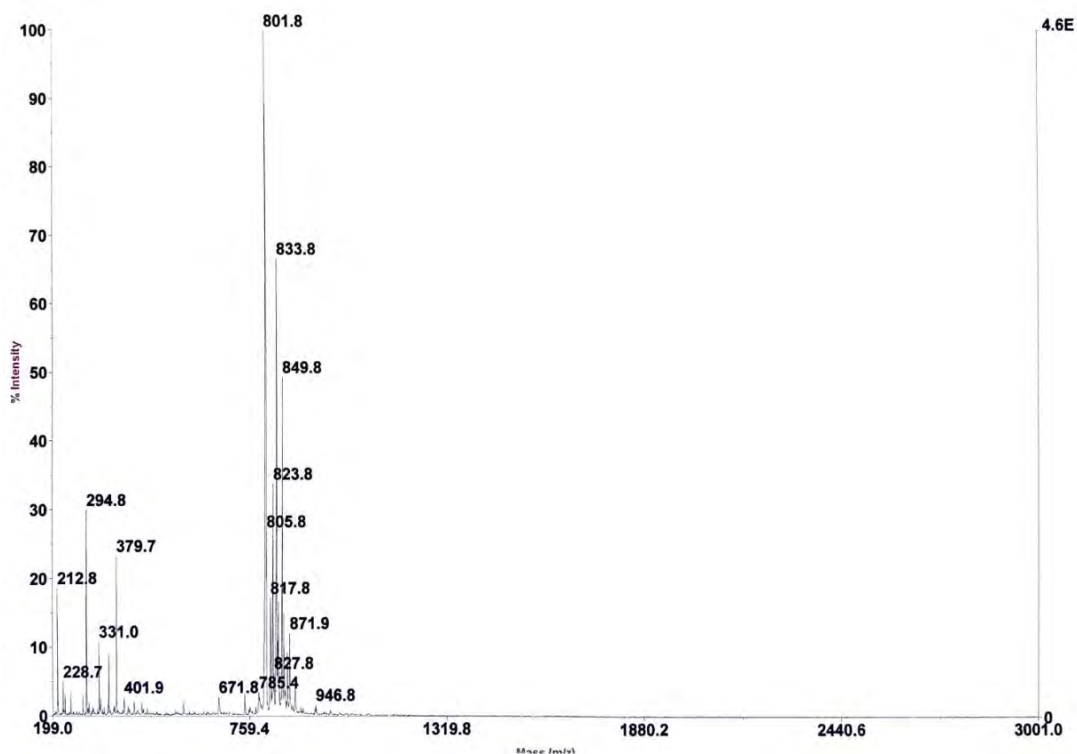
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **P₂-4**: gradiente 15–55% A em 30 min



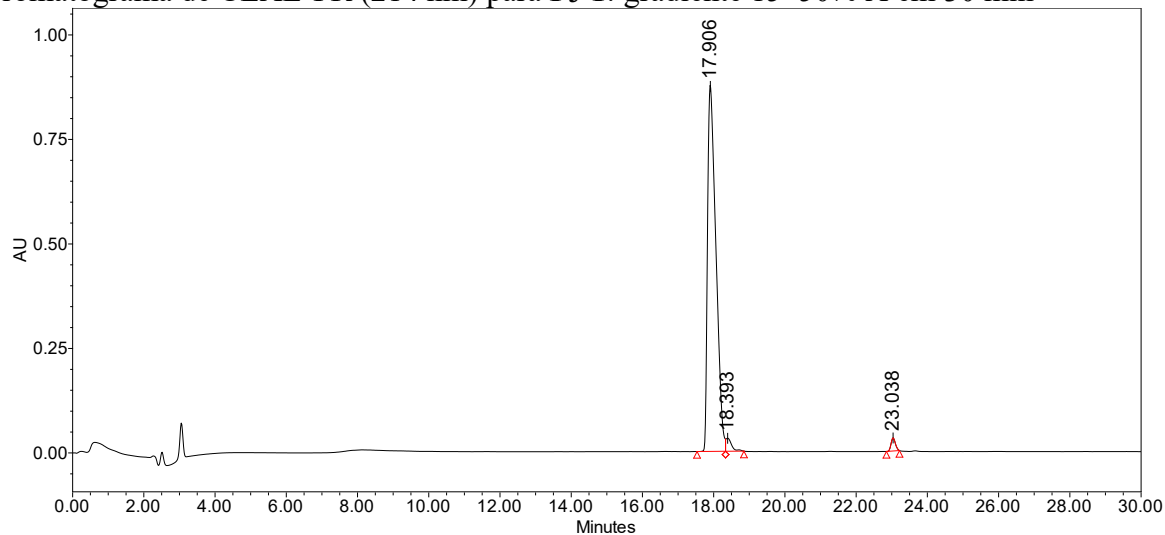
7.1.18. P₃-1 – AcYGRRWW-NH₂ (**22**)



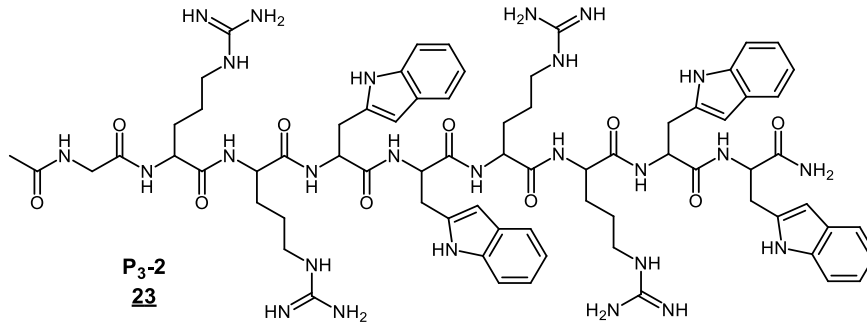
EM-MALDI-ToF de P₃-1 (**22**) (AcYGRRWW-NH₂), m/z calculado para C₃₈H₅₃N₁₄O₆⁺ 801,4 [M+H].



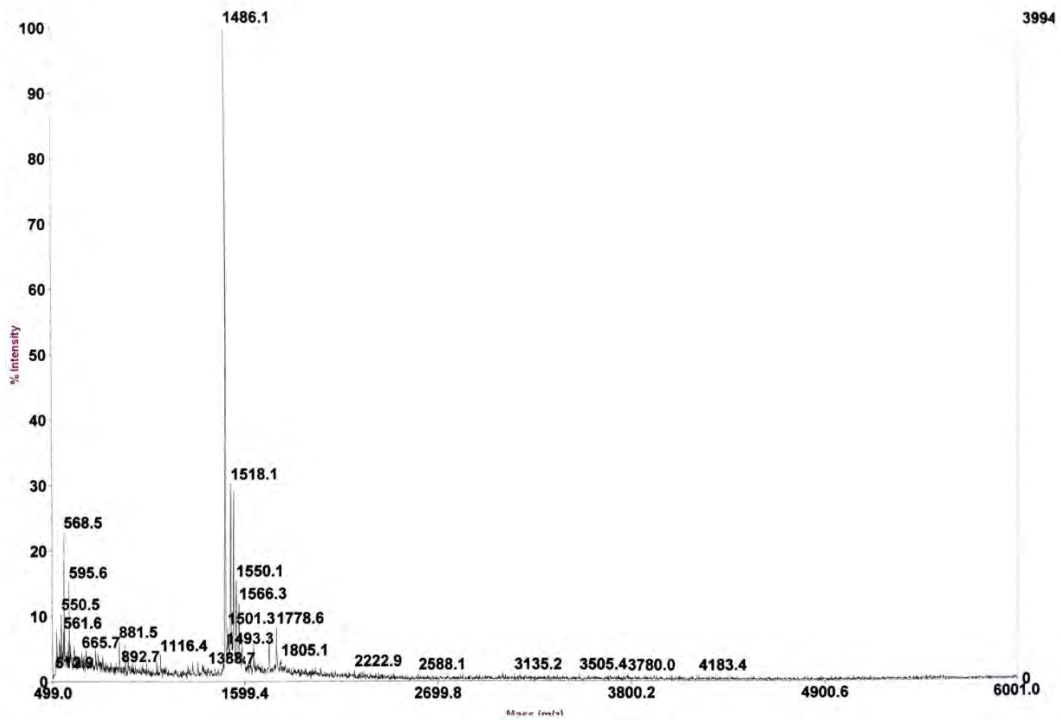
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para P₃-1: gradiente 15–50% A em 30 min



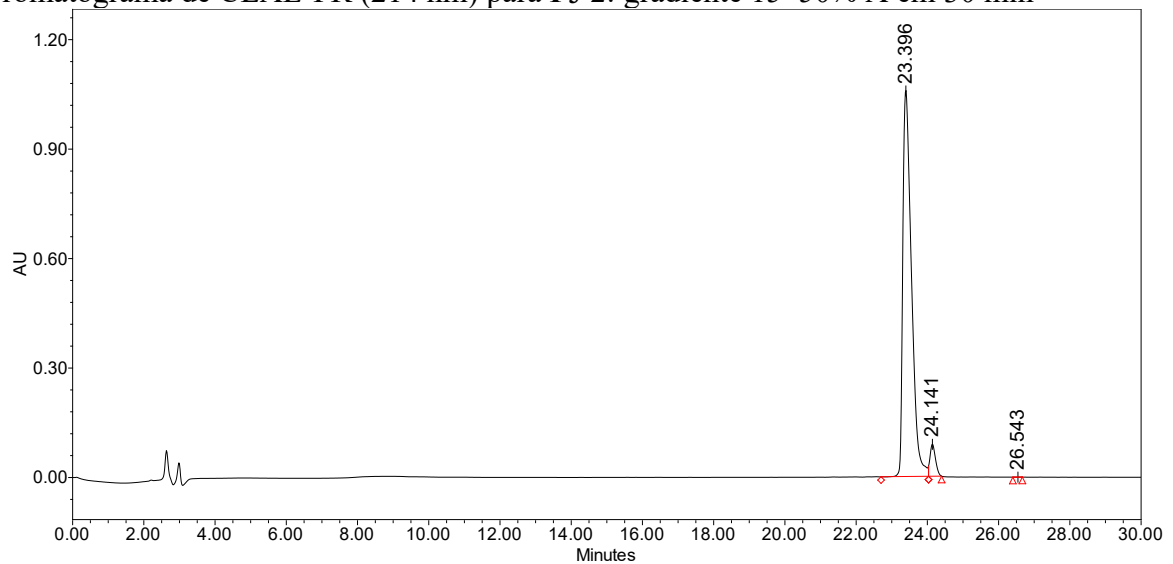
7.1.19. P₃-2 – AcYGRRWRRWW-NH₂ (**23**)



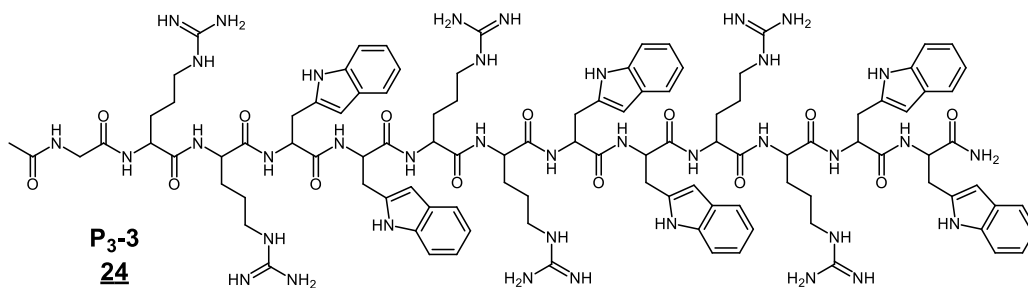
EM-MALDI-ToF de P₃-2 (**23**) (AcYGRRWRRWW-NH₂), m/z calculado para C₇₂H₉₇N₂₆O₁₀⁺ 1485,8 [M+H].



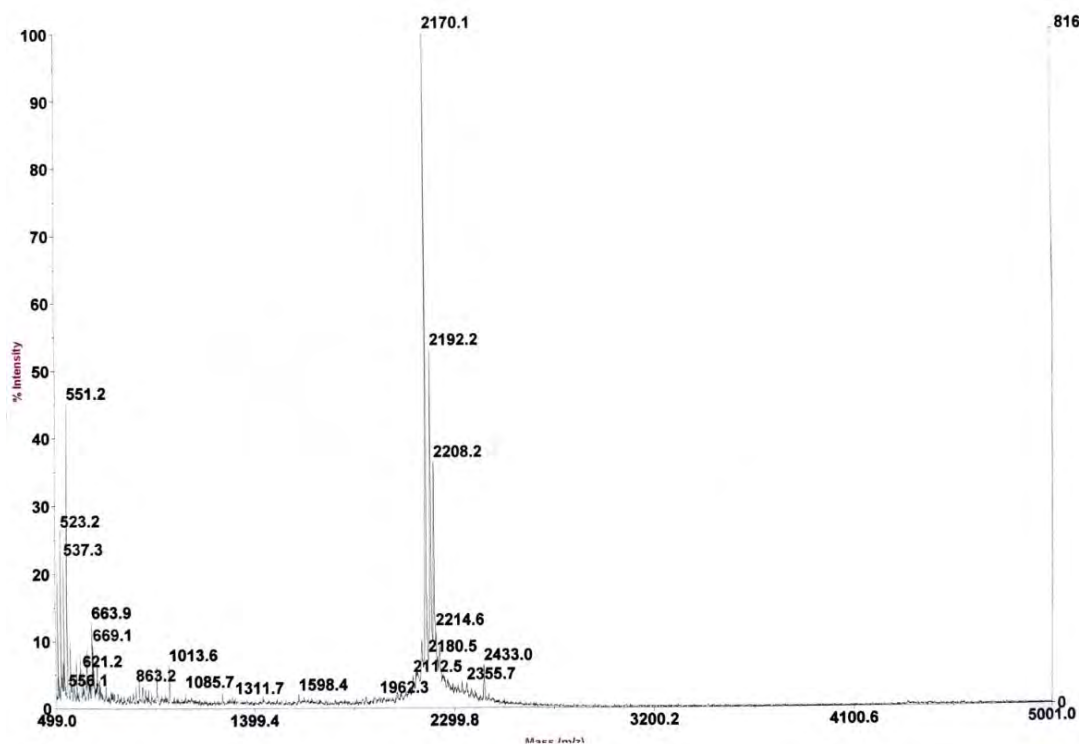
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para P₃-2: gradiente 15–50% A em 30 min



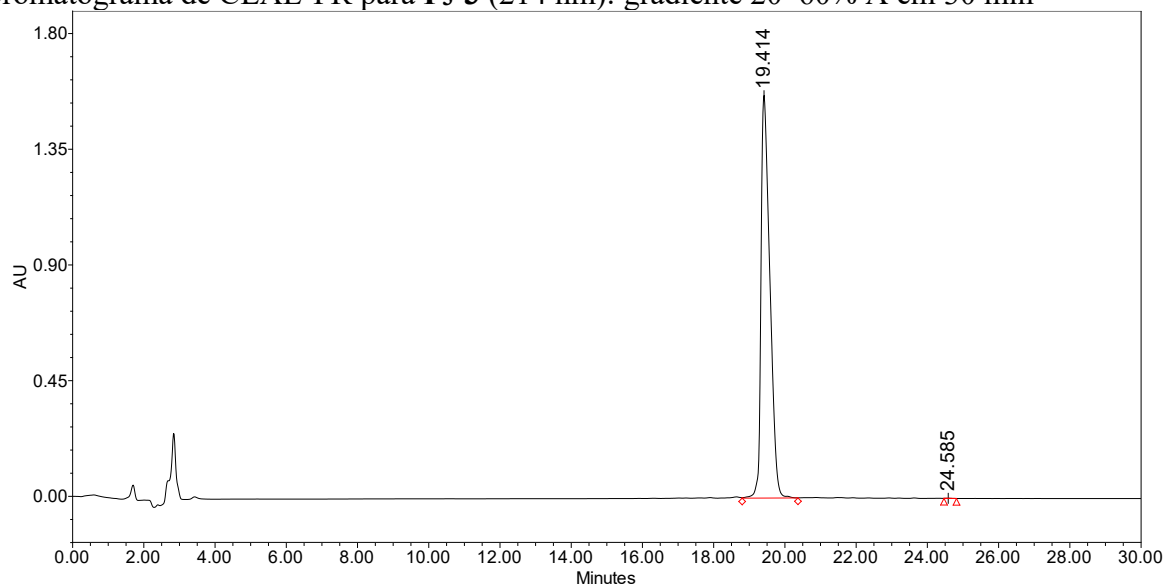
7.1.20. P₃-3 – AcYGRRWRRWRRWW-NH₂ (**24**)



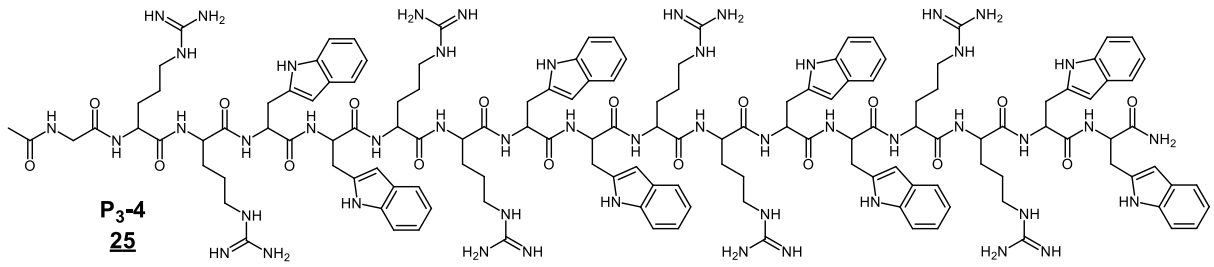
EM-MALDI-ToF de P₃-3 (**24**) (AcYGRRWRRWRRWW-NH₂), m/z calculado para C₁₀₆H₁₄₁N₃₈O₁₄⁺ 2170,1 [M+H].



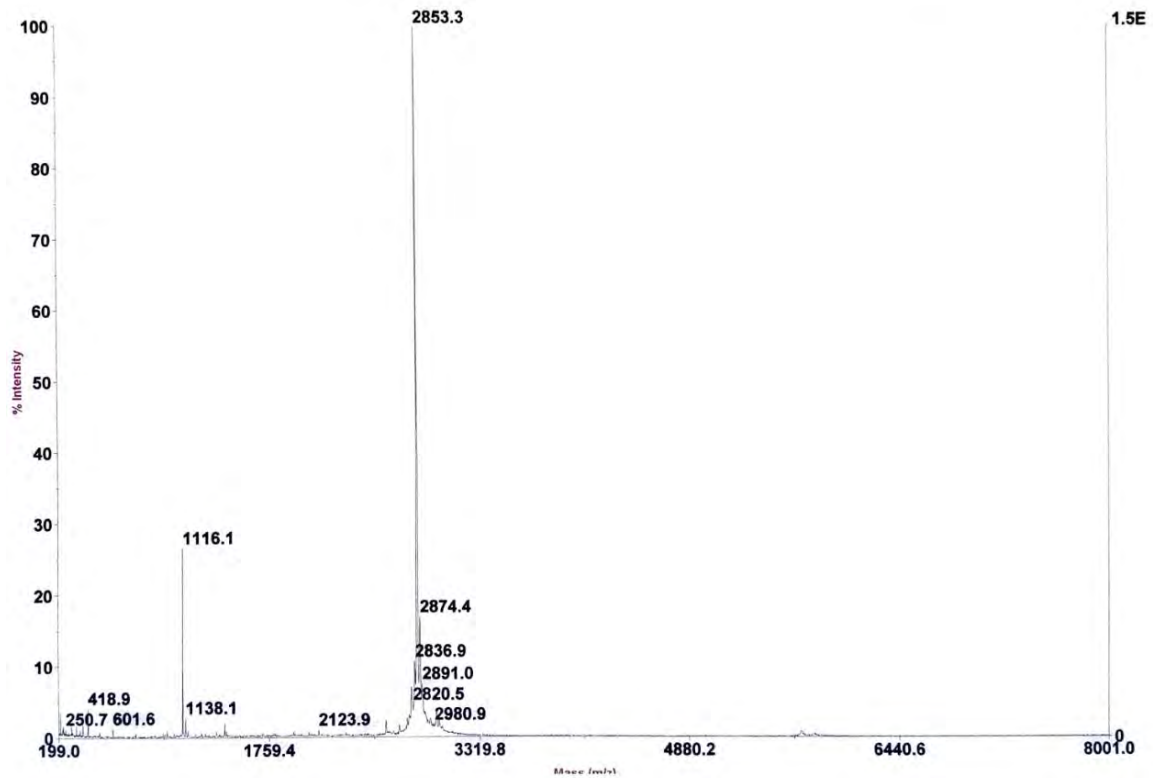
Cromatograma de CLAE-FR para P₃-3 (214 nm): gradiente 20–60% A em 30 min



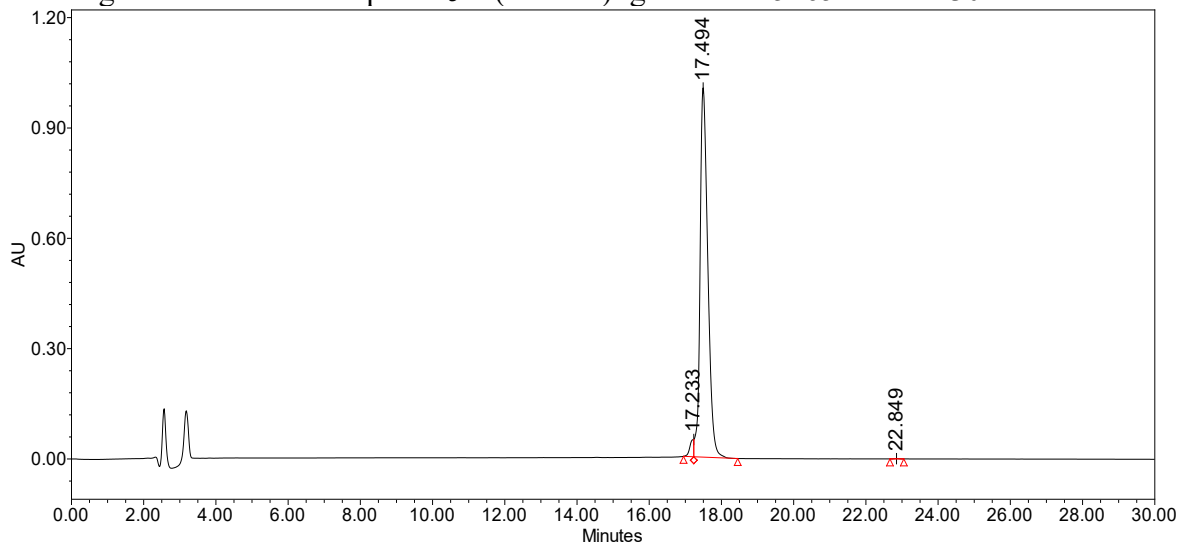
7.1.21. P₃-4 – AcYGRRWRRWRRWW-NH₂ (**25**)



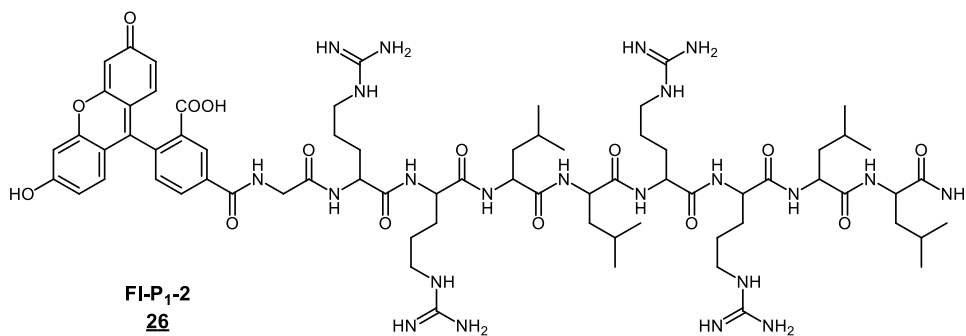
EM-MALDI-ToF de **P₃-4** (**25**) (AcYGRRWRRWRRWW-NH₂), m/z calculado para C₁₄₀H₁₈₅N₅₀O₁₈⁺ 2854,5 [M+H].



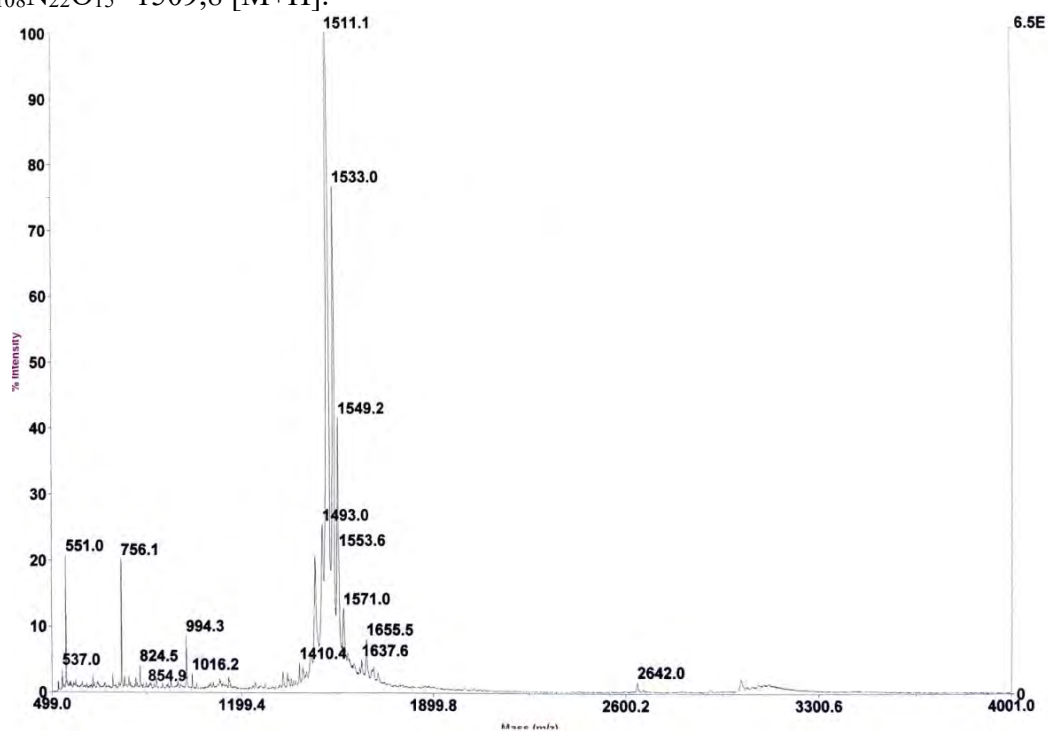
Cromatograma de CLAE-FR para **P₃-2** (214 nm): gradiente 25–65% A em 30 min



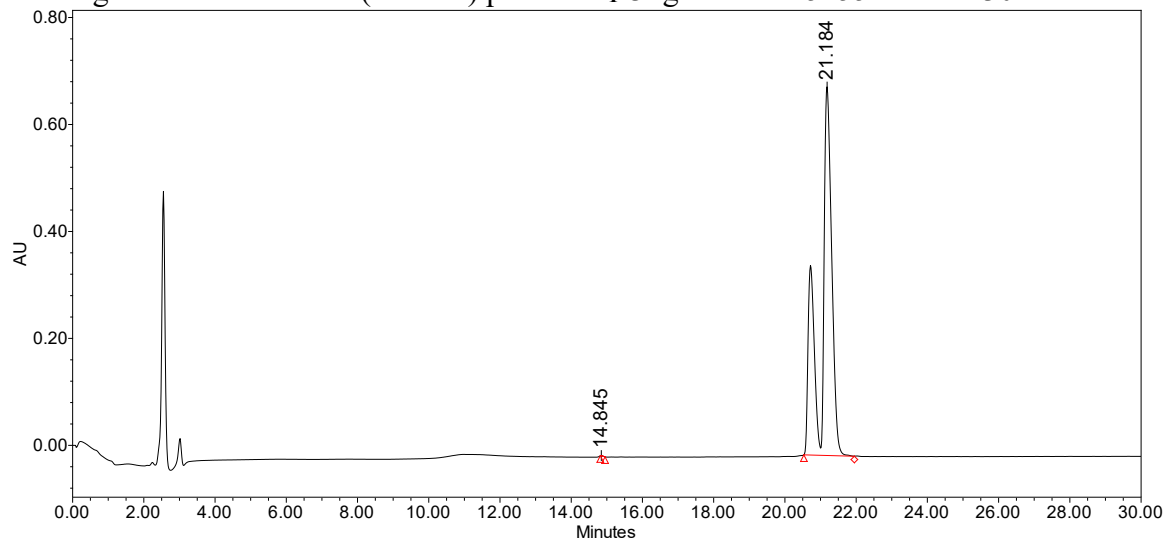
7.1.22. **FI-P₁-2 – FI-GRLLRLL-NH₂ (26)**



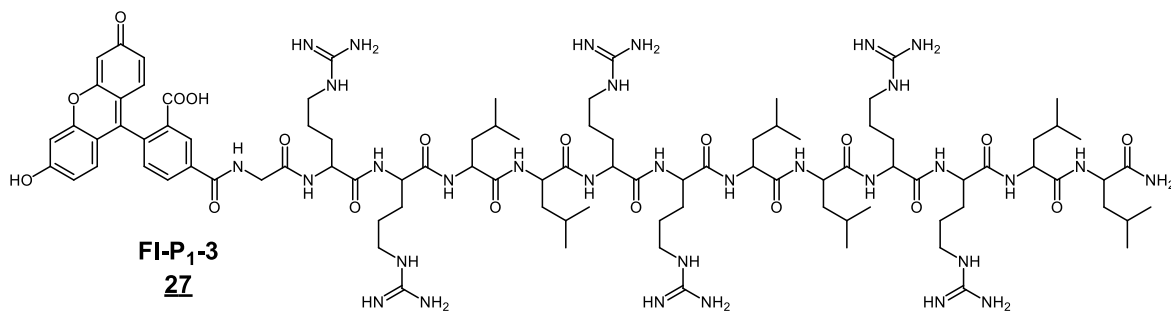
EM-MALDI-ToF de **FI-P₁-3 (27)** (FI-GRLLRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₇₉H₁₀₈N₂₂O₁₅⁺ 1509,8 [M+H].



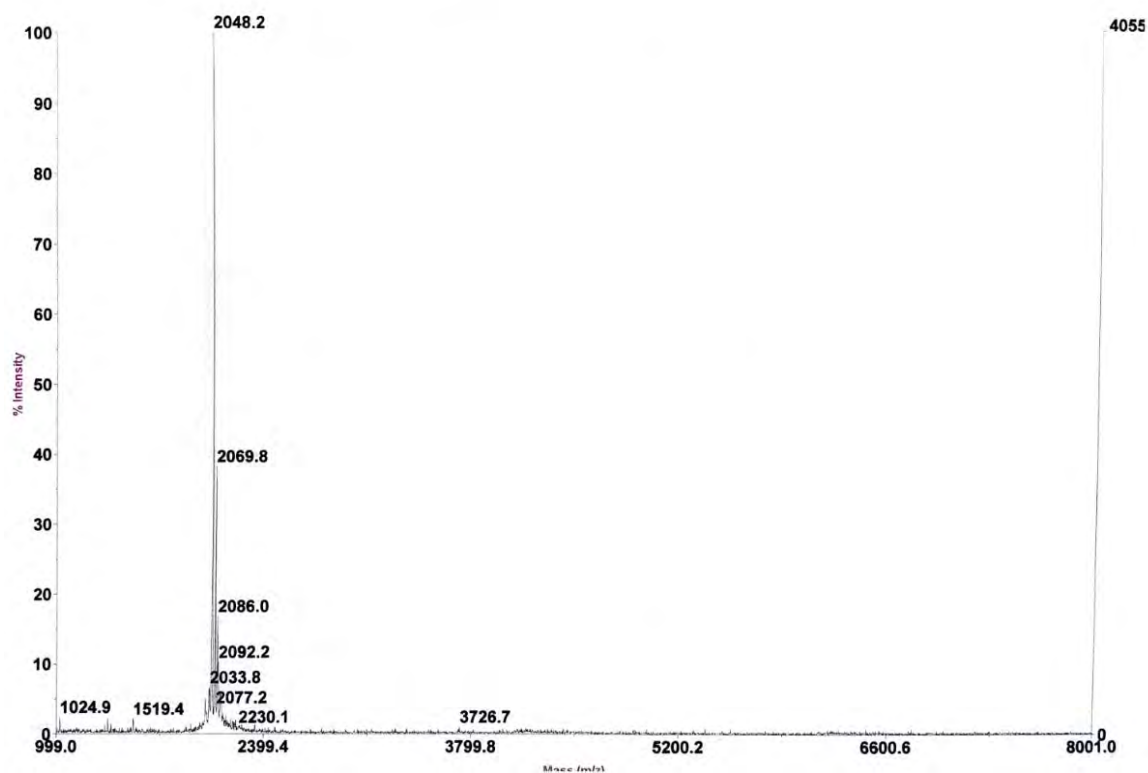
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **FI-P₁-3**: gradiente 25–55% A em 30 min



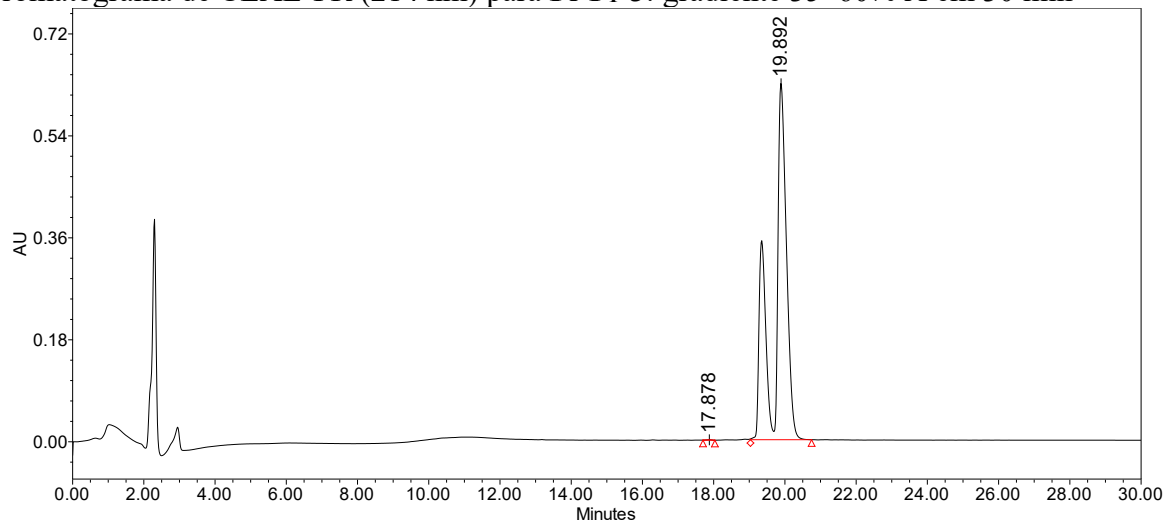
7.1.23. FI-P1-3 – FI-GRLLRLLRLL-NH₂ (**27**)



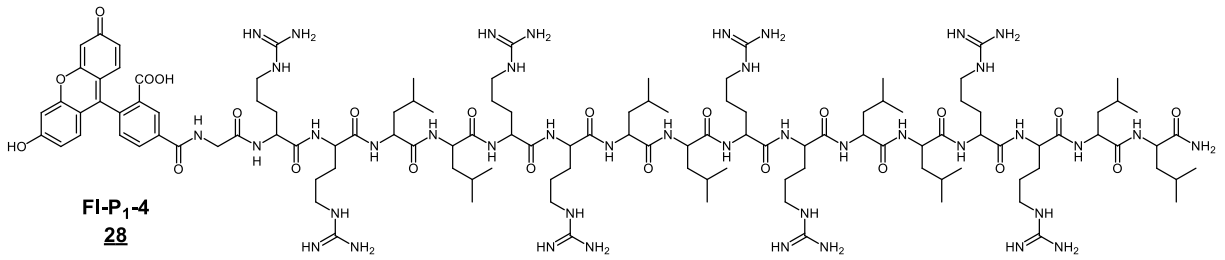
EM-MALDI-ToF de **FI-P1-3** (**27**) (FI-GRLLRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₉₅H₁₅₅N₃₂O₁₉⁺ 2048,2 [M+H]



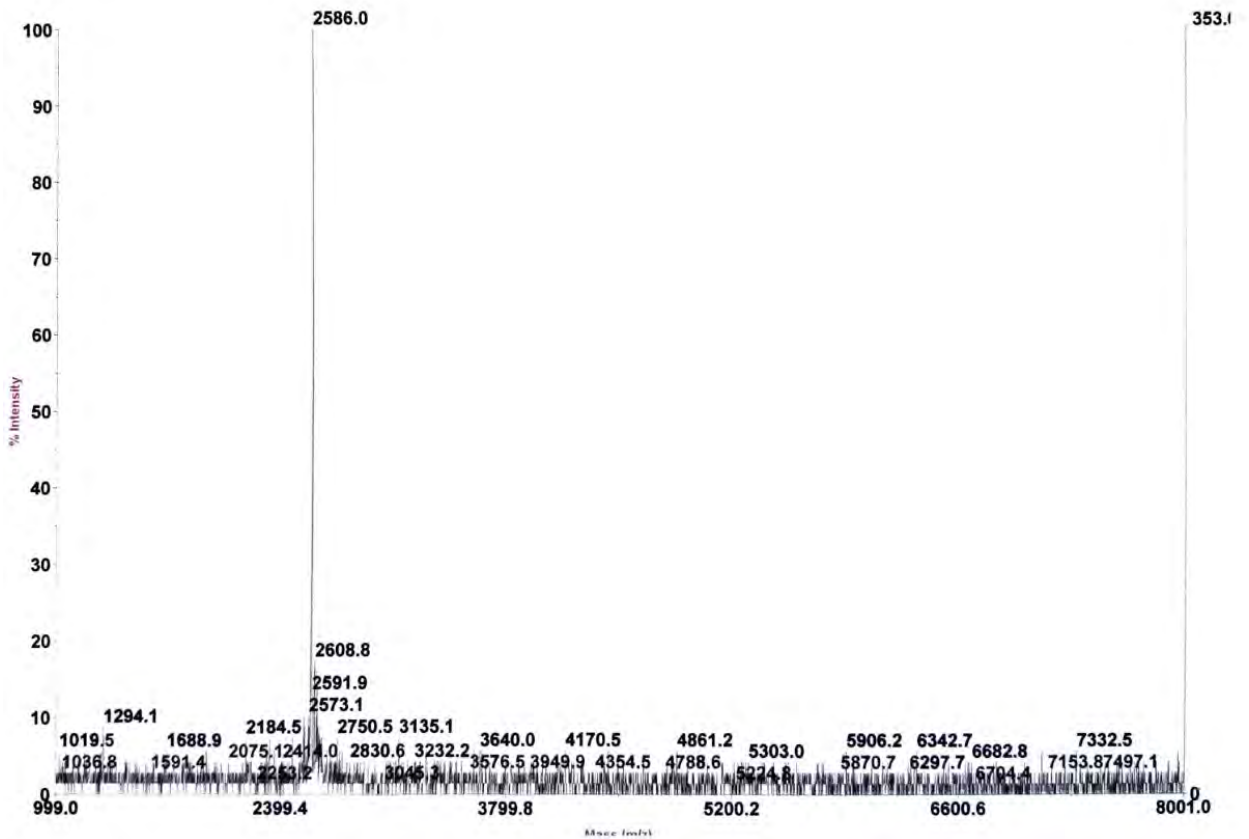
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **FI-P1-3**: gradiente 35–60% A em 30 min



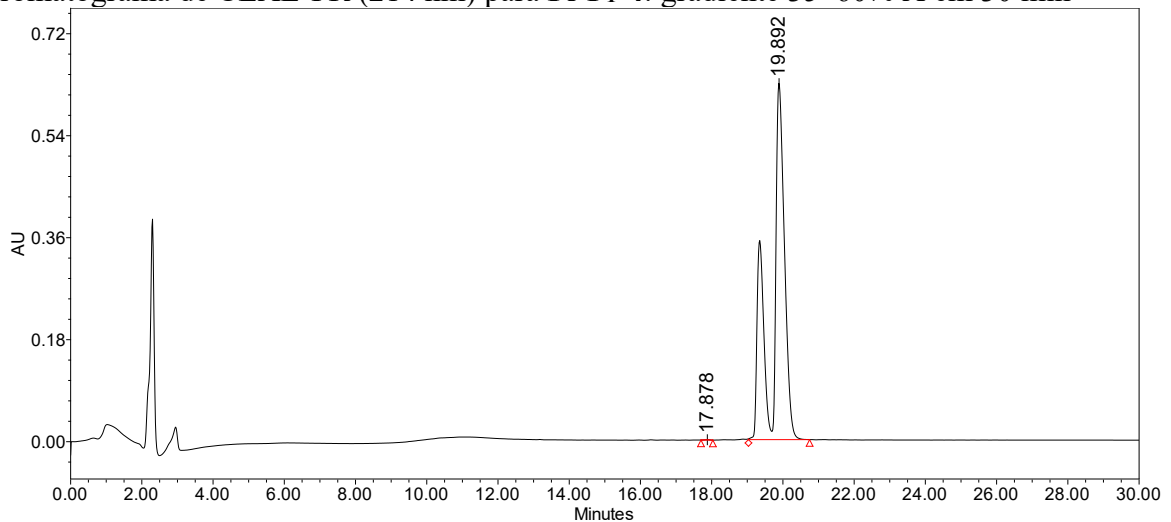
7.1.24. FI-P₁-4 – FI-GRLLRLLRLLRLL-NH₂ (**28**)



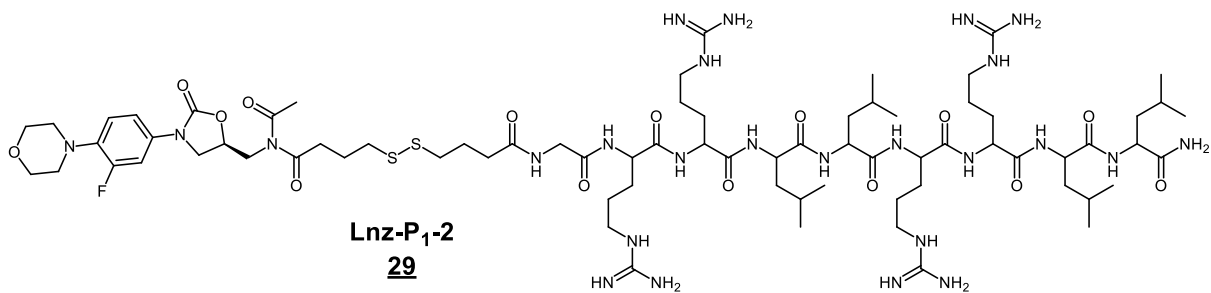
EM-MALDI-ToF de FI-P₁-4 (**28**) (FI-GRLLRLLRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₁₁₉H₂₀₁N₄₂O₂₃⁺ 2586,6 [M+H]



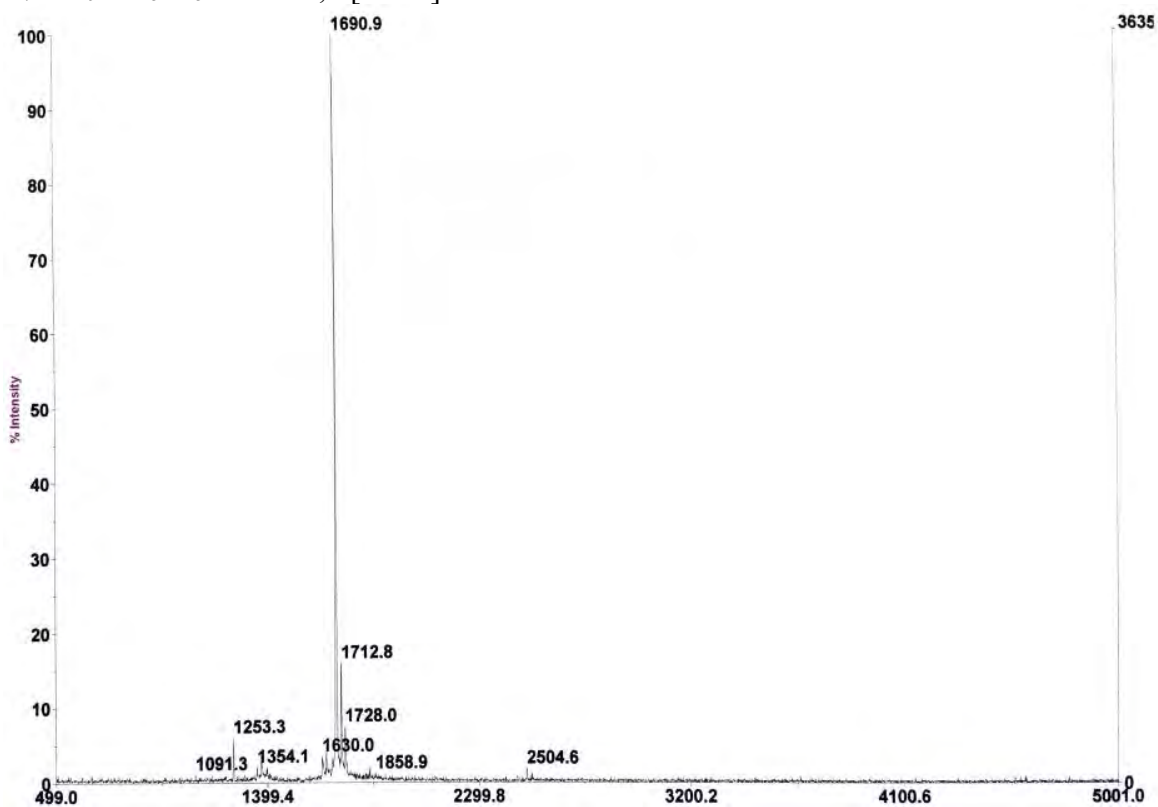
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para FI-P₁-4: gradiente 35–60% A em 30 min



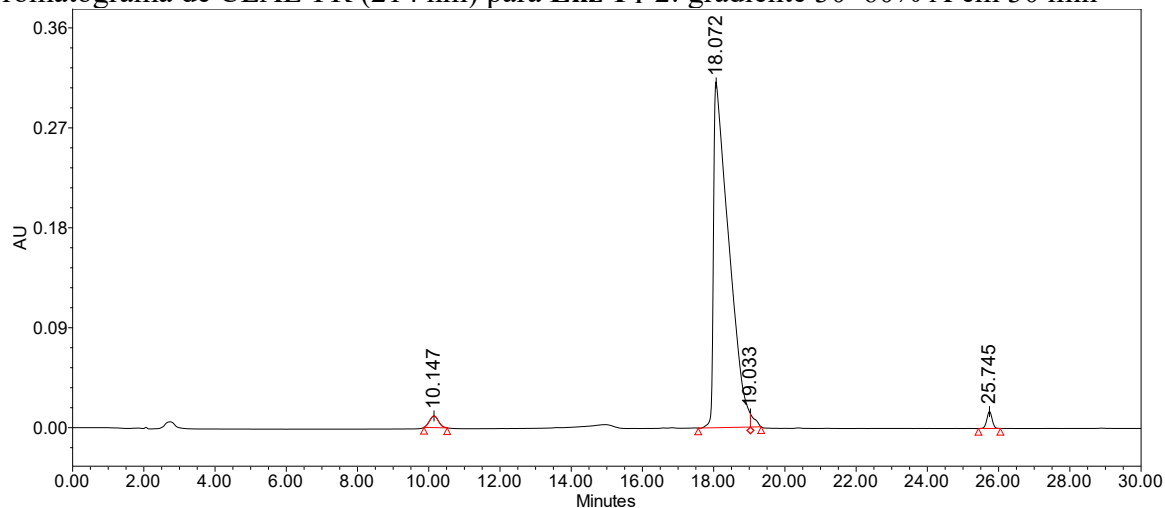
7.1.25. Lnz-P₁-2 – Lnz-DTBA-GRLLRLL-NH₂ (**29**)



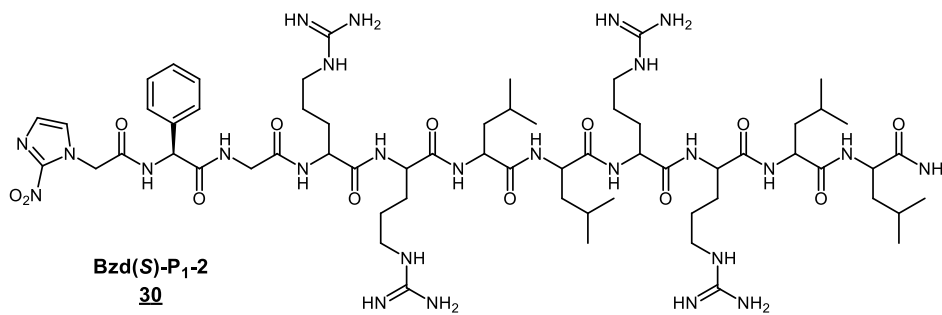
EM-MALDI-ToF de Lnz-P₁-2 (**29**) (Lnz-DTBA-GRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₇₄H₁₂₉FN₂₅O₁₅S₂⁺ 1691,0 [M+H].



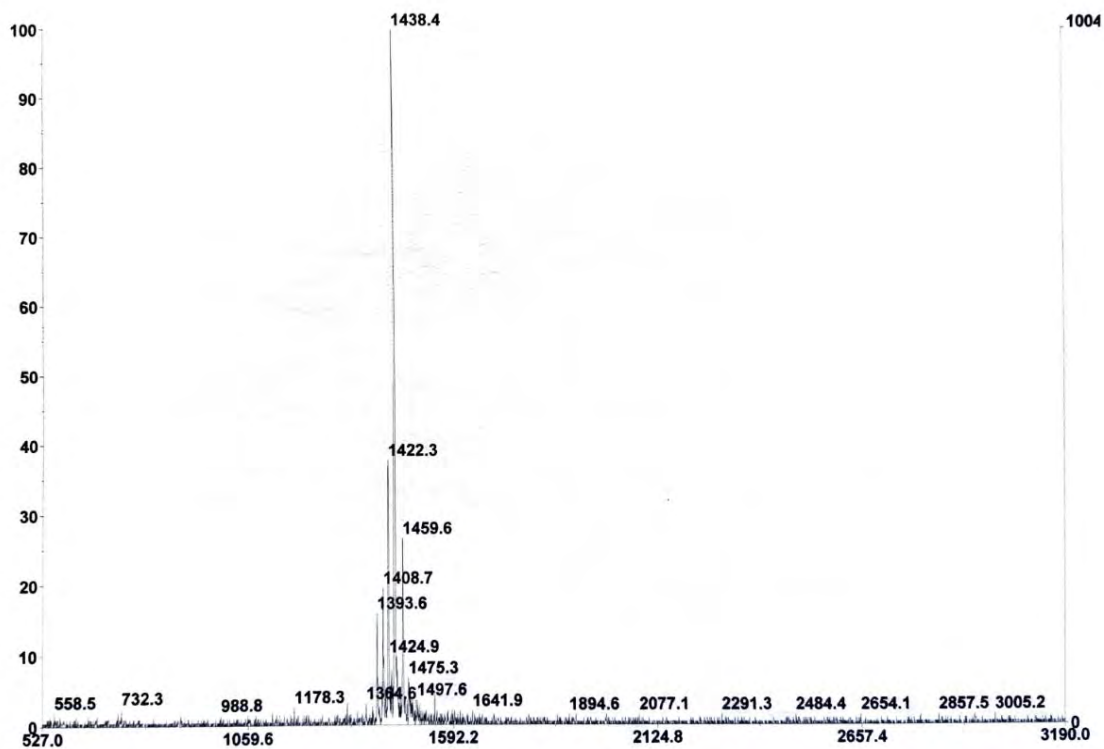
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para Lnz-P₁-2: gradiente 30–60% A em 30 min



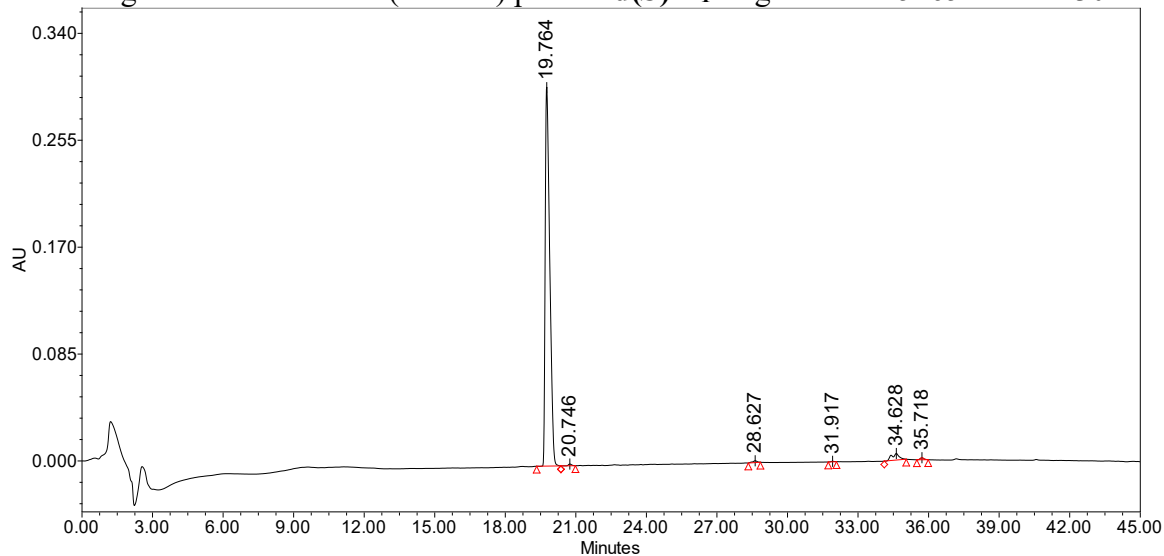
7.1.26. **Bzd(S)-P₁-2 – Bzd(S)-GRLLRLL-NH₂ (30)**



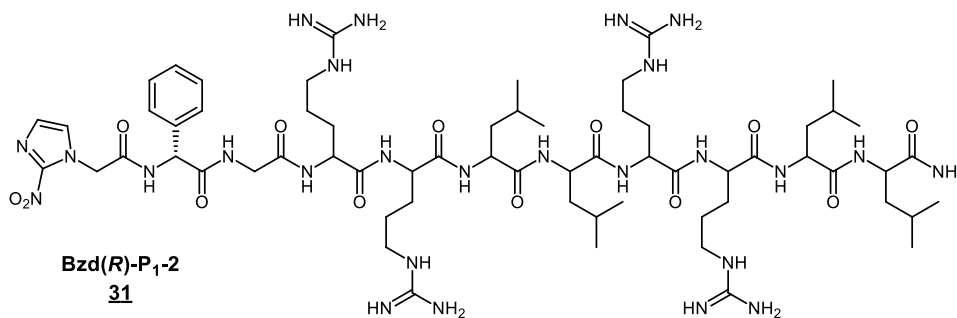
EM-MALDI-ToF de **Bzd(S)-P₁-2 (30)** (Lnz-DTBA-GRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₆₃H₁₀₉N₂₆O₁₃⁺ 1437,9 [M+H].



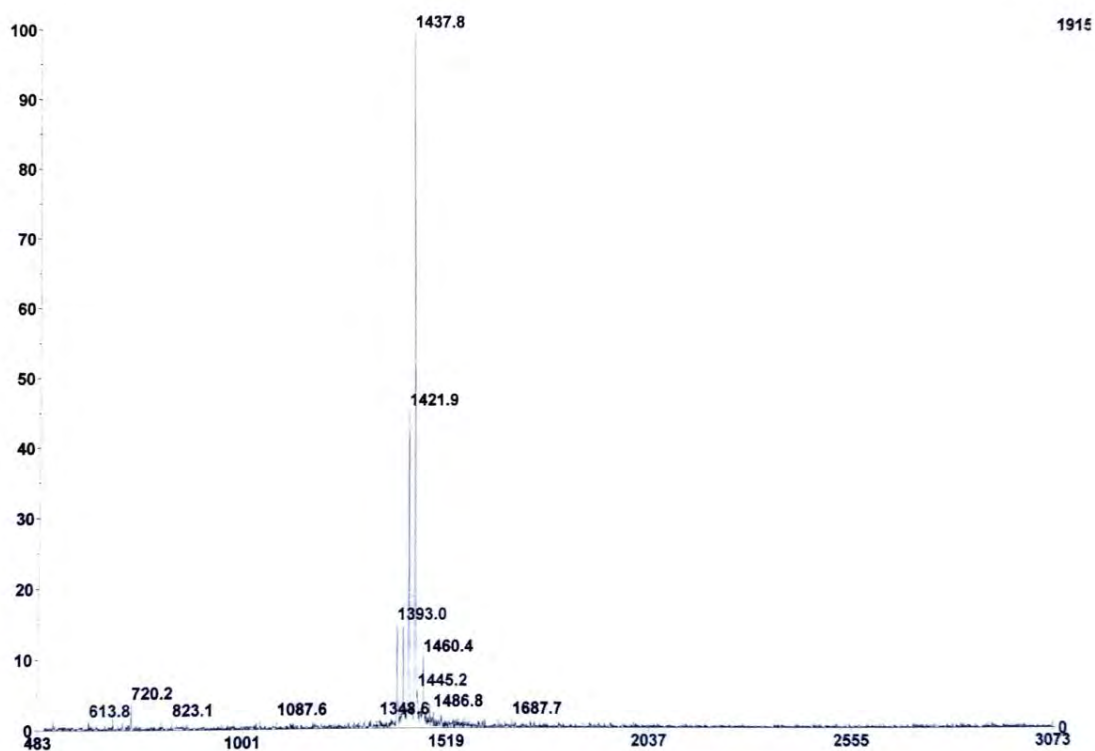
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **Bzd(S)-P₁-2**: gradiente 25–65% A em 30 min



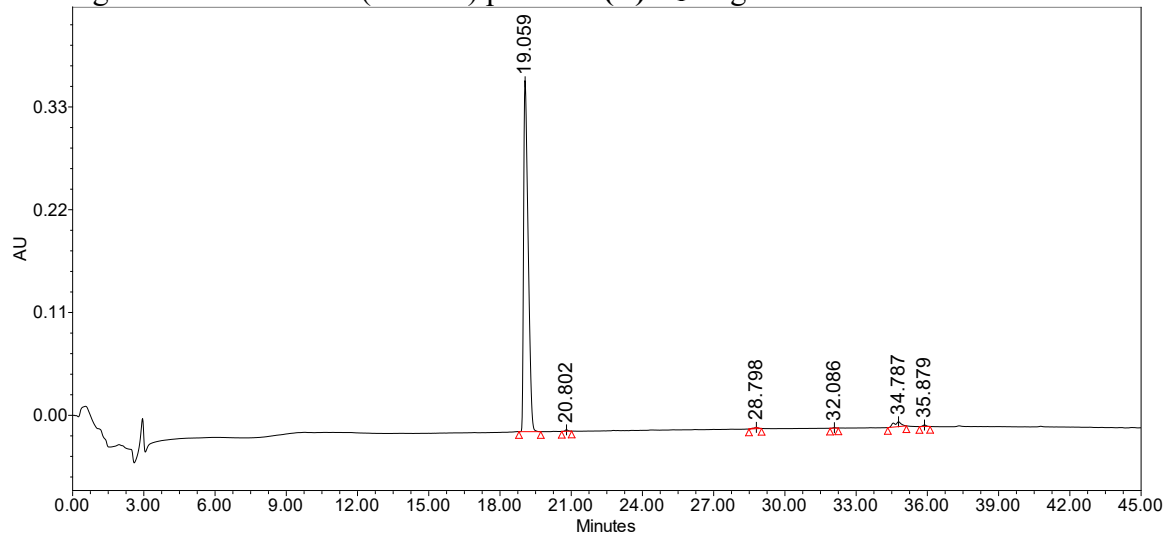
7.1.27. Bzd(*R*)-P₁-2 – Bzd(*S*)-GRLLRLL-NH₂ (**31**)



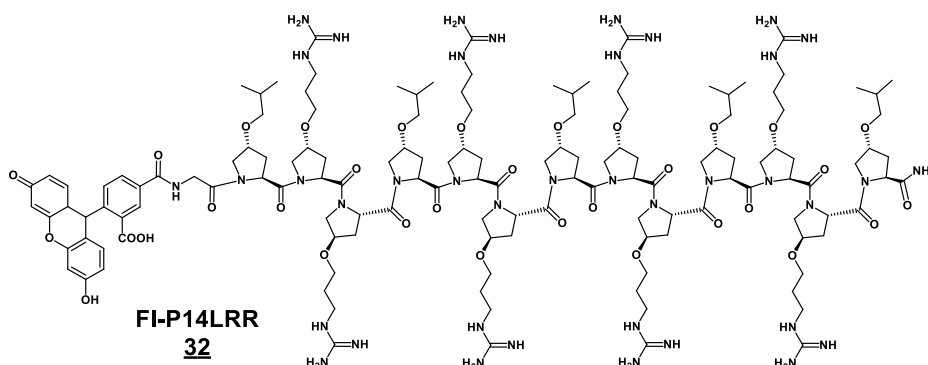
EM-MALDI-ToF de **Bzd(*R*)-P₁-2 (31)** (Lnz-DTBA-GRLLRLL-NH₂), m/z calculado para C₆₃H₁₀₉N₂₆O₁₃⁺ 1437,9 [M+H].



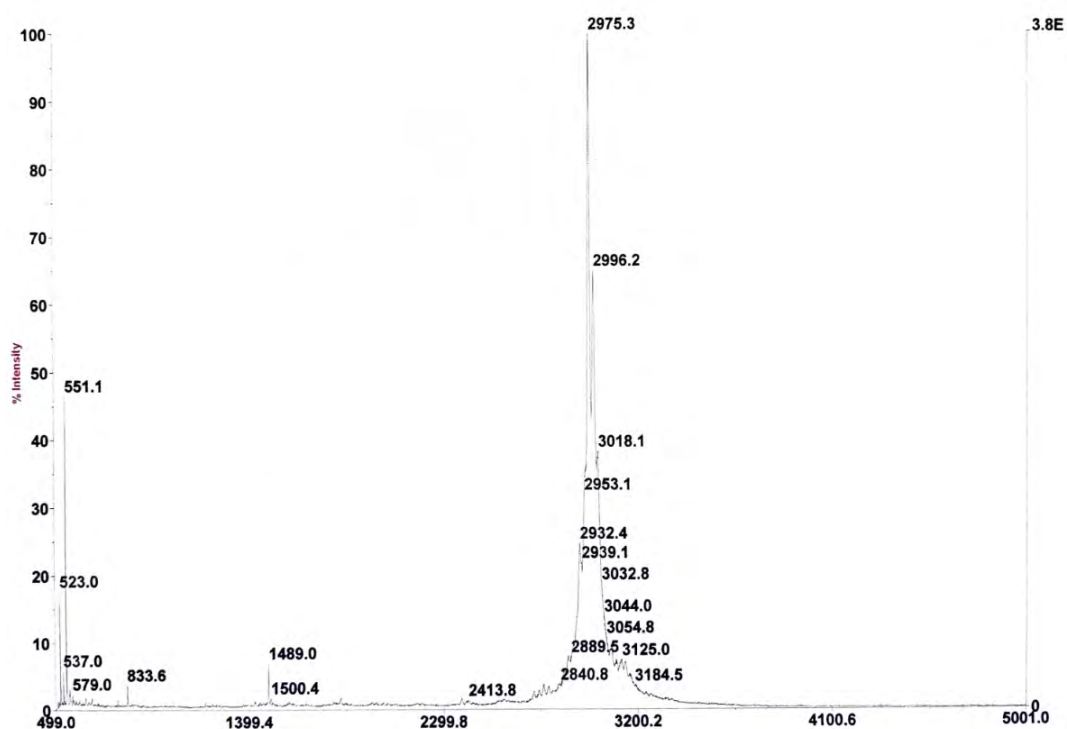
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **Bzd(*R*)-P₁-2**: gradiente 25–65% A em 30 min



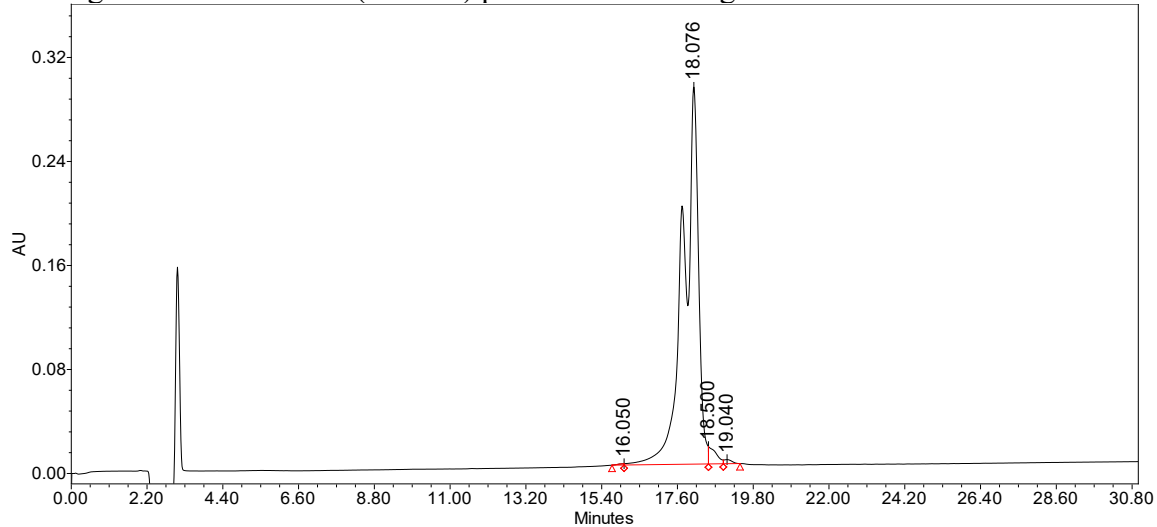
7.1.28. FI-P14LRR – FI-GPLRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂ (**32**)



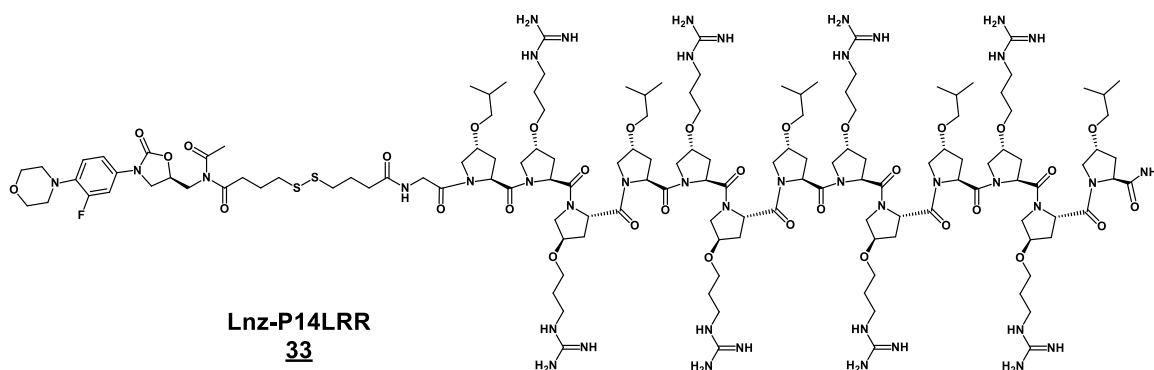
EM-MALDI-ToF de **FI-P14LRR (32)** (FI-GPLRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂), m/z calculado para C₁₄₀H₂₂₂N₃₉O₃₃⁺ 2977,7 [M+H].



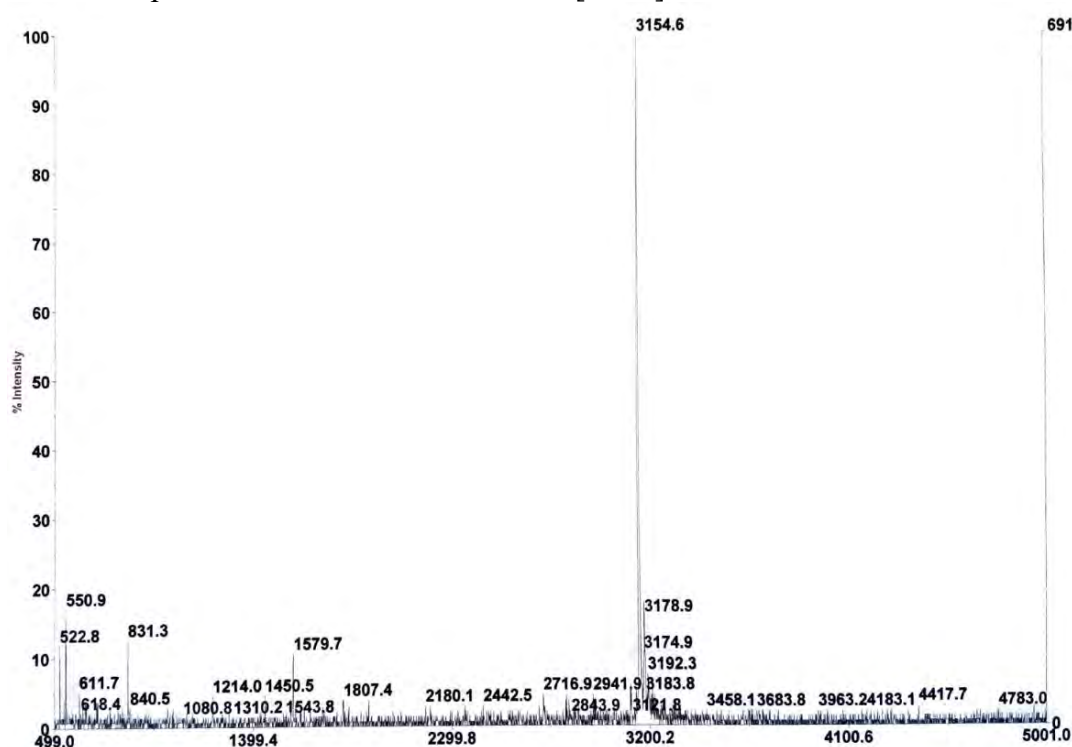
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **FI-P14LRR**: gradiente 25–65% A em 30 min



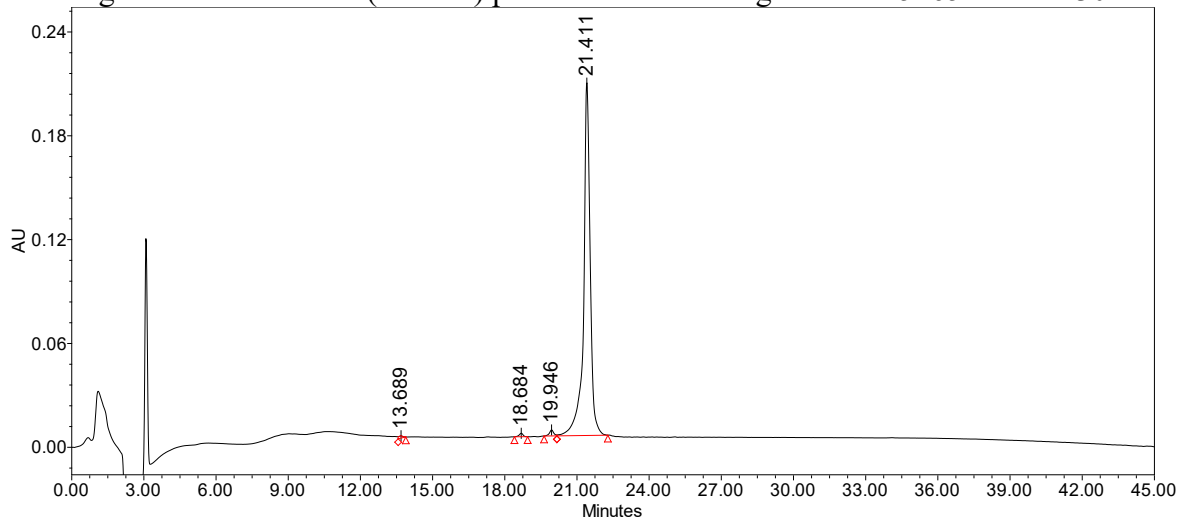
7.1.29. Lnz-P14LRR – Lnz-DTBA-GP_LPrPrP_LPrPrP_LPrPrP_LPrPrP_L-NH₂ (**33**)



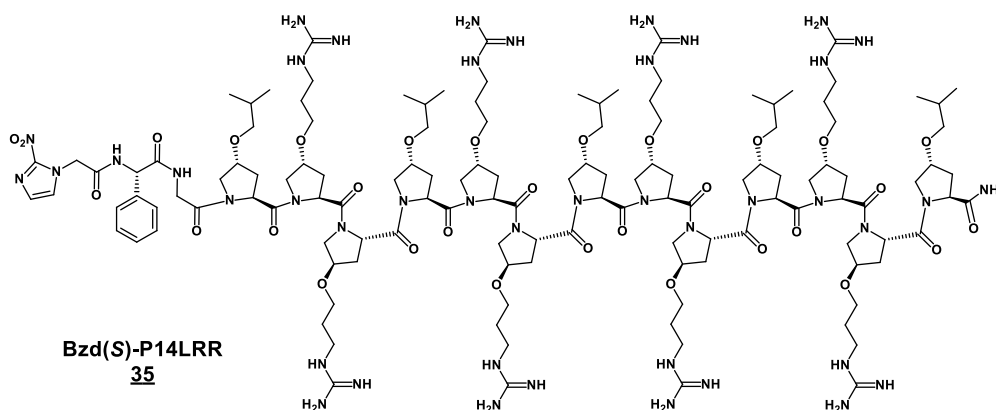
EM-MALDI-ToF de Lnz-P14LRR (**33**) (Lnz-DTBA-GP_LPrPrP_LPrPrP_LPrPrP_LPrPrP_LPrPrP_L-NH₂),
m/z calculado para C₁₄₃H₂₄₀FN₄₂O₃₃S₂⁺ 3156,8 [M+H]



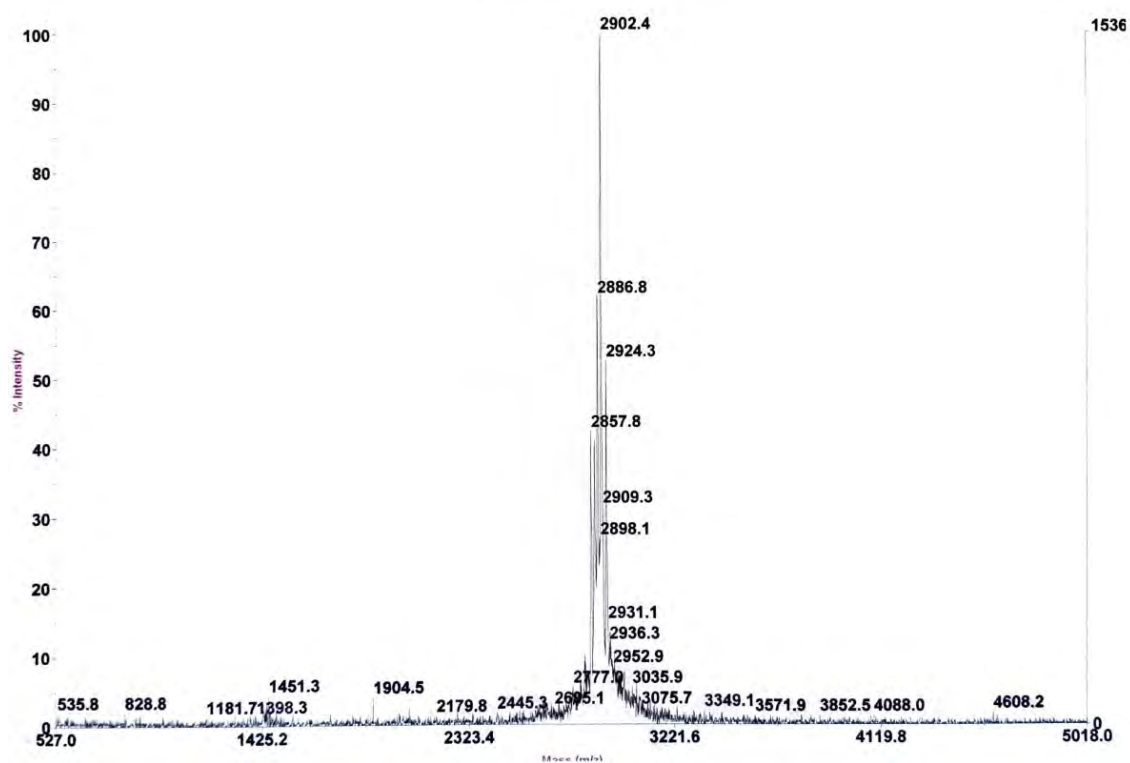
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para Lnz-P14LRR: gradiente 25–65% A em 30 min



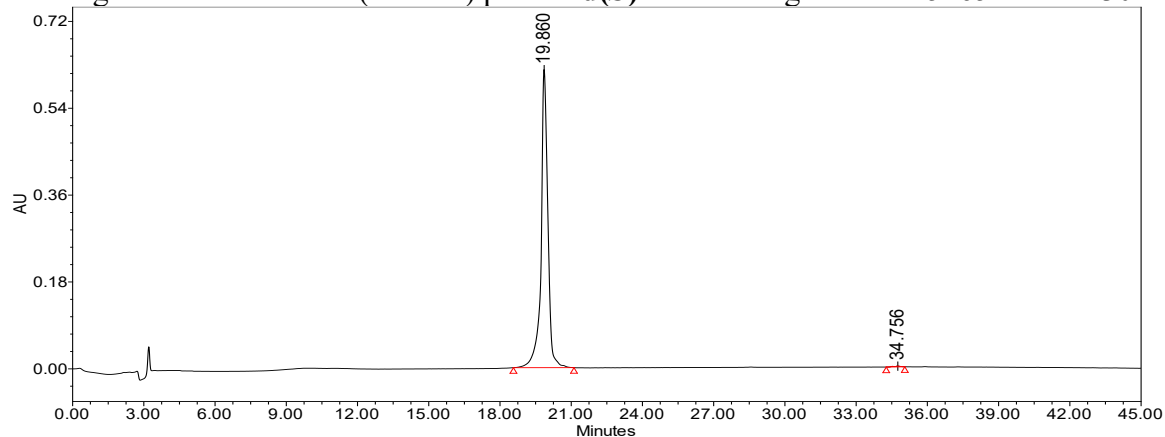
7.1.31. Bzd(S)-P14LRR – Bzd(S)-GPLRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂ (**35**)



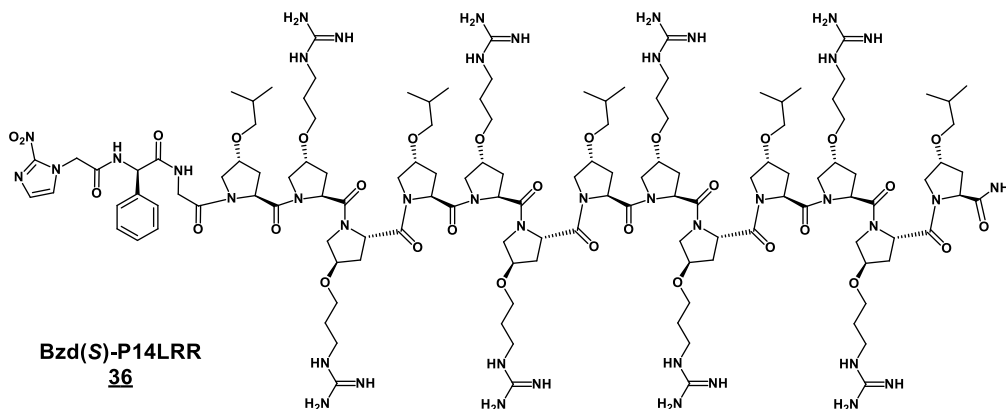
EM-MALDI-ToF de **Bzd(S)-P14LRR (35)**: (L_nZ-DTBA-GPLRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂), m/z calculado para C₁₃₃H₂₂₀N₄₃O₃₁⁺ 2903,7 [M+H]



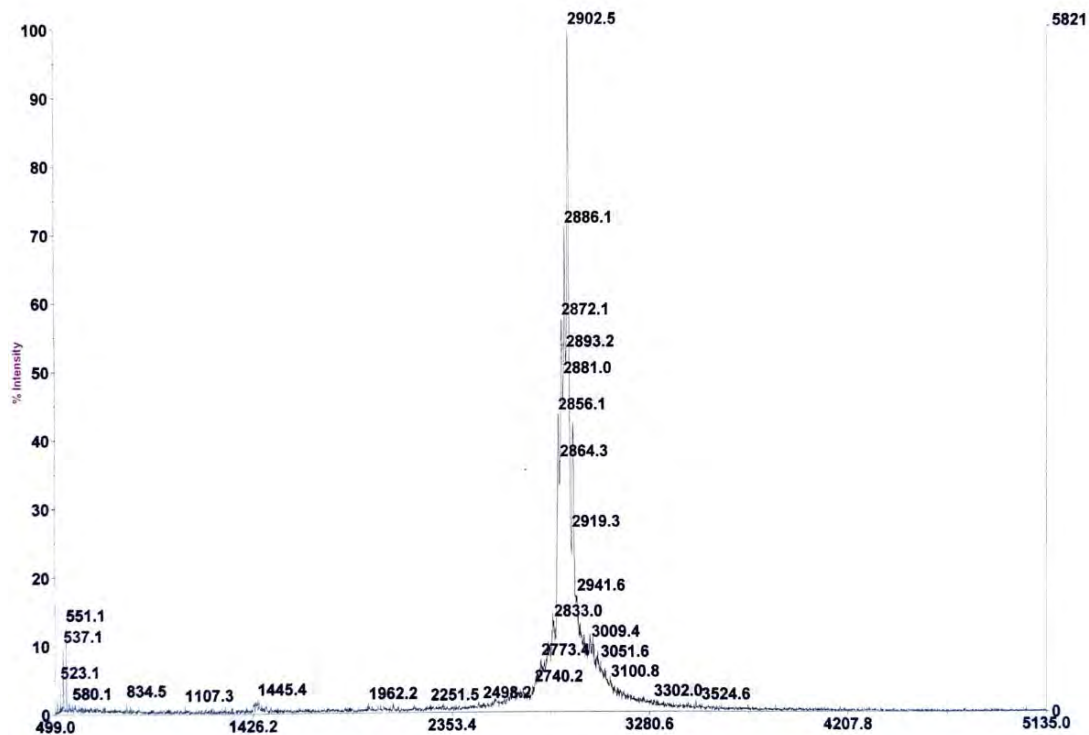
Cromatograma de CLAE-FR (214 nm) para **Bzd(S)-P14LRR**: gradiente 25–65% A em 30 min



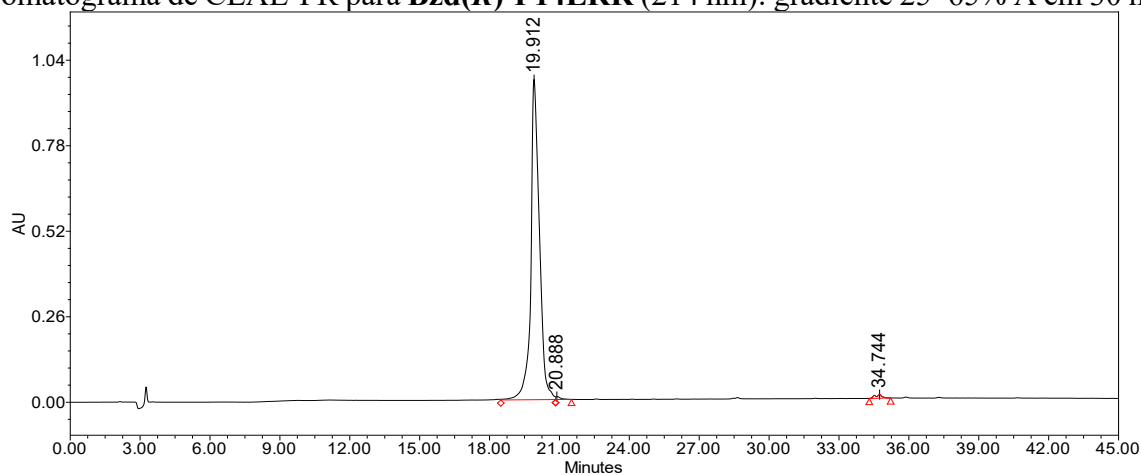
7.1.32. Bzd(*R*)-P14LRR – Bzd(*R*)-GPLPRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂ (**36**)



EM-MALDI-ToF de **Bzd(*R*)-P14LRR (35)**: (L_nZ-DTBA-GPLPRPRPLPRPRPLPRPRPLPRPRPL-NH₂), m/z calculado para C₁₃₃H₂₂₀N₄₃O₃₁⁺ 2903,7 [M+H].

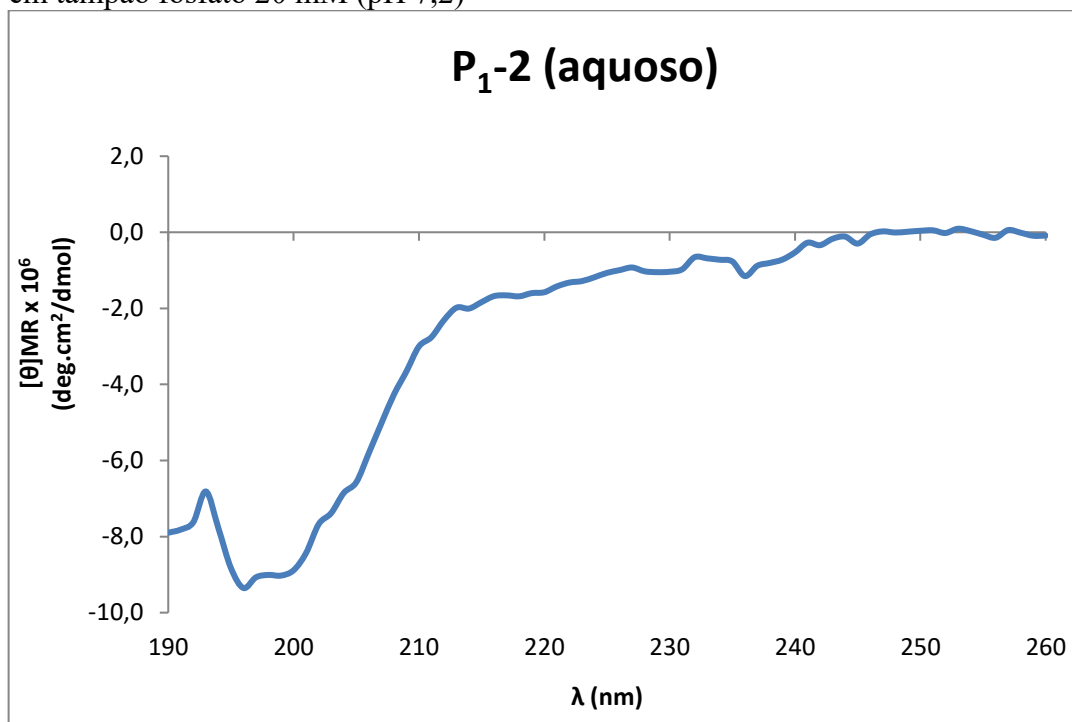


Cromatograma de CLAE-FR para **Bzd(*R*)-P14LRR** (214 nm): gradiente 25–65% A em 30 min

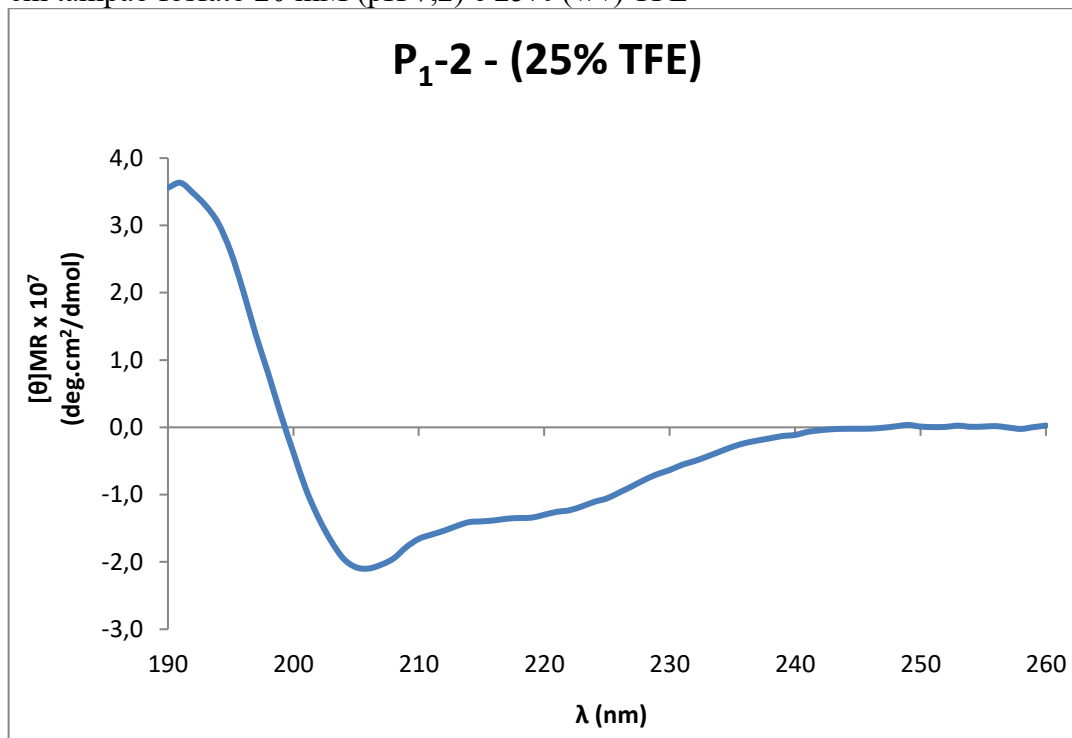


7.2. Espectros de Dicroísmo Circular

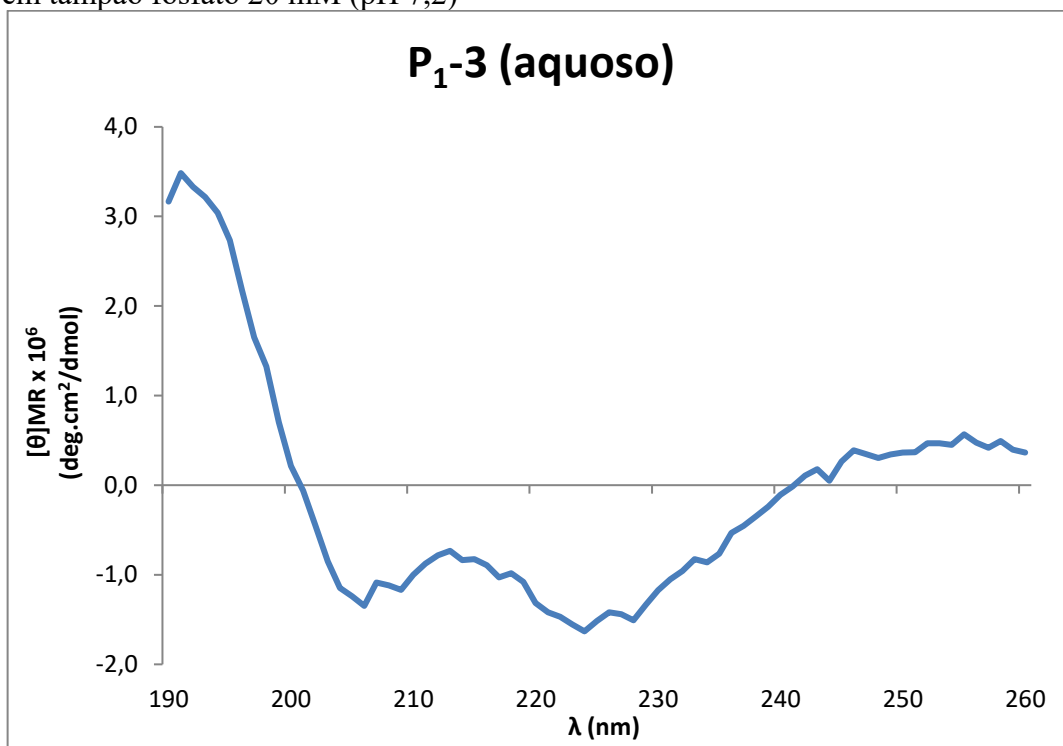
P₁-2 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2)



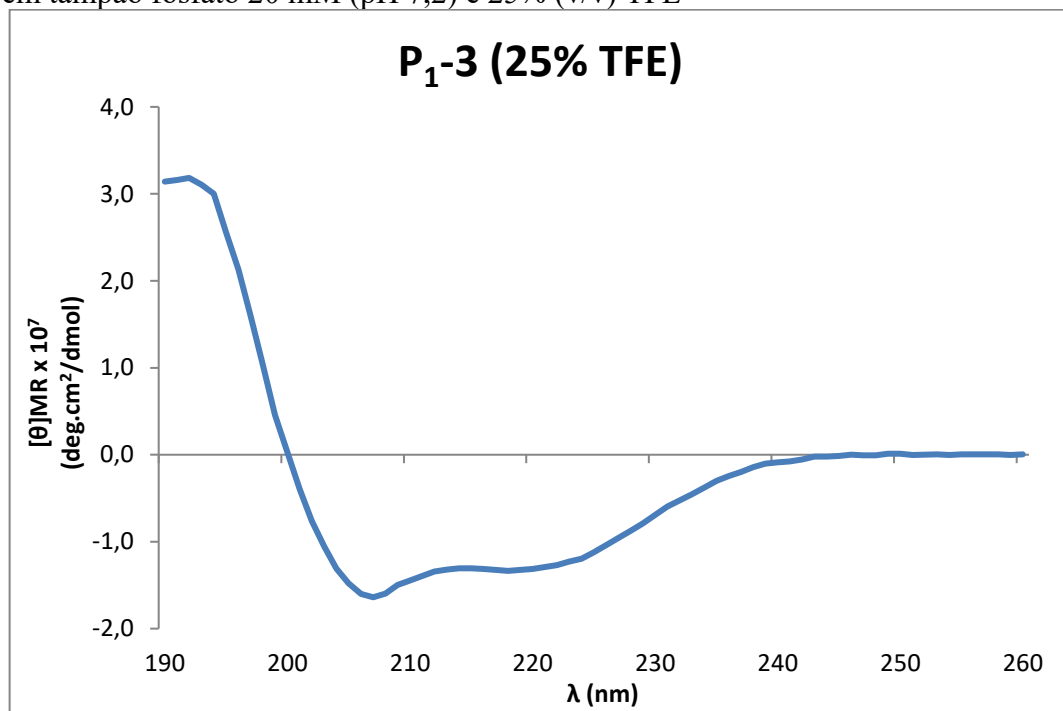
P₁-2 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2) e 25% (v/v) TFE



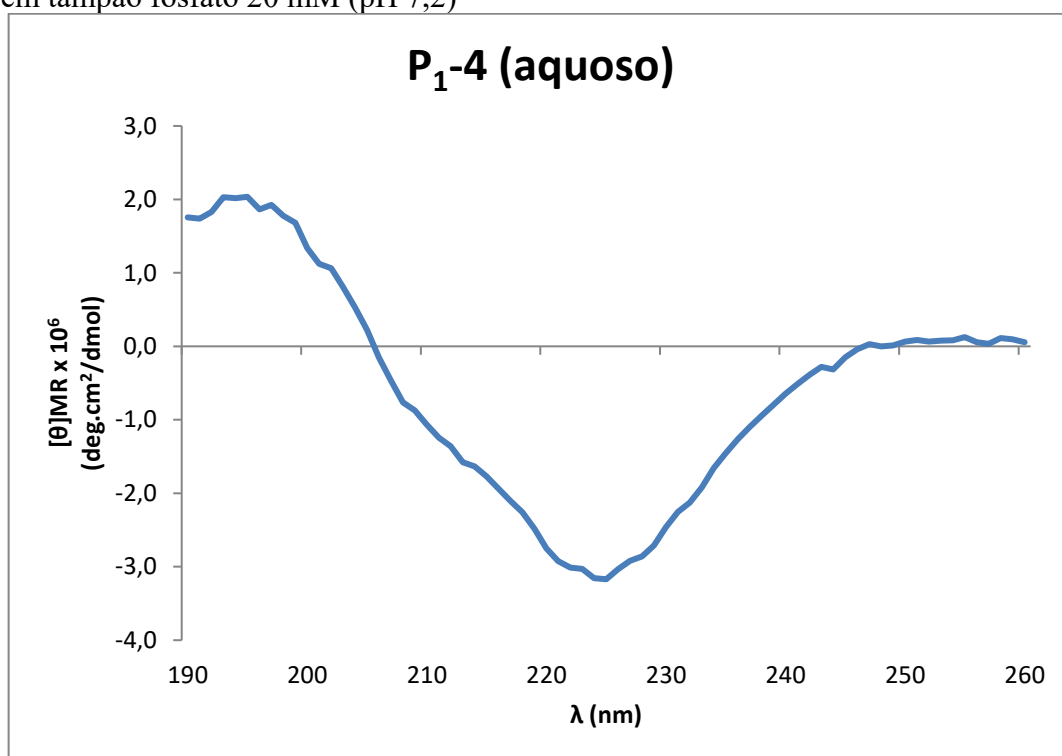
P₁-3 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2)



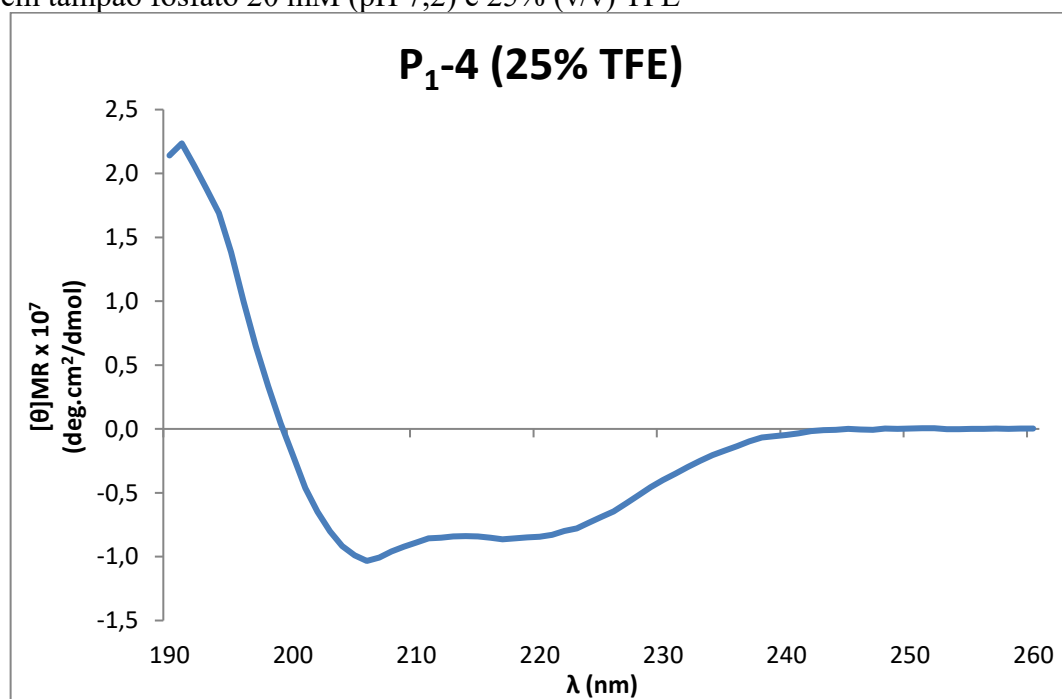
P₁-3 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2) e 25% (v/v) TFE



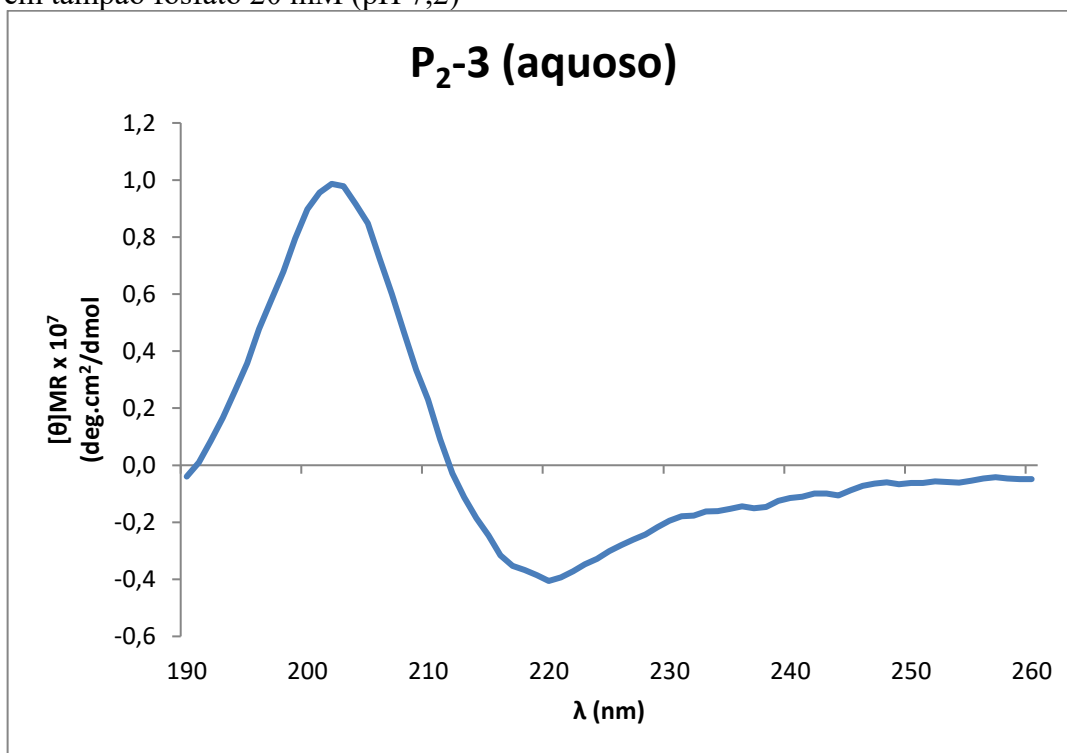
P₁-4 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2)



P₁-4 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2) e 25% (v/v) TFE



P₂-3 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2)



P₂-3 em tampão fosfato 20 mM (pH 7,2) e 25% (v/v) TFE

