



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido  
para avaliação no Edital: PIC/UFABC 04/2022

**Discente: RA: 11202021644**

**Título do projeto:** Avaliação da sinergia entre peptídeos antimicrobianos a terapia fotodinâmica em bactérias patogênicas.

**Palavras-chave do projeto:** Peptídeos antimicrobianos (PAM); terapia fotodinâmica (TFD); bactérias; sinergismo; hipericina; VmCT1; IsCT1; Polybia-CP.

**Área do conhecimento do projeto:** Química de Macromoléculas, Bioquímica.

## 1. Resumo

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são biomoléculas, com menos de 100 resíduos de aminoácido, que apresentam função importante no sistema imune de resposta de diversos micro-organismos, como bactérias, fungos e vírus, além de serem potenciais agentes anticâncer, o que torna cada vez mais relevante a busca por novos compostos ativos.

O projeto tem como proposta o estudo dos PAM (VmCT1, IsCT1 e Polybia-CP), em combinação com a terapia fotodinâmica, no intuito de verificar a sinergia que essas estratégias podem proporcionar contra diversas cepas de bactérias patogênicas. Existem, na literatura, alguns estudos que comprovaram um efeito sinérgico entre as duas terapias contra bactérias, mas ainda não está muito claro como isso acontece. Nesse trabalho, os peptídeos serão sintetizados pelo método em fase sólida, purificados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e caracterizados por Espectrometria de Massas (LC/ESI-MS). Os ensaios biológicos, para verificar a atividade antimicrobiana, serão realizados em bactérias gram-positivas e negativas e, como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica, será usado a hipericina. Os estudos serão conduzidos para se verificar a influência na ordem terapêutica, concentração de drogas e tempo de exposição.

## 2. Introdução

A resistência a antibióticos é um grave problema de saúde pública<sup>1</sup>. Devido à capacidade das bactérias em desenvolver mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos, o tratamento de doenças infecciosas está se tornando cada vez mais difícil<sup>2,3</sup>. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos<sup>4</sup>.

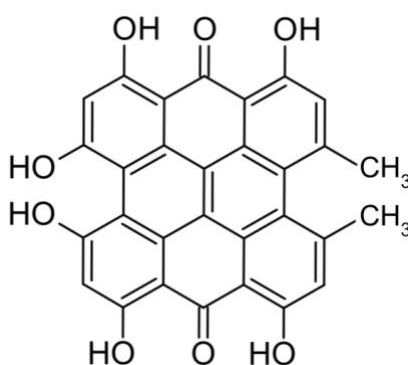
Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são considerados promissores e potenciais candidatos a fármacos, devido ao seu amplo espectro de atividade, baixa toxicidade, e capacidade de diminuição no desenvolvimento de resistência pela célula alvo<sup>2</sup>.

PAMs são moléculas biologicamente ativas, produzidas por uma grande variedade de organismos, como componente essencial da resposta imune inata, sendo seu principal papel a defesa do hospedeiro, os quais exercem citotoxicidade sobre micro-organismos patogênicos<sup>2,5</sup>.

Geralmente são peptídeos catiônicos, com ampla atividade antimicrobiana. Os aspectos relevantes da estrutura dos PAMs para a atividade antimicrobiana e seletividade incluem: conformação adotada em certo meio, carga líquida e anfipaticidade; além disso, propriedades físico-químicas como momento hidrofóbico, hidrofobicidade e ângulo polar são importantes para determinar a interação dos peptídeos com biomembranas<sup>6,7</sup>.

Da mesma forma, a terapia fotodinâmica é uma modalidade alternativa de tratamento de infecções, que se baseia na combinação de um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio, o qual tem mostrado resultados promissores em vários tipos de câncer<sup>8</sup> e em micro-organismos resistentes<sup>9</sup>. Trata-se de uma opção que oferece uma ação local, seletiva e imediata nas células tumorais, visando a destruição do tecido anormal por meio de apoptose ou necrose, por meio da formação de EROs nas células alvo, levando à oxidação das biomoléculas, com poucos efeitos colaterais, como a sensibilidade a algumas luzes<sup>8</sup>.

O fotossensibilizador utilizado neste trabalho será a Hipericina (Figura 1), um corante amarelo brilhante extraído das pétalas de *Hypericum perforatum*, que possui propriedades anti-inflamatória, antisséptica e antiviral<sup>10,11</sup>, além disso do seu potencial uso para o tratamento de câncer. Essa característica é graças à sua alta eficiência na geração de oxigênio singlete, pelo seu forte potencial de doação de elétrons – em solventes polares – e pela sua preferência por se acumular em tecidos cancerosos; além de ser um composto natural de baixa toxicidade na ausência de luz<sup>8,12</sup>.



**Figura 1. Representação da estrutura química da Hipericina**

Para a realização desse tratamento, medicamentos sensíveis à luz são ministrados ao paciente e, posteriormente, são absorvidos principalmente por células tumorais do corpo e micro-organismos. Ao expor as células à luz – de frequência específica (595 nm), há a formação de oxigênio singlete nas organelas, que reage rapidamente com componentes

celulares envolvidos na manutenção estrutural da membrana, ocasionando alterações na permeabilidade celular, o que causa danos à célula, levando à morte celular – via necrose ou apoptose e a um estímulo do sistema imunológico<sup>8</sup>.

A terapia fotodinâmica e os peptídeos antimicrobianos são tratamentos que estão ganhando destaque para ações localizadas. Ambas as abordagens apresentam limitações terapêuticas, quando empregadas individualmente<sup>13</sup>, mas combinadas, elas podem apresentar sinergismo e atuarem de forma complementar.

Recentemente, estudos conjugando a ação da hipericina com estruturas peptídicas têm mostrado um grande potencial, por incrementar sítios hidrofóbicos na sua interface, criando assim um ambiente favorável e capaz de melhorar o comportamento foto-físico na geração de EROs, bem como o aumento de moléculas no estado excitado<sup>14</sup>. Além dos mecanismos celulares já mencionados da TFD, a hipericina também é capaz de causar estresse por padrões moleculares associados a danos, que ativam eficientemente o sistema imunológico do paciente<sup>15</sup>. A TFD mostra-se como uma ferramenta de combinação a outras terapias antimicrobianas - como os peptídeos - na obtenção de um provável efeito sinérgico<sup>5</sup>.

Os peptídeos antimicrobianos, usados em uma concentração terapêutica, podem potencializar o uso da hipericina na TFD<sup>16</sup> e garantir um efeito sinérgico ao combinar ambas as alternativas, mantendo-se assim a integridade de células saudáveis<sup>5</sup>.

Essa abordagem sinérgica tem o potencial de eliminar infecções localizadas e, ao mesmo tempo, impedir o desenvolvimento de novos perfis de resistência<sup>17</sup>. Outras vantagens observadas são: maior efetividade de destruição das células-alvo; maior espectro de ação; prevenção do surgimento de resistência e; melhora da resposta terapêutica<sup>17</sup>.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Este projeto tem como objetivo verificar o sinergismo entre a terapia fotodinâmica e os peptídeos antimicrobianos, no intuito de gerar dados para desenvolvimento de um processo biotecnológico seguro e de qualidade para o tratamento de infecções bacterianas, além de proporcionar a inserção do(a) aluno(a) ao mundo da pesquisa científica.

### 3.2. Objetivos específicos

- Obtenção dos peptídeos – a síntese dos peptídeos antimicrobianos será realizada pelo método da síntese de peptídeos em fase sólida – pela estratégia Fmoc - utilizando a resina Rink Amide MBHA como suporte sólido;
- Realização de análises de inibição do crescimento bacterianos - por meio das diferentes cepas de bactérias. Para esta etapa será realizada:
  - a determinação da concentração ativa da hipericina a ser aplicada na posterior combinação da TFD ao peptídeo;
  - a determinação da concentração do peptídeo capaz de reduzir em 50% (IC<sub>50</sub>) do crescimento bacteriano, bem com a concentração mínima inibitória (MIC);
- Realização dos experimentos de morte bacteriana, com culturas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*
- Verificação do efeito sinérgico, utilizando o software SynergyFinder 2.0 - ocorrerá em duas etapas, sendo elas:
  - o peptídeo será inserido antes da aplicação da luz sobre as bactérias com hipericina;
  - o peptídeo será inserido depois da aplicação da luz e, conseqüentemente, dos efeitos provocados pela TFD;

## 4. Metodologia

### 4.1 Obtenção do peptídeo

Os peptídeos antimicrobianos, utilizados neste trabalho, serão sintetizados no sintetizador automático PS3 Sync, pelo método em fase sólida, na estratégia Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonila), utilizando a resina Rink Amide MBHA (grau de substituição de 0.52 mmol g<sup>-1</sup>) como suporte sólido. Na síntese serão utilizados os agentes acopladores, HBTU/NMM (tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio/N-metilmorfolina), em DMF (dimetilformamida) por 30 minutos. Os acoplamentos serão realizados pelo sintetizador automático.

Os peptídeos serão clivados da resina com uma solução de ácido trifluoroacético (TFA)/anisol/água, em agitação por 2 h, em temperatura ambiente, extraídos com uma solução 60% de acetonitrila (ACN)/H<sub>2</sub>O e então liofilizados.

#### **4.2 Purificação do peptídeo**

A etapa de purificação será realizada em um sistema preparativo de cromatografia líquida semipreparativa (HPLC semiprep), acoplado a um detector UV-Vis, a um coletor de frações e a um registrador. Os solventes utilizados serão de grau HPLC e a água utilizada obtida em um sistema de ultrapurificação de água Elga / Veolia – Mod Option Q7 controlado pelo software Empower Persona Single System.

#### **4.3 Caracterização dos peptídeos**

Os compostos purificados serão caracterizados por HPLC analítico – sistema Waters – e por espectrometria de massas de ionização por electrospray - em um sistema LC/ESI-MS da Agilent.

#### **4.4 Ensaios de atividade antimicrobiana**

Os peptídeos serão testados contra as Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600 e ATCC 29213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e contra as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (BL21), *Enterobacter cloacae* (β-12), *Klebsiella oxytoca* (CIP 79.32) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 e PA14).

##### **Ensaio para determinar a concentração mínima inibitória (CMI)**

Os ensaios para determinar a concentração inibitória mínima serão realizados pelo método da microdiluição<sup>18,19</sup> em placas de 96 poços. Os peptídeos serão adicionados na placa com o meio mínimo BM2 em concentrações entre 0 a 128  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em seguida a bactéria será inoculada em uma concentração final de  $5 \cdot 10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  por poço. As placas serão incubadas a 37 °C por 24 h. A CMI será definida como a menor concentração do composto onde não é observado crescimento. O crescimento bacteriano será medido em um leitor de microplaca

em A 610 nm, depois de 24 h de incubação. Todos os experimentos serão realizados em três triplicatas independentes.

#### **Experimentos de morte bacteriana**

Os experimentos de morte bacteriana serão realizados com diluições 1:100 overnight com culturas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na ausência ou presença de concentrações crescentes do peptídeo (0 - 64  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Após 24h de tratamentos, diluições seriadas de 10 vezes serão realizadas, bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* serão plaqueadas em meio ágar LB e *Pseudomonas Aeruginosa* em ágar de isolamento de *Pseudomonas* e mantidos em crescimento overnight a 37 °C, em seguida serão contadas as unidades de formação de colônias (UFC). Todos os ensaios serão realizados em três triplicatas independentes.

#### **4.5 Verificação do efeito sinérgico**

Para a determinação do potencial efeito sinérgico entre os peptídeos e a TFD, as cepas bacterianas serão submetidas às análises pelo Software *Synergy Finder 2.0*, o qual quantifica o grau de sinergia sobre o efeito multiplicativo de medicamentos únicos de forma independente pelo modelo Bliss. O software indica para cada análise um score, sendo:  $X < -10$  = quando o efeito é antagônico;  $X \leq 10$  ou  $X \geq -10$  = quando o efeito é aditivo e  $X > 10$  = quando há um efeito sinérgico<sup>20</sup>.

Para a verificação do possível efeito sinérgico, serão realizados dois protocolos distintos:

- O peptídeo será inserido antes da aplicação da luz sobre as bactérias com hipericina;
- O peptídeo será inserido depois da aplicação da luz e, consequentemente, dos efeitos provocados pela TFD.

A atividade dos peptídeos contra as diversas cepas de bactérias será testada através de ensaio de concentração inibitória mínima (MIC), a qual será definida como a menor concentração do composto que não é observado crescimento. O crescimento bacteriano será medido em um leitor de microplaca em A 610 nm, depois de 24 h de incubação.

## 5. Viabilidade

Para este projeto, serão usados os seguintes equipamentos e materiais, referentes a cada etapa:

### Síntese do peptídeo:

- sintetizador automático PS3 Sync; resina Rink Amide MBHA; HBTU/NMM (tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio/N-metilmorfolina) e DMF (dimetilformamida).

### Purificação do peptídeo:

- sistema preparativo de cromatografia líquida semipreparativa (HPLC semiprep); sistema de ultrapurificação de água Elga / Veolia – Mod Option Q7.

### Caracterização do peptídeo:

- HPLC analítico; sistema LC/ESI-MS da Agilent.

### Protocolos e ensaios biológicos:

As bactérias utilizadas serão: Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600 e ATCC 29213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e Gram-negativas: *Escherichia coli* (BL21), *Enterobacter cloacae* ( $\beta$ -12), *Klebsiella oxytoca* (CIP 79.32) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 e PA14) e as leituras serão realizadas em leitor de microplaca em A 610 nm.

## 6. Cronograma de atividades

1. Etapa 1: Participação do(a) aluno(a) em estudos dirigidos sobre as principais técnicas empregadas; de seminários semanais do laboratório; levantamento bibliográfico sobre a Terapia Fotodinâmica e Peptídeos Antimicrobianos.
2. Etapa 2: Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos; treinamentos com as culturas de bactérias – etapas a serem realizadas nos laboratórios da UFABC.
3. Etapa 3: Estabelecer e aplicar a metodologia para o crescimento celular das diferentes cepas bacterianas; testar os efeitos do peptídeo e da hipericina separadamente; verificar o sinergismo e definir a metodologia desse estudo; realizar os ensaios em triplicata e elaborar um tratamento estatístico com dados.



4. Etapa 4: Atualizar o levantamento bibliográfico, elaborar o relatório final do projeto; preparar o material para o simpósio da UFABC; compilar os dados para uma futura publicação.

Tabela 1 - Cronograma de atividades previstas

Atividade	3° Quadrimestre / 2022	1° Quadrimestre / 2023	2° Quadrimestre / 2023
Etapa 1	X	X	X
Etapa 2	X	X	
Etapa 3	X	X	X
Etapa 4		X	X

### Referências

1. VINHOTE, J. F. C. et al. Trypanocidal activity of mastoparan from *Polybia paulista* wasp venom by interaction with TcGAPDH. *Toxicon*, v. 137, p. 168–172, 2017.
2. PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, v. 2013, 2013.
3. TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 247, n. April, p. 521–532, 2017.

4. DE LA FUENTE-NUNEZ, C. et al. Next-generation precision antimicrobials: towards personalized treatment of infectious diseases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 37, n. June, p. 95–102, 2017.
5. CRUZ, J. et al. Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 20, p. 2299–2321, 2014.
6. JENSSEN, H. Descriptors for antimicrobial peptides. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 6, n. 2, p. 171–184, 2011.
7. KANG, S.-J. et al. Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of Pharmacal Research*, v. 35, n. 3, p. 409–413, 2012.
8. LING, M.; Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da hipericina e da curcumina em células tumorais, 2016.
9. FREITAS, L. et. al.; Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2, 2018.
10. ALVES, A.C.S. et. al.; Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L, 2014.
11. TOFFOLI, D. et. al.; Estudo Do Complexo Hipericina-európio Para Uso Em Diagnóstico Clínico, 2013.
12. BARBOZA, L. et. al.; Estudo Sobre a Espectroscopia da Hipericina, 2018.
13. FREITAS, L.; Combinação Da Terapia Fotodinâmica A Peptídeos Antimicrobianos: Efeitos E Mecanismos, 2018.
14. DAI, L. et al. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 286, n. 4, p. 820–825, 2001.
15. DAI, L. et al. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 293, p. 1514–1522, 2002.
16. CHEN, C. et al. High Selective Performance of Designed Antibacterial and Anticancer Peptide Amphiphiles. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 7, n. 31, p. 17346–17355, 2015.
17. RINALDI, A. et al; Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles, 2002.

18. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , v. 56, n. 5, p. 2696–2704, maio 2012.
19. WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protocols*, v. 3, n. 2, p. 163–175, jan. 2008.
20. Aleksandr Ianevski, Anil K Giri, Tero Aittokallio, SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies, *Nucleic Acids Research*, Volume 48, Issue W, Pages W488–W493. 2020.