



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

**DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS À
TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus sp.***

JOÃO PESSOA

2019

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

**DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS À
TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Área de Concentração: Biologia Molecular e Estrutural

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Karla Patricia de Oliveira Luna

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F634d Flores, Taylla Michelle de Oliveira.

DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS
À TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp. / Taylla Michelle de
Oliveira Flores. - João Pessoa, 2019.

52 f. : il.

Orientação: Ludovico Migliolo.

Coorientação: Karla Patrícia de Oliveira Luna.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Atividade microbiana. 2. Peptídeos antimicrobianos.
3. Toxina de escorpião. 4. Biofísica computacional. I.
Migliolo, Ludovico. II. de Oliveira Luna, Karla
Patrícia. III. Título.

UFPB/BC

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

Dissertação de Mestrado avaliada em 27/09/2019

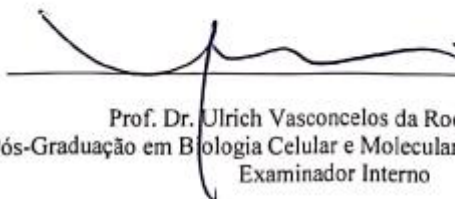
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Karla Patricia de Oliveira Luna
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba
Co-orientadora



Prof. Dr. Edson Luiz Folador
Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

JOÃO PESSOA

2019

“Não desista por causa das críticas.

Aprenda a deixar de lado o que as pessoas que não conhecem você têm a dizer.

Você recebe críticas porque suas atitudes estão atraindo a atenção das pessoas.

Tenha coragem e continue no mesmo caminho.”

(SUNIM, HAEMIN; **As coisas que você só vê quando desacelera**, 2012)

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me capacitar e me fazer chegar até aqui, por cada luta diária e cada aprendizado, por estar sempre me dando suporte e esperança num amanhã melhor. A Nossa Senhora das Graças, Mãezinha querida que sempre me guarda e protege os caminhos a qual venho seguindo, sempre intercedendo por mim ao Pai.

A minha amada família, que sempre esteve aposta ao meu lado, dando suporte e coragem para permanecer lutando pelos meus sonhos. Em especial a minha querida mãezinha Gelciane Libera de Oliveira, se não fosse por ela eu não estaria aqui hoje, não só a responsável pela minha existência e educação, mais principalmente por me dar forças e acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava mais, obrigada por sempre estar ao meu lado encorajando as minhas loucuras, chorando minhas derrotas e principalmente comemorando minhas conquistas. Obrigada ao meu pai Luiz Ivanir Flores (*in memoriam*), se sou quem sou hoje devo a você, me inspiro todos os dias na pessoa batalhadora que fostes, e espero algum dia ser um pouco do que foi em vida, te dedico cada conquista alcançada. Aos meus irmãos, agradeço a paciência nos dias mais difíceis, em especial Erika Hayssa Rodrigues, minha caçulinha teimosa e briguenta, obrigada por me ouvir com atenção e cuidado, e sempre estar ao meu lado acreditando no meu melhor. Aos meus avós, por todo amor, amparo e orações, em especial as minhas avós Eneli de Oliveira e Deolinda Flores.

Ao meu querido Orientador Ludovico Migliolo, um verdadeiro pai da ciência em minha vida. Obrigado por acreditar no meu potencial e sempre me desafiar a ser melhor do que ontem, obrigada por cada ensinamento, pela paciência e cada puxão de orelha. Não só um orientador excepcional, mais também uma pessoa pela qual tenho grande inspiração como profissional que almejo ser algum dia. A minha co-orientadora Karla Patricia de Oliveira Luna, por todo conhecimento compartilhado, auxílio em meu mestrado e amizade.

Aos meus amigos e companheiros, Mari Ortiz, Camila Lira, Valentina Lira, Gabriela Lira, Bibiane Zenatti, Ana Paula Teodoro, Lilyce Fernandes Carneiro, Celly Reis, Junior Alberto Buriol, Joana Skoldberg, Jaminny Marques, Virginia Caiubí, que se mantiveram presentes nos dias bons e ruins dessa caminhada, sempre me dando força e coragem para prosseguir lutando, uma verdadeira família que Deus me permitiu escolher.

Aos meus amigos que a Paraíba e este mestrado me deram a oportunidade de conhecer e mudar a minha vida. A Anderson dos Santos, Zhilbelly Nunes, Beatriz Dantas obrigada por

todos os dias de luta que tivemos, cada lagrima e sorriso, por me apresentarem tudo de maravilhoso que este estado tem a oferecer, saio daqui com o coração partido, pois um pedaço dele sempre será paraibano. Em especial a Álisson Emmanuel Franco, meu primeiro amigo aqui na Paraíba, que se mostrou um anjo de Deus, sempre apostado a me ajudar e ensinar algo novo, obrigada meu amigo, sua amizade será levada em meu coração por onde eu for nesta vida. A minha amiga, colega e companheira de casa Ellynes Nunes, uma grande mulher e amiga que sempre esteve ao meu lado ajudando e mostrando o melhor deste lugar, parceira de filmes, novelas e descontrações e principalmente uma ótima conselheira. Aprendi muito com nossa vivencia e sempre levarei você, nossa amizade e aventuras em meu coração. Ao meu companheiro, Huzevelt Guimarães, obrigada por todo apoio e força que vem me dando, e por sempre acreditar no meu melhor e incentivar cada vez mais os meus ideais. A Regina Emmy, secretaria do PPGBCM, obrigada por sempre estar aposta a nos ajudar a qualquer momento.

A todas as pessoas que conheci durante essa jornada, em especial Miguel Andrade, Ana Carolina Alves Barbosa e família, Ana Paula Boleti, Patricia Souza Silva, dentre varias outras que cruzaram o meu caminho ate aqui, obrigada pela força e alegria que trouxeram para os meus dias mais difíceis, vocês são anjos de Deus em minha vida. A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova / Biotech da Universidade Católica Dom Bosco, obrigada por tudo, se não fosse o empenho e ajuda de vocês esse trabalho não existiria. As minhas Mães da Ciência, e eterna inspiração, Liliam Cândido e Jannaina Velasques, vocês me ensinaram muito do que sei hoje e principalmente acreditaram no meu potencial, vocês são verdadeiros exemplos de mulheres na ciência que pretendo seguir em minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado. Agradeço à Universidade Federal da Paraíba por me acolher como aluna durante a realização deste mestrado.

RESUMO

A alta incidência de infecções hospitalares, juntamente com o aumento exponencial de resistência bacteriana a múltiplas drogas, tem tornado necessária à busca de novas ferramentas para o controle desses patógenos. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e estudo dos peptídeos butylatus-1, -2 e -3, que foram racionalmente projetados com base no peptídeo de escorpião *Tityus serrulatus*, TsAP-1, a fim de aumentar a atividade bactericida com diminuição da citotoxicidade. Os peptídeos análogos foram obtidos por meio de modificações pontuais de resíduos de aminoácidos baseados no padrão anfipático **HHh⁺H** (h⁺: resíduos de aminoácidos hidrofílicos com carga positiva; H: resíduos de aminoácidos hidrofóbicos) encontrado no peptídeo parental de TsAP-1, reduzindo assim a hidrofobicidade e aumentando tanto o momento hidrofóbico como a carga líquida de cada sequência. Observou-se que o conteúdo helicoidal também aumentou, favorecendo o aumento da anfipacidade das moléculas. Em relação às suas atividades biológicas, observou-se que o peptídeo parental, TsAP-1, não apresentou atividade antibacteriana na maior concentração testada. Em contraste, os análogos butylatus-1 e -2 foram capazes de inibir linhagens de *Escherichia coli* suscetível e *Enterococcus faecalis* a 5,3 e 43,1 µM, respectivamente. Contudo, o potencial antibacteriano do análogo do butylatus-3 foi seletivo para *E. coli* KpC, a 39,6 µM. Em termos de propriedades hemolíticas, apenas o butylatus-2 apresentou hemólise celular a 43,1 µM. Apesar dos dados relatados sobre o bom desempenho dos peptídeos análogos, o butylatus-1 destacou-se como um excelente candidato no desenvolvimento de uma nova alternativa contra infecções causadas por bactérias patogênicas, devido ao seu alto potencial de ação bactericida em baixas doses e por não ser citotóxico para células eucarióticas.

Palavras-chave: Atividade microbiana. Peptídeos antimicrobianos. Toxina de escorpião. Biofísica computacional.

ABSTRACT

The high incidence of nosocomial infection, along with the advents of bacterial resistance to multiple drugs has increased exponentially, making it necessary the search for new tools to control these pathogens. The present study focuses on the development of butylatus-1, -2 and -3, which were rationally designed based on a scorpion's peptide from *Tityus serrulatus*, named TsAP-1, in order to increase the bactericidal activity with a decrease in cytotoxicity. The analogue peptides were obtained through the punctual modification of amino acid residues based in an amphipathic pattern **HHh⁺H** (h⁺: positively charged hydrophilic amino acid residues; H: hydrophobic amino acid residues) found in the TsAP-1 parental peptide, thereby reducing hydrophobicity and increasing both hydrophobic moment and net charge. It was observed that the helical content also increased, promoting the increase in amphipacity of the analogue peptides. Regarding their biological activities, it was observed that the parental peptide TsAP-1 did not present antibacterial activity at the maximal concentration range tested. In contrast, the analogues butylatus-1 and -2 were capable of inhibiting susceptible *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* at 5.3 and 43.1 μ M respectively. Interestingly, the antibacterial potential of the butylatus-3 analogue was selective to *E. coli* KpC, at 39.6 μ M. In terms of hemolytic properties, only butylatus-2 presented cellular hemolysis at 43.1 μ M. Despite the reported data on the good performance of analogue peptides, butylatus-1 stands out as an excellent candidate in the development of a new alternative against infections caused by pathogenic bacteria, due to the high action potential of at low dosages and not shown hemolysis.

Key words: Microbian activity. Antimicrobial peptide. Scorpion toxin. Computational biophysics

LISTA DE ABREVIATURAS

BPPs - Peptídeos potencializadores de bradicinina
CASP - Critical Assessment of protein Structure Prediction
CBM - Concentrações Bactericidas Mínimas
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM - Concentração Inibitória Mínima
ESBL - Beta-lactamases de espectro estendido
DM - Dinâmica molecular
DPPE - 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG- 1,2-Dipalmitosil-glicero-3-fosfatidilglicerol
Fmoc - fluorenilmetiloxycarbonilo
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
KpC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
KTx - Toxinas de canal de potássio
LPS - Lipopolissacarídeos
MC - Modelagem comparativa
MH - Mueller-Hinton
MM – Modelagem Molecular
NaTx - Toxinas de canal de sódio
PAM - Peptídeos antimicrobianos
PDB - Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*)
RMN - Ressonância magnética nuclear
RMSD - Root Mean Square Deviation
Ts - Tityustoxina
TFA - trifluoroacético
3D - Tridimensionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de seleção e resistência bacteriana.	14
Figura 2 - Mecanismos de ação de PAM na membrana bacteriana	17
Figura 3 - (A) Representação esquemática das estruturas morfológicas do corpo de um escorpião-amarelo (<i>Tytilus serrulatus</i>). (B) Sensilas em fenda compostas localizadas no basitarso das pernas que permitem a captura de ondas da superfície.....	22
Figura 4 - Diagrama de hélice para o peptídeo parental e seus análogos.....	32
Figura 5 - Gráfico de Ramachandran para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos de escorpiões, sua carga líquida e ação biológica.....	20
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e previsão antimicrobiana de butylatus-1, -2 e -3 e seu peptídeo parental.	334
Tabela 3 - Estruturas tridimensionais construídas pelo servidor I-TASSER para o peptídeo controle e seus análogos. Visualizado pelo programa PyMol.	37
Tabela 4 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e *Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) obtidas usando TsAP-1 e seus análogos butylatus-1, -2 e -3, testados em modelos específicos de microrganismos e de atividade hemolítica com eritrócitos de murinos.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. O combate às infecções e o surgimento das resistências aos antibióticos	13
2.2. Peptídeos Antimicrobianos como uma nova alternativa ao combate de infecções	15
2.3. Estrutura molecular dos PAM e sua interação com estruturas biológicas.....	18
2.4. Biologia dos escorpiões e sua relação com PAM	21
2.5. Desenho Racional e Modelagem Molecular no desenvolvimento de moléculas bioativas	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Geral:.....	27
3.2. Específicos:.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Desenho racional de peptídeos análogos de TsAP-1.....	27
4.2. Modelagem Molecular.....	28
4.3. Síntese e Quantificação	28
4.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	29
4.5. Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	29
4.6. Ensaio Hemolítico	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Desenho racional, sínteses e modelagem dos análogos de TsAP-1	31
5.2. Concentração mínima inibitória (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e Ensaio hemolítico.....	37
6. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, melhorias na prevenção e no tratamento de infecções nosocomiais (hospitalares) têm sido de grande importância para redução da morbidade e mortalidade, buscando uma melhor qualidade e expectativa de vida para população mundial. As infecções hospitalares têm sido um problema emergente, já que os antibióticos atuais estão perdendo sua eficiência e o número de mortes está aumentando exponencialmente e significativamente todos os dias. O uso excessivo de antibióticos levou ao surgimento de bactérias multirresistentes que ameaçam a saúde humana (GURGEL; CARVALHO, 2008; PEREIRA *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2016; WANNMACHER, 2004).

Peptídeos antimicrobianos (PAM) são amplamente distribuídos na natureza, e aparecem como uma alternativa útil, pois são peptídeos curtos com atividade bacteriostática e/ou bactericida contra microrganismos patogênicos, nos quais podem ser usados para controlar infecção nosocomial (HARRISON *et al.*, 2014; YEAMAN; YOUNT, 2003). Ao analisar os PAM com diferentes conformações químicas e estruturais, parâmetros físico-químicos e diferentes mecanismos de ação, os PAM tornam-se potenciais candidatos aos tratamentos antifúngicos, antivirais, antiparasitários e especialmente antibacterianos (SADREDINAMIN *et al.*, 2016).

A maioria dos PAM descritos na literatura costumam ser catiônicos e contendo resíduos de aminoácidos hidrofílicos (resíduos de arginina ou lisina, carregados positivamente) e resíduos hidrofóbicos (alanina, fenilalanina, leucina entre outros). Além disso, os PAM são geralmente isolados de organismos naturais, incluindo insetos, plantas, microrganismos e toxinas de animais, como as toxinas de escorpiões. Estudos recentes demonstraram que as toxinas de escorpião têm propriedades biológicas eficientes contra os canais iônicos, inibidores, mediadores da dor, células tumorais, fungos e bactérias (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2013; KING; HARDY, 2013; LUNA-RAMÍREZ *et al.*, 2013).

Na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, o peptídeo TsAP-1 possui 17 resíduos de aminoácidos, carga de +1, hidrofobicidade de 78% e massa molecular de 1161,94 Da. O TsAP-1 apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (120 µM), *Escherichia coli* (160 µM) e *Candida albicans* (160 µM); e baixa atividade hemolítica (6,48%) na concentração máxima testada (GUO *et al.*, 2013). Estas características físico-químicas observadas no peptídeo antimicrobiano TsAP-1 são interessantes do ponto de vista

biotecnológico devido a possibilidade de melhorar as atividades com a síntese de peptídeos análogos.

A metodologia do desenho racional de fármacos é uma importante ferramenta biotecnológica, a qual utiliza parâmetros físico-químicos e modelos tridimensionais para melhorar a atividade de peptídeos nativos contra microrganismos patogênicos (MIGLIOLO *et al.*, 2012, 2016). Para isso, técnicas e procedimentos como modelagem molecular, *docking* e dinâmica molecular são usadas para estudos de interações moleculares com grande eficácia, desenvolvendo protótipos bioinspirados (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016; VERLI, 2014). Assim, o objetivo deste trabalho é utilizar a metodologia do desenho racional para construir peptídeos análogos baseados na toxina TsAP-1 de *Tityus serrulatus* com atividade contra microrganismos patogênicos.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1.O combate às infecções e o surgimento das resistências aos antibióticos

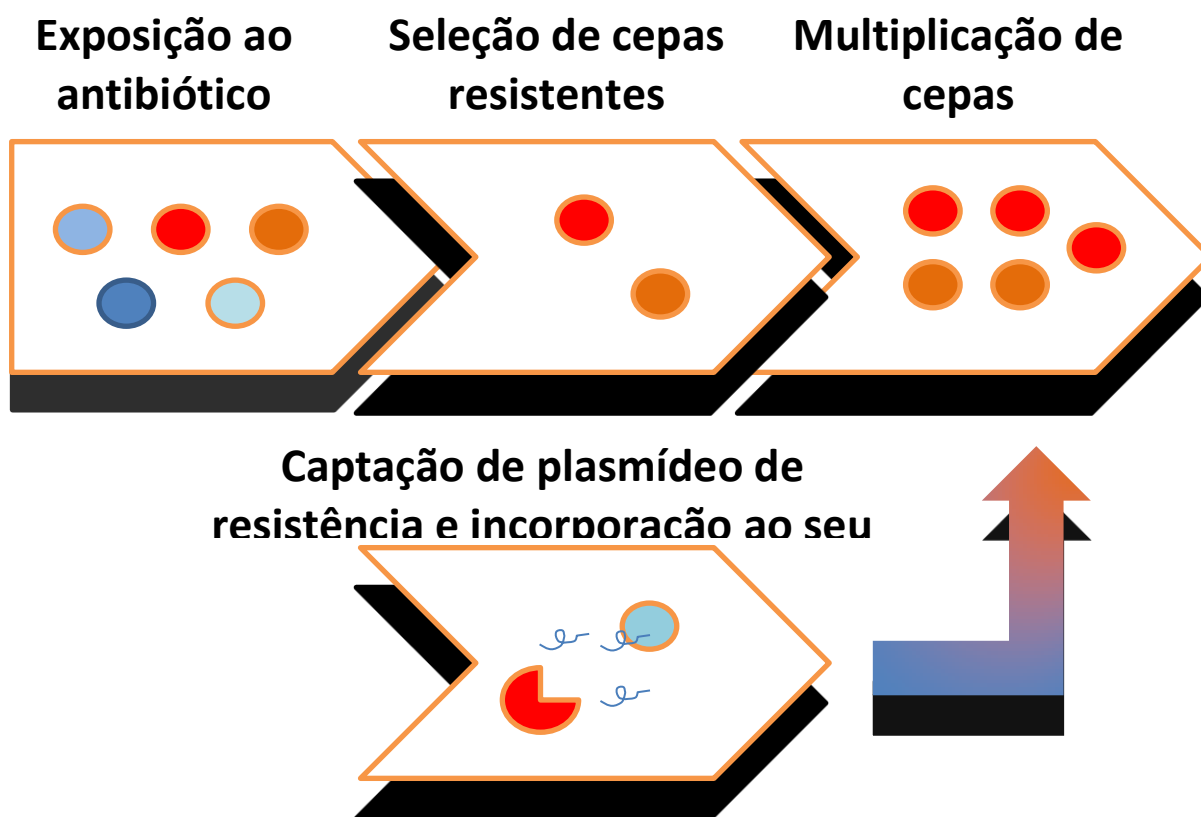
O alto índice de infecções hospitalares tem sido alarmante e vem atraindo a atenção de estudiosos de comunidades médicas, organizações de saúde e governos. Dentre os vários tipos de infecções hospitalares, as infecções bacterianas destacam-se, preocupando os pesquisadores, pois o índice de resistência bacteriana vem aumentando exponencialmente e elevando significativamente o número de óbitos em hospitais (GURGEL; CARVALHO, 2008; PEREIRA *et al.*, 2005; WANNMACHER, 2004). Estima-se que, em breve, estaremos sem condições de tratar essas infecções devido ao fato de não termos mais opções para deter sua resistência e multiplicação (VIANNA *et al.*, 2016).

Microrganismos podem expressar mecanismos de resistência naturais (intrínseca) de um gênero ou espécie bacteriana, como também podem expressar resistência adquirida, isto é, resistência advinda de mutações gênicas ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias, determinando o funcionamento dos mecanismos de resistência, maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antibiótico (Figura 1) (ANDRADE; DARINI, 2018; OLIVEIRA; LACERDA, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017). Essa resistência é dada por diferentes vias: produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos; redução da permeabilidade da membrana externa; sistema de bomba de efluxo ativo; alteração, bloqueio ou proteção do sítio alvo (de ligação) do antibiótico (BLAIR *et al.*, 2015). Todos esses processos impossibilitam a atividade farmacológica,

favorecendo a sobrevivência e resistência bacteriana (GONZÁLEZ-CANDELAS *et al.*, 2011).

Desta forma, os antibióticos tem cada vez menos ação sobre estes microrganismos. Isso vem de encontro com o surgimento de linhagens resistentes a vários tipos de antibióticos (CONWELL *et al.*, 2017; KITAGAWA *et al.*, 2016; TRINDADE *et al.*, 2015), como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BROWN; WRIGHT, 2016; HUIJBERS *et al.*, 2015; RTIMI *et al.*, 2015; STRYJEWSKI; JONES; COREY, 2015), resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, que são atualmente, microrganismos muito nocivos à saúde dos pacientes imunossuprimidos em ambientes hospitalares (BLAIR *et al.*, 2015).

Figura 1 - Mecanismos de seleção e resistência bacteriana: círculos com cores vermelhas e laranjas são as linhagens resistentes a antibióticos, os círculos azuis representam as linhagens suscetíveis a antibióticos.



Fonte: Lucas Bianchi, 2016.

As beta-lactamases pertencem ao principal grupo de enzimas que degradam antibióticos inativando-os por meio da catálise hidrolítica do anel beta-lactâmico das

moléculas desses medicamentos, levando à perda da ação do antimicrobiano sobre a bactéria que continua fazendo a biossíntese de sua parede celular (RICE, 2012). As beta-lactamases são divididas em dois grandes grupos, serina beta-lactamases: com um aminoácido serina no sítio catalítico das enzimas; e as metalo-beta-lactamases: que necessitam de um metal como co-fator para a atividade catalítica (CATTOIR, 2016; RICE, 2012). O critério de classificação utilizado dentro desse grupo é baseado no potencial de degradação crescente e associado a cada classe ou subclasse de beta-lactâmico, sendo esses: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (FISHER; MOBASHERY, 2016; MELETIS, 2016).

Dentre as classes citadas, as carbapenemases se destacam, como beta-lactamases de maior potencial de degradação de carbapenêmicos (MELETIS, 2016). Essas enzimas são codificadas tanto por genes cromossômicos como por plasmídeos, contudo as carbapenemases adquiridas por plasmídeos se destacam na disseminação da resistência bacteriana (CANTÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2011; MELETIS, 2016; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Alguns estudos mostraram que serino-carbapenemases tem potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, dentre estes, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KpC) se destaca em diversos gêneros ou espécies de bacilos Gram-negativos, não sendo exclusivo de *K. pneumoniae* (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Visando obter novas ferramentas para o tratamento de infecções bacterianas, os Peptídeos Antimicrobianos (PAM) surgem como uma alternativa proveitosa e inovadora.

2.2. Peptídeos Antimicrobianos como uma nova alternativa ao combate de infecções

Os PAM são peptídeos que exercem atividade bacteriostática, bactericida, lise celular, prevenção contra biofilmes, entre outras, os quais podem ser usadas para o controle de infecções microbianas. Para promover a ação antimicrobiana descrita, o PAM interage com a membrana da célula alvo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (HARRISON *et al.*, 2014; POWERS; HANCOCK, 2003). Analisando a estrutura, natureza e diversidade dos PAM, observou-se que além de atividade contra bactérias, eles demonstraram características antifúngicas (LI *et al.*, 2016; LUPETTI *et al.*, 2008) e antiparasitários (ROUSSILHON *et al.*, 2017; SAMY, 2017), podendo se estender ao

tratamento de câncer (DESLOUCHES; DI, 2017) e infecções virais (METHATHAM *et al.*, 2017; SADREDINAMIN *et al.*, 2016).

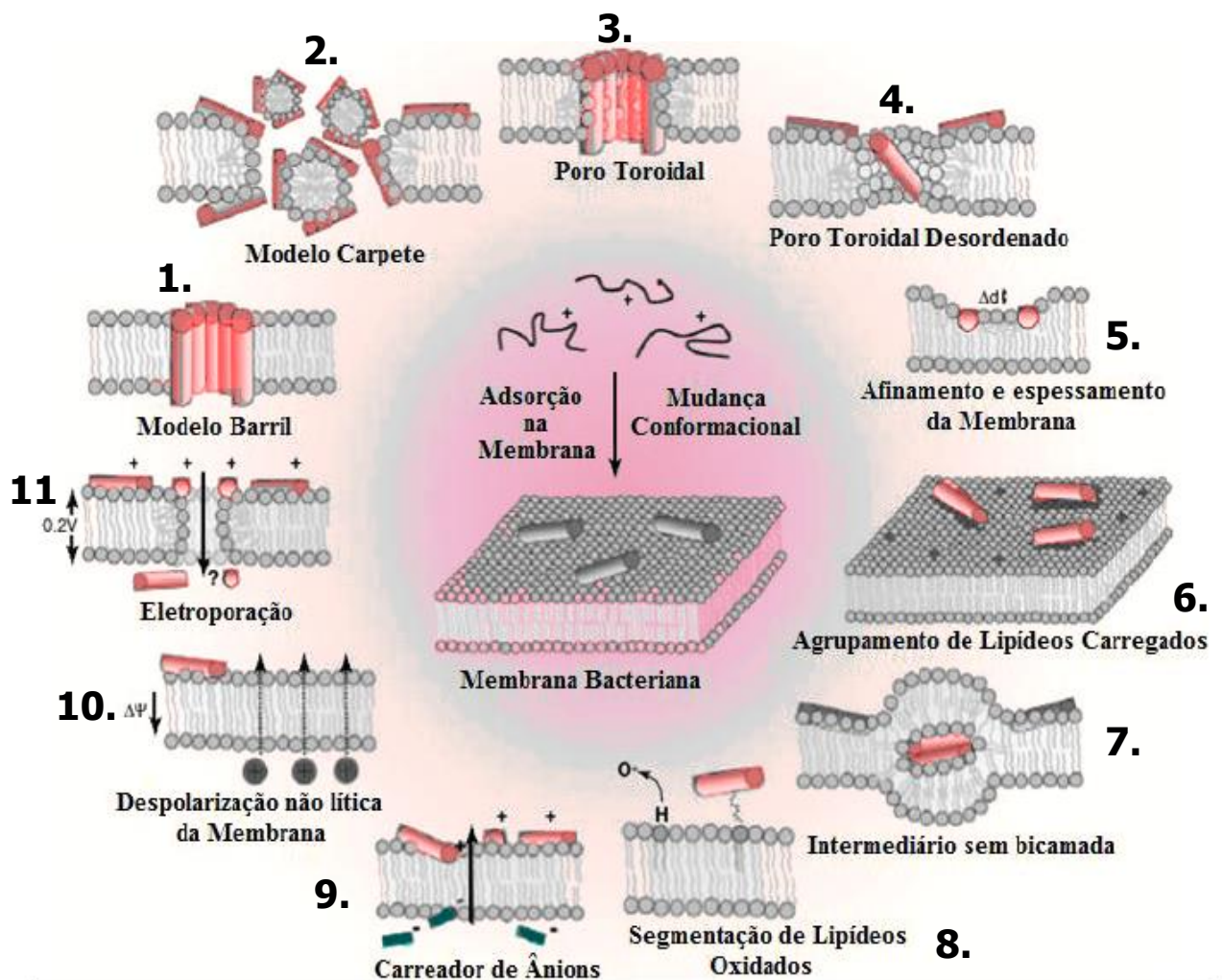
Uma das principais interações dos PAM se dá nas membranas de bactérias, fungos, protozoários, vírus e tumores, interagindo principalmente com a membrana externa. Após o PAM se fixar na membrana inicia-se a desestabilização da parede microbiana por meio da formação de poros ou atividade de enfraquecimento da membrana. As formas de atuação dos peptídeos na membrana bacteriana foram estudadas ao longo do tempo, e por meio disso, elucidadas várias maneiras de interação peptídeo-membrana (CALISKAN *et al.*, 2013; TARAZI, 2015).

Os padrões clássicos de atuação do peptídeo, ao se encontrar com a membrana, são classificados como: modelo barril, modelo carpete, poro toroidal, poro toroidal desordenado, afinamento e espessamento da membrana, agrupamento de lipídeos carregados, intermediário sem bicamada, segmentação de lipídeos oxidados, carreador de ânions, despolarização não lítica da membrana e eletroporação (Figura 2) (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Para padrões clássicos de ruptura de membrana, os peptídeos se encontram com a membrana interagindo de maneira a promover um limiar de concentração formando poros no modelo barril (Figura 2.1.), ou podendo solubilizar a membrana em estruturas de micelas no modelo carpete (Figura 2.2.), ou formar poros peptídeo-lipídeo como é o padrão poro toroidal (Figura 2.3.). No modelo de poro toroidal desordenado, a formação de poros é, de certa forma, aleatória e envolve um número menor de peptídeos (Figura 2.4.). A espessura da bicamada de fosfolipídios pode ser perturbada pela existência de peptídeos (Figura 2.5.), ou a própria membrana pode ser constituída de modo a formar domínios ricos em lipídeos aniônicos (Figura 2.6.). Em poucos casos, a bicamada sem intermediários pode ser induzida (Figura 2.7.); peptídeos podem ser adsorvidos pela membrana bacteriana por segmentação de lipídios oxidados (Figura 2.8.); peptídeos podem induzir pequenos ânions por meio da bicamada, resultando no efluxo (Figura 2.9.), e o potencial de membrana pode ser dissipado sem outro dano aparente (Figura 2.10.); também podemos observar inversamente, no modelo molecular de eletroporação, a acumulação de peptídeo na monocamada externa que aumenta o potencial da membrana a um limiar que torna a membrana porosa a transitoriedade de várias moléculas, incluindo o peptídeo que causou este efeito (Figura 2.11.) (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Contudo, Powers e Hancock (2003), demonstraram que a capacidade antimicrobiana dos peptídeos se dá pela combinação de cationicidade, hidrofobicidade, conformação da estrutura secundária, anfipacidade e ângulo polar (DE MELO *et al.*, 2015; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Para tanto, características estruturais e eletrostáticas precisam ser consideradas, pois a mudança em alguma característica do peptídeo acarreta mudanças no corpo e na sua atividade antimicrobiana (MIGLIOLO *et al.*, 2016; POWERS; HANCOCK, 2003).

Figura 2 - Mecanismos de ação de PAM na membrana bacteriana



Fonte: NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011 (Adaptado).

2.3.Estrutura molecular dos PAM e sua interação com estruturas biológicas

Peptídeos antimicrobianos são moléculas anfipáticas, que variam de 12 a 50 aminoácidos em sua sequência primária, dentre os quais possuem como características marcantes sua alta taxa de resíduos hidrofóbicos (40-75%) e carga líquida positiva (+2 a +7), estas características físico-químicas permitem que os PAM se dobrem em estruturas secundárias anfipáticas com os resíduos hidrofóbicos localizados em um lado da molécula e os resíduos catiônicos e polares aparecendo na face oposta (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). O momento hidrofóbico está correlacionado ao aumento da toxicidade contra células que possuem em sua composição fosfolipídios neutros (YEAMAN; YOUNT, 2003). Já a carga líquida positiva favorece a interação entre os peptídeos e fosfolipídios ácidos ionizados, os quais são presentes em membranas bacterianas (DATHE; WIEPRECHT, 1999). Com isso, alguns estudos mostram que incisões de lisina no início de sequências peptídicas podem favorecer a interação eletrostática com membranas fosfolipídicas e podendo causar desestabilização da membrana, como já é observada para alguns peptídeos antimicrobianos (KIM; CHA, 2010; STRÖMSTEDT *et al.*, 2010). Contudo o excesso de cationicidade pode ser citotóxico e hemolítico bem como diminuir a ação antimicrobiana dos peptídeos (DATHE; WIEPRECHT, 1999).

Já a hidrofobicidade se relaciona intimamente com a citotoxicidade de células de mamíferos, bactérias Gram-positivas e diminuição de atividade para bactérias Gram-negativas (DATHE; WIEPRECHT, 1999). Para isso, Dathe *et al.*, (1997) sugerem que interações peptídeo-membrana são determinadas por um equilíbrio sensível de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Com isso, espera-se que o reforço de interações eletrostáticas através da modificação da carga líquida positiva, juntamente com a conservação da anfipacidade, melhore a atividade antibacteriana e sua seletividade procariótica (DATHE *et al.*, 1997).

As classificações dos PAM são baseadas em: maquinaria biosintética, fontes biológicas, funções biológicas, propriedades moleculares, estruturas tridimensionais, padrões de ligação covalente e alvos moleculares (WANG, 2015). De acordo com a maquinaria biosintética, os peptídeos podem ser classificados como codificados por genes e não codificados por genes. Já com base nas fontes de origem biológica, os PAM podem ser classificados como advindos de plantas, animais ou bacterianos. Em relação as funções biológicas, os PAM podem ser classificados como antibacterianos, antifúngicos, antivirais,

antiparasitas, anticancerígenos, anti-protistas, inseticidas, espermicidas, quimiotáticos, antioxidantes e inibidores de peptidase (SADREDINAMIN *et al.*, 2016; WANG, 2010, 2015). Já para as estruturas tridimensionais, os PAM são classificados em quatro famílias: α -hélice, β -folha, estendida e loop (CARDOSO, GABRIELE DE AZEVEDO, 2017). Na ausência de informações estruturais tridimensionais (3D), os PAM podem ser classificados de acordo com as propriedades físico-químicas, como carga líquida e hidrofobicidade (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Sistemas de classificação universal também podem ser utilizados, de acordo com os padrões de ligação covalente, sugerindo quatro classes de peptídeos antimicrobianos: peptídeos lineares de uma cadeia (ex.: LL-37 e magaininas) ou dois peptídeos lineares sem ligação covalente; peptídeos ligados a cadeias laterais (ex.: defensinas contendo dissulfeto), podendo ocorrer dentro de uma única cadeia peptídica ou entre cadeias peptídicas distintas; cadeias polipeptídicas com uma ligação de cadeia lateral dos esqueletos das sequências; polipeptídios circulares com uma ligação peptídica entre as extremidades, encontrados em bactérias (ex.: AS-48), plantas (ex.: ciclotídeos) e animais (ex.: theta-defensinas) (SADREDINAMIN *et al.*, 2016; WANG, 2015). Os PAM podem ser classificados em duas famílias com base nos alvos moleculares: peptídeos de direcionamento da superfície celular (ex.: nisin e temporinas) que incluem tanto peptídeos de segmentação por membrana quanto não segmentados por membrana ou peptídeos de direcionamento intracelular que podem ser adicionalmente classificados com base nas moléculas alvo (SADREDINAMIN *et al.*, 2016; WANG, 2010, 2015; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Em organismos eucariotos, os PAM constituem importantes componentes da imunidade inata, protegendo o hospedeiro contra infecções. Em contraste, as bactérias produzem PAM para eliminar outras bactérias que competem pelo mesmo nicho ecológico (HASSAN *et al.*, 2012). Muitos PAM exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana que inclui bactérias Gram-positivas e -negativas, bem como fungos, vírus e protozoários unicelulares (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Além de ter uma atividade antimicrobiana, vários PAM demonstram capacidade de modular as respostas imunes inatas do hospedeiro e, assim, indiretamente, promover a depuração de patógenos (HANCOCK; SAHL, 2006; YEUNG; GELLATLY; HANCOCK, 2011).

A ampla distribuição e abundância de PAM em todos os organismos multicelulares ressalta seu papel crítico na imunidade inata (HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012; ZASLOFF, 2002). Os PAM são sintetizados em vários organismos, tais como serpentes, lagartos, anuros e escorpiões (HARRISON *et al.*, 2014, 2016; HEINEN *et al.*, 2014; LADRAM; NICOLAS, 2016; VAN HOEK, 2014). Estudos recentes apresentam que as toxinas de escorpiões possuem propriedades biológicas eficientes contra bactérias, fungos, células tumorais, inibição de canais iônicos e mediadores da dor (Tabela 1) (CALISKAN *et al.*, 2013; KING; HARDY, 2013; QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Resumo dos peptídeos naturais de escorpiões, sua carga líquida e ação biológica.

Escorpião	Peptídeo	Carga	Atividade biológica	Referencial teórico
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-1	+1	Anti-Gram+, antifúngica, antitumoral	GUO et al.,(2013)
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-2	+1	Anti-Gram+, antifúngica, antitumoral	GUO et al., (2013)
<i>Scorpiops tibetanus</i>	StCT1	+1	Anti-Gram+	YUAN et al., (2010)
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-2	+1	Anti-Gram+, Gram-, antifúngica	ZENG et al., (2013)
<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKbpp	+7	Anti-Gram+, Gram-, antifúngica, hemolítica	XU et al., (2014)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP1	+2	Anti-Gram+, antifúngica, antitumoral	DU et al., (2015)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP2	+2	Anti-Gram+, antifúngica, antitumoral	DU et al., (2015)
<i>Tityus discrepans</i>	Bactridine 1	+2	Anti-Gram+ e Gram-	DÍAZ et al., (2009)
<i>Tityus stigmurus</i>	Stigmurin	+1	Anti-Gram+, antifúngico, hemolítica, antitumoral	DE MELO et al., (2015)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT1	+2	Anti-Gram+ & Gram-	RAMÍREZ-CARRETO et al., (2012)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT2	+2	Anti-Gram+ & Gram-, hemolítica	RAMÍREZ-CARRETO et al., (2012)
<i>Chaerilus tricoatus</i>	Ctriporin	+3	Anti-Gram+, antifúngica	FAN et al., (2011)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1036	+1	Antiviral	HONG et al., (2014)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1239	+1	Antiviral	HONG et al., (2014)

Fonte: Banco de dados *on-line* Antimicrobial Protein Data Bank e Med-Line.

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

2.4. Biologia dos escorpiões e sua relação com PAM

Com a expansão das cidades e regiões metropolitanas, vem se tornando comum o aparecimentos de diversos tipos de artrópodes, entre eles a uma grande incidência de escorpiões em ambientes urbanos tais como casas, construções, e terrenos (SISSOM, 2019). Há a adaptação desses indivíduos aos mais diversos tipos de habitats terrestres, podendo ser encontrados em ambientes, climas e altitudes variadas. A sua incidência vai desde desertos às florestas tropicais, do nível do mar a altitudes de até 4.400 metros, e principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (BRASIL., 2009).

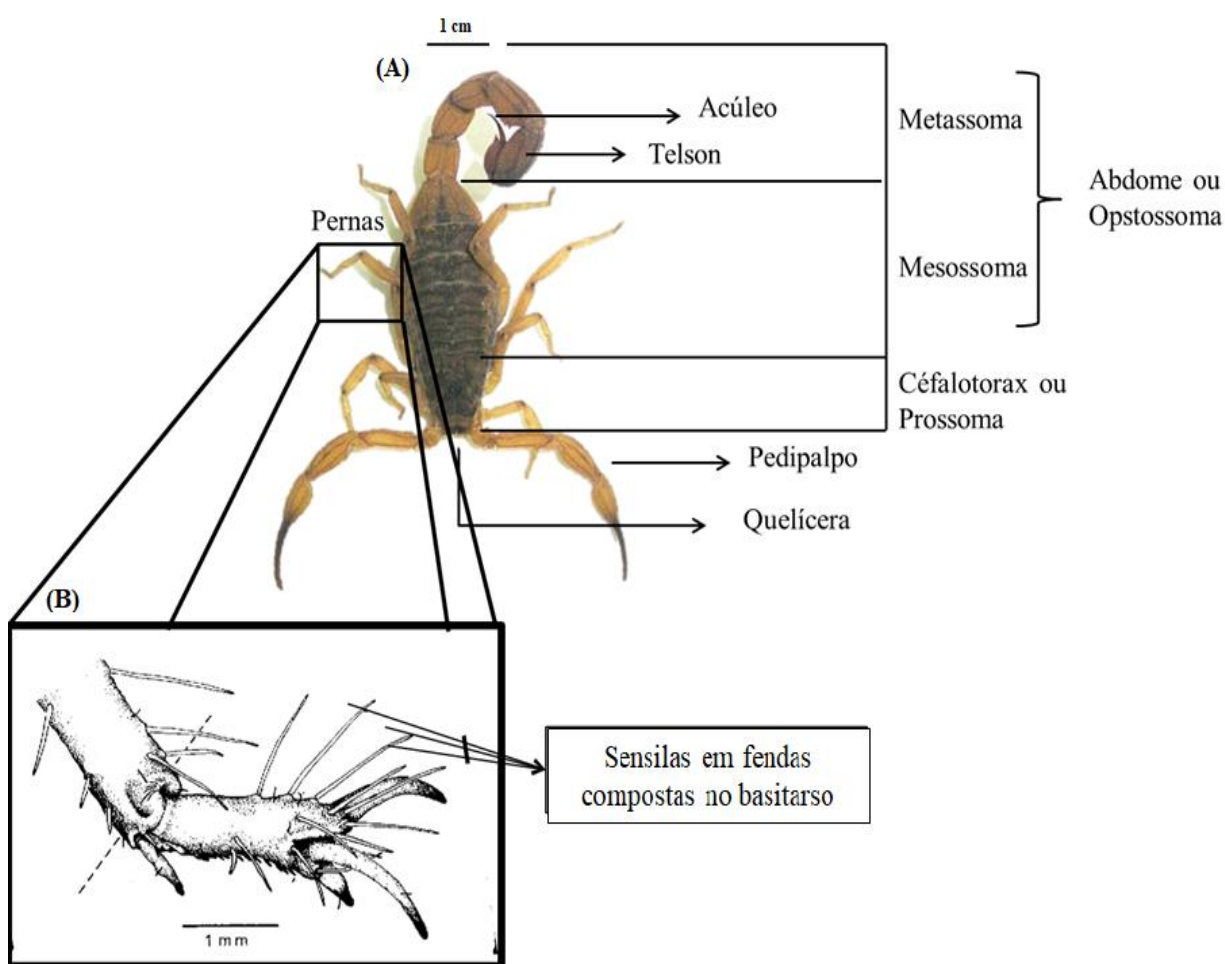
Escorpiões são artrópodes quelicerados, pertencentes ao Filo Arthropoda (*arthro*: articuladas/ *podos*: pés), classe Arachnida (por terem oito pernas) e ordem Scorpiones. A sua denominação é oriunda do latim *scorpio/ scorpionis* (KOVAŘÍK *et al.*, 2016). Uma característica marcante desses indivíduos é a presença de sensilas em fenda compostas localizadas no basitarso das pernas que permitem a captura de ondas da superfície geradas pelos movimentos dos insetos, facilitando a localização e captura de suas presas (Figura 3B). Há relatos da existência dos escorpiões a mais de 400 milhões de anos. Sendo caracterizados como seres de alta capacidade evolutiva, sobrevivendo aos grandes cataclismos planetários (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016; KOVAŘÍK *et al.*, 2016; SISSOM, 2019).

No mundo, são conhecidas 2367 espécies de escorpiões, sendo que somente 25 apresentam importância clínica por causa de suas toxinas. Já no Brasil, há a incidência das famílias Bothriuridae, Chactidae, Liochelidae e Buthidae. (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016; KOVAŘÍK *et al.*, 2016; SISSOM, 2019). Dentro da família dos Buthidae, possuem espécies dentro dos gêneros *Tityus*, *Centruroides* e *Isometrus*, que são dotados de alta capacidade de adaptação (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2013; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016).

Um gênero predominante no Brasil é o *Tityus*, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. Uma característica específica desse gênero é a presença de um espinho sob o ferrão localizado no télson. *Tityus serrulatus*, conhecido popularmente como “escorpião-amarelo” (Figura 3A), é responsável pela maioria das causas de acidentes escorpiônicos no Brasil sendo causador de grande parte dos óbitos em crianças e idosos por envenenamento de peçonha de escorpião. Como características morfológicas possuem pernas e caudas amareladas e o tronco escuro, e serrilhas no 3º e 4º anel da cauda, o que dá nome a espécie,

podendo medir até 7 centímetros de comprimento. Além disso, reproduz-se por partenogênese, não precisando, necessariamente, de um macho para reprodução, tendo dois partos, em média por ano com 20 filhotes cada (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016; KOVAŘÍK *et al.*, 2016; RATES *et al.*, 2008; SISSOM, 2019).

Figura 3 - (A) Representação esquemática das estruturas morfológicas do corpo de um escorpião (*Tythus serrulatus*). **(B)** Sensilas em fenda compostas localizadas no basitarso das pernas que permitem a captura de ondas da superfície.



Fonte: BORTOLUZZI *et al.*, 2007 (Adaptado).

A peçonha dos escorpiões apresenta aspectos opalescentes e leitosos, sendo constituído por muco, proteínas básicas neurotóxicas, nucleotídeos, aminoácidos e enzimas. Estas características os capacitam a serem bons caçadores e garantem defesa contra possíveis predadores (RATES *et al.*, 2008). Sua composição pode variar de acordo com a presa do escorpião, região geográfica e variações genéticas (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2013; RATES *et*

al., 2008). Com isso, já foram identificados em peçonha de *T. serrulatus* as seguintes famílias de proteínas (classificadas por atividade): toxinas de canal de sódio (NaTx), toxinas de canal de potássio (KTx), toxinas diuréticas, peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), PAM, enzimas e outras toxinas. A presença destes componentes caracteriza a alta afinidade por canais iônicos e atividade antimicrobiana, antitumoral e antiviral da peçonha deste escorpião (ALMAAYTAH *et al.*, 2013; ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2013; KING; HARDY, 2013; SAROJINI, 2013).

A toxina do escorpião-amarelo é composta por proteínas neurotóxicas que interagem com alta especificidade em canais iônicos. Este fato desperta o interesse de pesquisadores em isolar e caracterizar tais proteínas e peptídeos, visando tratamentos mais eficazes nos casos de envenenamento e a compreensão de mecanismos fisiológicos, patológicos e biológicos (DE MELO *et al.*, 2015; DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2013; PEDRON *et al.*, 2017). Testes com peptídeos extraídos de toxinas de escorpiões apresentaram efeito bactericida, bacteriostático e antibiofilme, sendo pouco nocivo a células humanas e com baixo efeito hemolítico (HWANG *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; RAMÍREZ-CARRETO *et al.*, 2012).

Isolando determinadas frações da toxina do escorpião *T. serrulatus*, observou-se que existem pelo menos dezenove peptídeos tóxicos, podendo ser classificados em α e β -toxinas, de acordo com a sua conformação estrutural (RATES *et al.*, 2008). As mais notáveis, no entanto, são a Tityustoxina 1, 2, 3, 15 e 18 (Ts1, Ts2, Ts3, Ts15 e Ts18), sendo Ts1 caracterizada como β -neurotoxina, com atividade tóxica para mamíferos e insetos ao interagir fortemente com o quarto sítio receptor de canais de sódio. Já a Ts2 é caracterizada como α -neurotoxina, e tem ação de retardo na inativação dos canais de sódio. A toxina Ts3 é também α -neurotoxina, e tem ação sobre o terceiro sítio receptor de canal de sódio induzindo a liberação de mediadores químicos como a acetilcolina e a catecolaminas, além disso, esta toxina exerce atividade sobre a despolarização de fibras nitrérgicas e liberação de óxido nítrico, levando ao relaxamento do músculo liso cavernoso (HWANG *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; RAMÍREZ-CARRETO *et al.*, 2012). A Ts15 bloqueia canais de potássio Kv1.2 e Kv1.3 e observou-se que tal bloqueio é físico. Já a Ts18 apresenta-se como uma proteína curta e com ação em canais de íons sódio (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Outros componentes menos estudados como peptidases e hialuronidases estão presentes nesta peçonha. Hialuronidases são enzimas capazes de degradar hialuronan, componente presente na matriz extracelular responsável pela manutenção da integridade

estrutural do tecido, facilitando assim a rápida difusão das toxinas no organismo da presa (ALMAAYTAH *et al.*, 2014; DE MELO *et al.*, 2015). Em contra partida, peptídeos de peçonhas com atividade antimicrobiana apresentam fatores interdependentes nos componentes estruturais que determinam essa atividade (TARAZI, 2015; VALDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2013). Peptídeos antimicrobianos oriundos de toxinas de escorpião desempenham papel eletrostático na parede das membranas de bactérias, uma vez que a membrana apresenta amino-componentes carregados negativamente como fosfolipídios ácidos e lipopolissacarídeos (LPS) (RATES *et al.*, 2008; TARAZI, 2015).

Na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, o peptídeo antimicrobiano TsAP-1 apresenta 17 resíduos de aminoácidos (FLSLIPSLVGGSSISAFK), carga +1, 78% de hidrofobicidade, 52% de resíduos hidrofóbicos e massa de 1161.94 Da. O TsAP-1 possui concentração inibitória mínima (CIM) de crescimento de *Staphylococcus aureus* (120 µM), *Escherichia coli* (160 µM) e *Candida albicans* (160 µM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) contra *S. aureus* (>160 µM), *E. coli* (>160 µM) e *C. albicans* (>160 µM), além de ser bioativo contra células tumorais *in vitro* H157 e H838 (carcinoma epidermóide oral humano e adenocarcinoma de câncer de pulmão, respectivamente) com valores de inibição de 55,9 e 52,5 µM, respectivamente, e atividade hemolítica de 6,48 % na concentração máxima (160 µM) (GUO *et al.*, 2013). Em busca de aprimorar este tipo de atividade em peptídeos definidos estruturalmente, ferramentas de bioinformática, como desenho racional de fármacos, vêm se destacando no cenário biotecnológico.

2.5.Desenho Racional e Modelagem Molecular no desenvolvimento de moléculas bioativas

O desenho racional e a modelagem molecular são ferramentas que buscam a partir de peptídeos já descritos na literatura, promover mudanças locais em sua sequência com o fim de produzir peptídeos mais nocivos aos microrganismos alvo e, ao mesmo tempo, menos citotóxicos aos seres humanos. Além de simular as interações moleculares com grande eficácia, descobrir protótipos (ou compostos de partida), aperfeiçoar a ação de compostos já bioativos e a elaboração de compostos candidatos, esta tecnologia é muito menos onerosa e mais rápida (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016; VERLI, 2014). Para tanto, são utilizadas técnicas *in silico* como a modelagem comparativa (MC), modelagem molecular (MM) e dinâmica molecular (DM) (VERLI, 2014).

Em Modelagem Comparativa (MC) há o alinhamento da sequência de aminoácidos de interesse com a sequência do banco de dados de outras proteínas com estrutura tridimensional previamente elucidada e armazenada no *Protein Data Bank* (PDB). As comparações realizadas são possíveis, pois no processo evolutivo das famílias proteicas existem regiões conservadas as quais podem ser preditoras de suas atividades e estrutura. Para construção de um peptídeo a partir de MC é necessário seguir um processo que se configura em elucidação da sequências resolvidas tridimensionalmente e mostrar identidade entre as sequências de pelo menos 25% (VERLI, 2014). Para realizar estes processos, atualmente, existem programas *on-line* que permitem realizar a modelagem molecular comparativa ou por homologia como o *MODELLER* e o *I-TASSER*, por exemplo (WEBB; SALI, 2017).

A Modelagem Molecular (MM), busca investigar as estruturas e propriedades moleculares por meio da química computacional e de técnicas de visualização tridimensional (BARREIRO *et al.*, 1997). Desta forma, a MM tem por objetivo gerar, manipular e/ou representar com precisão estruturas moleculares e calcular as propriedades físico-químicas delas (VERLI, 2014). Para atuação e desenvolvimento desta metodologia, a tecnologia computacional precisou avançar tanto em capacidade de armazenamento de dados como em aprimoramento na química funcional (técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raios-X, bioquímica e biologia molecular) trazendo desenvolvimento em áreas até então completamente desconhecidas (CRAIK, 1997; VERLI, 2014). A MM pode ser classificada em dois grupos distintos: planejamento direto ou dependente do receptor ou planejamento indireto ou independente do receptor.

Planejamento direto ou dependente do receptor é quando usa a estrutura tridimensional de uma molécula alvo em um complexo com a micromolécula: utilizando comparação por homologia e conhecimento das sequências *template - based modelling* a qual condiz a alguma estrutura já existente com suas propriedades tridimensional identificadas (VERLI, 2014). Já o planejamento indireto ou independente do receptor é o que aproveita da estrutura dos ligantes disponíveis utilizando métodos *ab initio* e métodos *de novo* com sequências alvos *template free modelling* para sequências com moléculas sem suas características tridimensionais resolvidas (IRAZABAL, 2016; VERLI, 2014).

Métodos *de novo* podem gerar uma grande variedade de sequências usando padrões ou frequências de aminoácidos. Para isso, estudos com padrões do tipo anfipáticos vêm ganhando espaço, estes padrões são isolados do peptídeo parental e inseridos nos peptídeos

análogos. Através do padrão anfipático ocorre a substituição dos aminoácidos da sequência parental, por aminoácidos que favorecem a atividade antimicrobiana, aumentando a carga líquida e momento hidrofóbico das novas sequências. Compreender e controlar essas inter-relações podem ser a chave para a concepção de novos peptídeos com maior potência e especificidade (IRAZAZABAL, 2016; PORTO; PIRES; FRANCO, 2012).

Para operacionalizar esta ferramenta, os programas de bioinformática se baseiam nos processos e mecanismos bioquímicos conhecidos, seja no processo fisiológico, definição da intervenção terapêutica ou eleição do alvo terapêutico desejado (VERLI, 2014). Por meio da construção *in silico* de membranas miméticas DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina) e DPPG (1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilglicerol) é possível projetar e compreender as possíveis interações entre peptídeo membrana.

Segundo Holtje, e colaboradores (2003), é necessário verificar a qualidade estereoquímica das estruturas dos modelos formados e avaliar a formatação de parâmetros como comprimentos de ligações, ângulos no meio de ligações, ângulos torsionais e a quiralidade dos resíduos (HOLTJE *et al.*, 2008). Com utilização do gráfico de *Ramachandran* é possível prever qual estrutura secundária o peptídeo terá por meio das posições ϕ (phi) e ψ (psi) nos quadrantes desta ferramenta. Para conformação em α -hélice, os valores obtidos deverão estar agrupados sobre o eixo $\phi = -57^\circ$ e $\psi = -47^\circ$. Já para estruturas secundárias em β -folha, os valores deverão estar agrupados no eixo de $\phi = -130^\circ$ e $\psi = +140^\circ$. Graficamente, isto significa que muitos resíduos no quadrante superior esquerdo terão propensão a se comportar em β -folha e se este fenômeno ocorrer no quadrante inferior esquerdo terá propensão a se comportar em α -hélice (HOVMÖLLER; ZHOU; OHLSON, 2002; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963).

Além disso, o gráfico de *Ramachandran* apresenta um controle de qualidade visual que evidencia os valores analisados: em suma, as regiões de melhor valor são chamadas de regiões favorecidas onde o choque entre átomos é mínimo; as regiões permitidas são onde há pouca chance de choques estérico; as regiões generosamente permitidas indicam grande chance de choque estérico e a região negligenciada, ou não permitida, é onde provavelmente haverá choque estérico. Considera-se um modelo de qualidade aqueles em que, pelo menos, 90% dos resíduos estejam nas áreas favorecidas e altamente permitidas (HOVMÖLLER; ZHOU; OHLSON, 2002; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). As regiões na parcela com a maior densidade de pontos são as chamadas regiões

"favorecidas ou altamente permitidas", também chamadas regiões de baixa energia. Alguns valores de ϕ e ψ são proibidos, uma vez que os átomos envolvidos chegarão muito perto um do outro, resultando em um choque estérico.

3. OBJETIVOS

3.1.Geral:

Projetar racionalmente peptídeos análogos ao peptídeo parental TsAP-1, isolado da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*, correlacionando padrões anfipáticos e físico-químicos à atividade antimicrobiana.

3.2.Específicos:

- Compreender características físico-químicas conformacionais dos peptídeos desenhados racionalmente;
- Avaliar a atividade dos peptídeos desenhados racionalmente contra bactérias Gram-negativas e -positivas.
- Avaliar efeitos hemolíticos do peptídeo parental e de seus análogos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova / Biotech da Universidade Católica Dom Bosco, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul que exerceu parceria com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, na cidade de João Pessoa, Paraíba.

4.2.Desenho racional de peptídeos análogos de TsAP-1

Os peptídeos análogos denominados butylatus-1, -2 e -3 foram construídos com base no peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK) depositado no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos com o código AP02234 (GUO *et al.*, 2013). Os critérios utilizados para se obter as novas sequências de análogos foi a substituição pontual de resíduos de aminoácidos, que prende a conformação α -hélice com resíduos de aminoácidos semelhantes. As sequências foram rearranjadas usando o diagrama helicoidal do servidor HeliQuest (GAUTIER *et al.*, 2008) para melhorar a hidrofobicidade e a carga líquida. Os resíduos de aminoácidos usados

para construir butilatus-1, -2 e -3 foram posicionados seguindo um padrão de anfipacidade **HHh⁺H** (h ⁺: Resíduos de aminoácidos hidrofílicos com carga positiva; H: Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos), observado na sequência primária de TsAP-1, com a adição de Lysina no início das sequências para favorecer a interação eletrostática com os fosfolípidios da membrana bacteriana, e conservar a conformação de α -hélice das sequências.

4.3. Modelagem Molecular

A construção de modelos tridimensionais do peptídeo controle e dos peptídeos análogos foi realizada por similaridade através do servidor I-TASSER utilizando o banco de dados do PDB (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Para realizar a validação dos modelos desenvolvidos, foi utilizado o programa PROCHECK14, que apresenta geometria, estereoquímica e distribuição de energia dos peptídeos pontuando ângulos diédricos considerando forças covalentes e análise do gráfico Ramachandran. Além disso, o nível de qualidade dos peptídeos gerados com base em resultados previamente dados dentro de faixas de proteínas nativas foi calculado usando o valor do z-score do Programa ProSA-web (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos modelos, para medir a similaridade das estruturas e prever o desvio médio dos átomos são C-score, TM-score e RMSD (Root Mean Square Deviation). O C-score refere-se ao padrão que estima a qualidade dos modelos construídos pelo servidor I-TASSER, considerando a importância dos alinhamentos e parâmetros de convergência da estrutura. Quando o TM-Score é avaliado, propõe-se medir a similaridade estrutural das duas estruturas. No entanto, o TM-Score trabalha em conjunto com o RMSD, que é a distância média dos pares de aminoácidos das duas estruturas que são sensíveis a erros locais, ajudando a reduzir erros nos modelos gerados (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SHEN *et al.*, 2009; ZHANG, 2008). RMSD prevê o desvio médio dos átomos das estruturas alinhadas, de controle e propostas. Assim, quanto maior for esse valor, também será a diferença de estrutura entre os peptídeos comparados (ORRY; ABAGYAN, 2012).

4.4. Síntese e Quantificação

Os peptídeos foram sintetizados pela empresa Aminotech, com uma pureza de 95% (após remoção de TFA), pelo método de fase sólida utilizando a química N-9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) numa resina de amida Rink. O peptídeo bruto foi

solubilizado em ácido trifluoroacético aquoso a 0,1% (TFA) e filtrado com um filtro Millex de 0,22 μm 25 mm (Millipore-Merck, Billerica, MA). As concentrações de peptídeos sintéticos para todos os experimentos *in vitro* foram quantificadas utilizando a media de absorbância a 205, 215 e 225 nm. (FALCAO *et al.*, 2016; MURPHY; KIES, 1960).

4.5.Obtenção dos Microrganismos

As linhas utilizadas para os ensaios de concentração inibitória mínima foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova / Biotech da Universidade Católica Dom Bosco sob coordenação do Professor Doutor Octávio Luiz Franco. As linhagens selecionadas para testes foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Acinetobacter baumannii* (003326263), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* KpC+ 001812446 e *Klebsiella pneumonia* KpC+ 002210477.

4.6.Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para os ensaios de CIM, as bactérias foram cultivadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH) e incubadas a 37 °C durante aproximadamente 18 h. Após esse período, três colônias isoladas de cada bactéria foram inoculadas em 5 mL de caldo MH e incubadas 200 rpm, a 37 °C, em cultura entre 12-18 horas. Crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro a 600 nm. Os testes de CIM foram realizados pelo método de diluição de microplacas de 96 poços em uma concentração bacteriana final de $2-5 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$, como descrito anteriormente (HECHT *et al.*, 2012). Os peptídeos foram testados em concentrações variando de 2,7 a 91,8 μM . A ciprofloxacina foi utilizada como controle negativo de crescimento bacteriano nas mesmas concentrações dos peptídeos, enquanto a suspensão bacteriana em caldo MH foi usada como controle positivo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e as leituras foram realizadas em um leitor de microplacas a 600 nm após o tempo de incubação. A CIM foi determinada como a menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano.

4.7.Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A avaliação da CBM foi dependente dos resultados da CIM. Três repetições de 10 μL foram retiradas dos poços da microplaca, plaqueadas em ágar MH e incubadas a 37 °C por 24 horas. O CBM foi determinado como a menor concentração de peptídeo em que nenhum

crescimento bacteriano foi detectado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

4.8. Ensaio Hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo TsAP-1 e dos análogos foi avaliada utilizando eritrócitos de murinos. As células foram armazenadas a 4 °C. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato 50 µM em pH 7,4. A solução de peptídeo foi adicionada à suspensão de eritrócitos (volume 1%), em uma concentração final variando de 2,7 a 91,8 µM em um volume final de 100 mL. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 60 minutos. A liberação de hemoglobina foi monitorada medindo a absorbância do sobrenadante a 540 nm. O controle de hemólise zero (branco) foi determinado com eritrócitos suspensos na presença de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e para controle positivo (100% de lise dos eritrócitos) utilizou-se solução Triton X-100 1% (volume) dissolvido em água destilada. Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata (CARDOSO, MARLON H. *et al.*, 2016). Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o número 014/2018.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

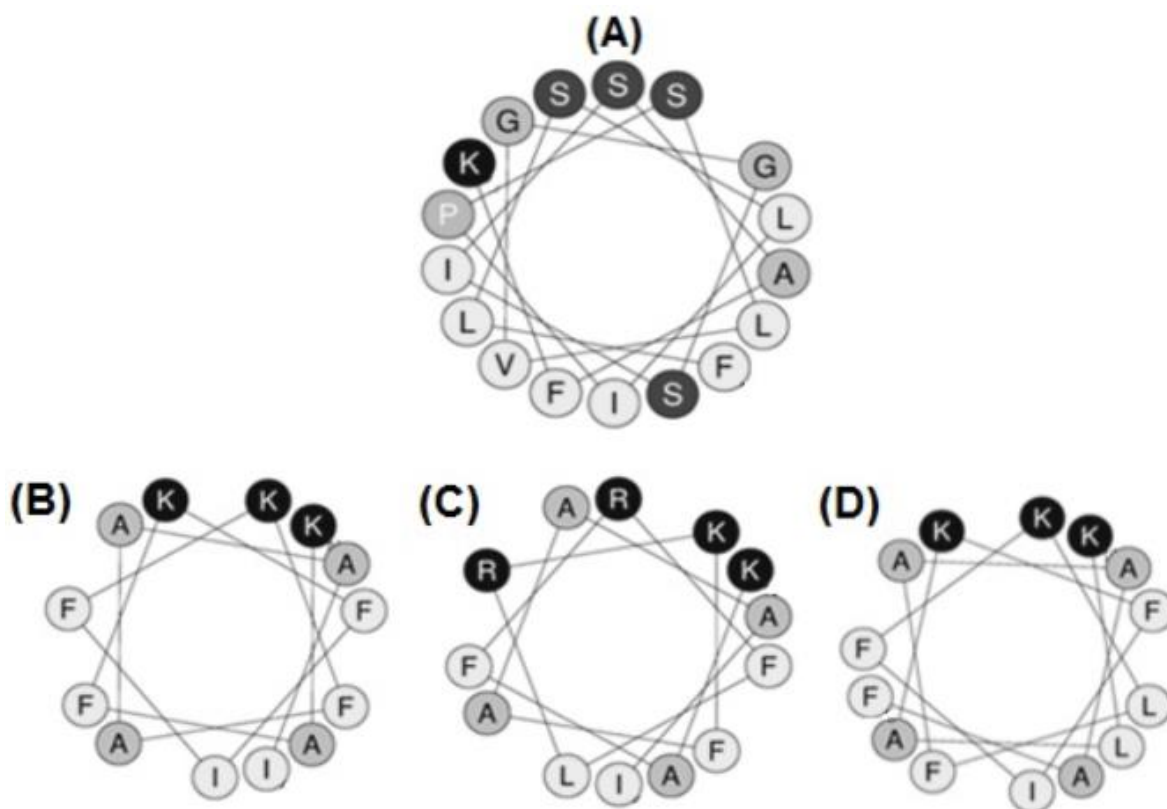
5.1. Desenho racional, modelagem dos análogos de TsAP-1 e síntese dos peptídeos.

A peçonha do escorpião amarelo brasileiro, *Tityus serrulatus*, é constituído de diferentes componentes, incluindo proteínas, enzimas, lipídios, nucleotídeos, e principalmente uma grande diversidade de peptídeos. O peptídeo TsAP-1 foi descrito em conjunto com TsAP-2, como peptídeos que apresentam estruturas primárias semelhantes, compostas de 17 resíduos de aminoácidos e com uma carga líquida positiva +1, em pH 7. Quando a predição da estrutura secundária foi analisada, o peptídeo TsAP-1 apresentou menor conteúdo helicoidal (58,83%) e momento hidrofóbico (0,43 μ H) quando comparado ao TsAP-2 (76,47% hélice, momento hidrofóbico de 0,51 μ H), além de atividade antimicrobiana reduzida para o TsAP-1. Dentre isso, o peptídeo TsAP-1 foi selecionado com o intuito de aumentar sua carga líquida positiva e momento hidrofóbico, de modo que se pudesse observar um aumento na atividade bactericida com uma diminuição da citotoxicidade em células de mamíferos (CARDOSO, MARLON H. *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2013).

Da sequência primária de um peptídeo até a sua estrutura é importante à utilização de ferramentas biotecnológicas para o desenvolvimento de novas moléculas, esta metodologia é denominada Desenho Racional de Peptídeos, que utiliza parâmetros físico-químicos para melhorar peptídeos nativos com atividade contra microrganismos patogênicos (MIGLIOLO *et al.*, 2012, 2016). Os resíduos de aminoácidos usados para construir os análogos do TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3, foram posicionados seguindo o padrão de anfipacidade **HHh⁺H**, respectivamente, obtido do peptídeo parental, TsAP-1. Os modelos teóricos para butylatus-1, -2 e -3 mostraram conformação α -hélice, isto também foi rearranjado usando o diagrama helicoidal do servidor HeliQuest (Figura 4). Para visualizar a distribuição de aminoácidos nas estruturas peptídicas helicoidais, os aminoácidos dos peptídeos foram plotados em projeções de roda helicoidal apresentando maior anfipacidade. Além disso, as distribuições dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos dos peptídeos análogos nas projeções foram semelhantes. Todas as sequências análogas foram terminadas com a adição de três alaninas, com intuito de aumentar a formação α -hélice. Para mais, estudos indicam que a inserção de algumas alaninas também exibe inúmeras atividades, incluindo antagonismo antimicrobiano,

citotóxico, antiviral, inseticida, uterotônico, hemolítico, neurotensina e anti-helmíntico (MIGLIOLO *et al.*, 2012).

Figura 4 - Diagrama de hélice para o peptídeo parental e seus análogos: Arranjo de resíduos de aminoácidos de (A) TsAP-1, (B) butylatus-1, (C) butylatus-2 e (D) butylatus-3. A cor preta representa os aminoácidos hidrofílicos e a cor cinza claro os aminoácidos hidrofóbicos.



Fonte: Autor.

Butylatus-1, -2 e -3 obtiveram um aumento na carga líquida, +3, +4 e +3, respectivamente, em comparação com TsAP-1 (+1). A principal diferença entre os peptídeos análogos e seu parental são as deleções de aminoácidos como: Ser³, Pro⁶, Ser⁷, Val⁹, Ser¹² e Ser¹⁴; e, a subsequente inserção de aminoácidos carregados positivamente (lisina ou arginina). Para fornecer cargas positivas aos peptídeos butylatus-1 e -3 foram inseridas lisinas nas sequências, contudo, para butylatus-2, tanto lisina como arginina foram adicionados. Esses resíduos com carga positiva parecem ter um papel importante na atividade antimicrobiana, uma vez que a maioria das atividades bactericidas tem sido relacionada a resíduos catiônicos (KIM; CHA, 2010). Além disso, lisina foi adicionada na porção N-terminal das sequências análogas, com intuito de favorecer a interação eletrostática com membranas fosfolipídicas, auxiliando na formação de poros toroidais (MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2012), podendo

causar desestabilização da membrana, como já é observado para peptídeos antimicrobianos (KIM; CHA, 2010; STRÖMSTEDT et al., 2010).

Em relação à hidrofobicidade, uma leve redução foi observada para butylatus-1 e -3 (76% e 70% respectivamente), já butylatus-2 apresentou uma redução significativa de 47%, quando comparados com o peptídeo parental TsAP-1 que apresenta hidrofobicidade de 78%. Da mesma forma, isso se refletiu no momento hidrofóbico dos butylatus-1, -2 e -3, que foram maiores quando comparados ao TsAP-1, sendo 0.56, 0.63, 0.55 e 0.43 μ H na escala de Eisenberg, respectivamente, permitindo assim a distribuição eficiente de resíduos hidrofóbicos e faces positivamente carregadas, e favorecendo a anfipacidade dos análogos quando comparado com o peptídeo parental (DATHE; WIEPRECHT, 1999; EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1984). Resultados semelhantes foram observados nos peptídeos análogos TsAP-S1 e TsAP-S2 (análogos peptídeos de TsAP-1 e TsAP-2), nos quais obtiveram uma diminuição nos resíduos hidrofóbicos (62 e 67%), bem como os momentos hidrofóbicos foram maiores que os peptídeos controles (0.75 e 0.73 μ H) (Tabela 2) (GUO *et al.*, 2013).

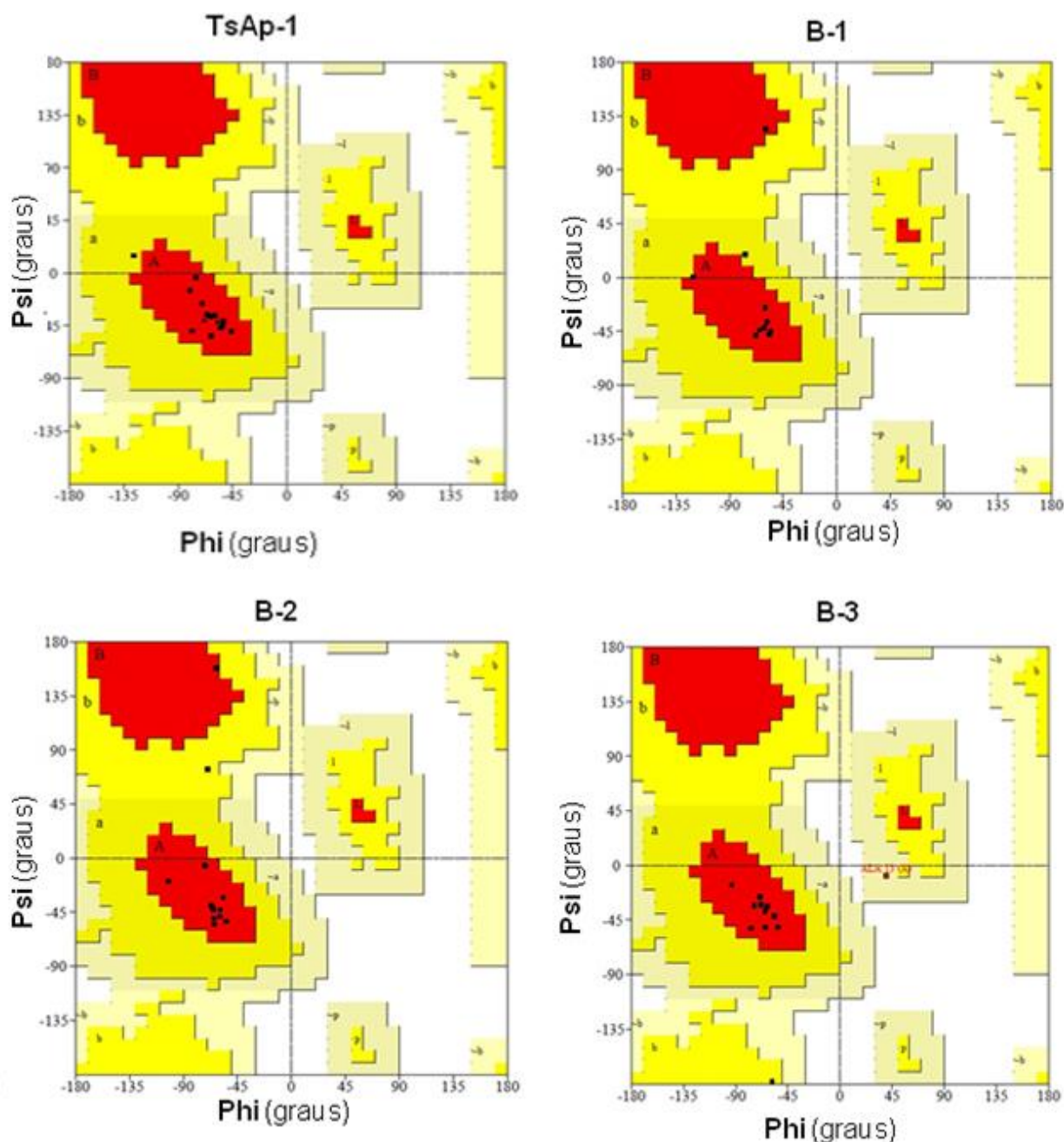
O programa PROCHECK foi usado para avaliar os impedimentos estereoquímicos usando o gráfico *Ramachandran* (Figura 5). Em resumo, os valores obtidos por PROCHECK para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3 foram 91,6, 100, 100 e 91,6%, respectivamente, de resíduos de aminoácidos localizados nas regiões favoráveis. Considera-se um modelo de qualidade aqueles em que, pelo menos, 90% dos resíduos estejam nas áreas favorecidas e altamente permitidas (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Para uma estrutura experimental de alta qualidade e alta resolução, essas regiões não permitidas geralmente estão vazias ou quase vazias - muito poucos resíduos de aminoácidos nas proteínas têm seus ângulos de torção nessas regiões. Mas às vezes existem exclusões desta regra - esses valores podem ser encontrados e, provavelmente, resultarão em alguma tensão na cadeia de polipeptídica. No quadrante inferior esquerdo, podemos ver muitos pontos nas regiões favorecidas e altamente permitidas, mas quase nenhum à direita (os que são vistos são para resíduos de glicina), confirmando um comportar em α -hélice dos peptídeos análogos e do parental (HOVMÖLLER; ZHOU; OHLSON, 2002; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e previsão antimicrobiana de butylatus-1, -2 e -3 e seu peptídeo parental. As predições antimicrobianas foram realizadas utilizando CAMP_{R3}. ^a Momento hidrofóbico calculado de acordo com a escala de Eisenberg. ^b Support vector machine. ^c Random forest. ^d Discriminant analysis. As propriedades físico-químicas foram calculadas no servidor HeliQuest.

Peptídeos	TsAP-1	Butylatus-1	Butylatus-2	Butylatus-3
Sequências	FLSLIPSLVGGSSISAFK	KAFKFIFKFAAAI	KAFRFLRKFAAAI	KLAKFIFKLFAAAF
Resíduos	17	13	13	14
Carga Positiva (z)	+1	+3	+4	+3
Hidrofobicidade (%)	78%	70%	47%	76%
Momento Hidrofóbico ^a	0.471	0.566	0.635	0.554
SVM ^b	0.915	0.807	0.891	0.838
RF ^c	0.9585	0.856	0.864	0.848
DA ^d	0.985	0.983	0.967	0.986

Fonte: Autor.

Figura 5 - Gráfico de Ramachandran para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3: Os quadrados negros representam os aminoácidos comuns e os triângulos negros representam o aminoácido glicina e prolina. Vermelho: Região favorecida; Amarelo forte: Região permitida; Amarelo pálido: Região generosamente permitida; Branco: Região não permitida.



Fonte: Autor.

Apesar de sua carga líquida positiva comum, os peptídeos diferiram significativamente em seu conteúdo helicoidal previsto quando comparados ao peptídeo parental (Tabela 3). Quando a predição da estrutura secundária foi analisada, o conteúdo helicoidal dos peptídeos butylatus apresentaram aumento e maior anfipacidade em relação ao peptídeo parental. O

peptídeo TsAP-1 apresentou 58,8% de conteúdo helicoidal, e sua conformação de hélice começa partir da Leu⁴, mas observasse uma quebra da hélice entre as Gly^{10 e 11}. Como já descrito na literatura, resíduos de Glicina podem ser caracterizados como responsável por quebras de hélice (GUO *et al.*, 2013; KIM; CHA, 2010). Já para butylatus-1, o conteúdo helicoidal apresentado foi de 76,9%, com o início e fim da conformação da hélice entre os resíduos Phe³ e Ala¹¹. Butylatus-2 apresentou 69,2% de conteúdo helicoidal, e sua conformação helicoidal iniciou-se na Ala² com o termino em Ala¹¹. Já butylatus-3 apresentou o maior aumento do conteúdo helicoidal, 78,5%, começando em Leu² e terminando em Ala¹². Com o aumento no conteúdo helicoidal, favorece-se a uma maior estabilização das ligações de hidrogênio entre os grupos de cadeia principal desses peptídeos (MOJSOSKA; ZUCKERMANN; JENSSEN, 2015). Em muitos casos o conteúdo helicoidal esta associado diretamente à anfipacidade, uma vez que a conformação helicoidal possibilita a disposição das cadeias laterais hidrofílicas e hidrofóbicas dos resíduos de aminoácidos em faces opostas da hélice e conseqüentemente ocorre melhor interação com a membrana bacteriana (GOMES, 2016).

Para validar os dados estereoquímicos com qualidade, é emitido o valor "*G-factor*", o qual representa qualidade acima de -0.5, abaixo deste valor é considerado "não-usual" e abaixo de -1,0 é considerado "altamente não-usual" (LASKOWSKI *et al.*, 1996). Os valores do *G-factor* obtidos para validar a estereoquímica de todos os modelos estão dentro da faixa de estrutura confiável, com exceção do TsAP-1, que apresentou *G-factor* de -0.75. A qualidade da dobra dos modelos gerados também foi avaliada usando o servidor online ProSA-web. Os valores do z-score obtidos para o peptídeo parental TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3 foram -0.16, -1.25, -1.31 e -0.83. Esses resultados indicam que, em comparação com o banco de dados do PDB, esses peptídeos análogos têm um padrão dentro da média (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O C-score refere-se ao padrão que estima a qualidade dos modelos construídos pelo servidor I-TASSER, considerando a importância dos alinhamentos e parâmetros de convergência estrutural (ZHANG, 2008). Os valores do C-score obtidos para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3 foram -0.96, -0.11, -0.17 e -0.05, considerados satisfatórios para suas predições. O TM-Score propôs medir a similaridade estrutural de duas sequencias. Nos presentes resultados, o TM-Score obtido para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3 foi de 0.59, 0.7, 0.69 e 0.71, respectivamente, com predição de acurácia satisfatória pelo RMSD para modelagem. Os valores de RMSD entre os modelos experimentais e teóricos para TsAP-1, butylatus-1, -2 e -3 foram 1.8, 0.5, 0.6 e 0.5 Å, respectivamente. O valor do RMSD e a baixa

variabilidade entre os modelos estruturais, as estruturas dos modelos refletem a conservação na maioria das regiões e enfatizam um padrão de dobra para este peptídeo construído (Tabela 3) (ALTMAN, 2013; VERLI, 2014).

Tabela 3 - Estruturas tridimensionais construídas pelo servidor I-TASSER para o peptídeo controle e seus análogos. Visualizado pelo programa PyMol. *O N-terminal está voltado para baixo enquanto o C-terminal está em cima das estruturas. ^a Os valores são indicados por média e desvio padrão da média.

Peptídeos	TsAP-1	Butylatus-1	Butylatus-2	Butylatus-3
Predição 3D*				
Conteúdo Helicoidal	58.8 %	76.92 %	69.23 %	78.57 %
C-score ^a	-0.96	-0.11	-0.17	-0.05
TM-score ^a	0.59±0.14	0.7±0.12	0.69±0.12	0.71±0.12
RMSD ^a	2.4±1.8 Å	0.5±0.5 Å	0.6±0.6 Å	0.5±0.5 Å

Fonte: Autor.

Butylatus -1 (NH₂-KAFKFIFKFAAAI-COOH), -2 (NH₂-KAFRFLRKFAAAI-COOH), -3 (NH₂-KLAKFIFKLFAAAF-COOH) e o peptídeo parental TsAP-1 (NH₂-FLSLPSLVGGSISAFK-COOH) foram sintetizados. De acordo com a análise realizada pelo servidor CAMPr3, os peptídeos análogos butylatus-1, -2 e -3 obtiveram massa molecular de 1501,87, 1483,81, 1615,03 Da, respectivamente.

5.2. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e Ensaio hemolítico

Os ensaios de microdiluição foram realizados para determinar a capacidade dos peptídeos butylatus-1, -2 e -3 em reduzir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em comparação com o peptídeo parental, TsAP-1 e a ciprofloxacina (Tabela 4). O peptídeo TsAP-1 não apresentou resultados MIC e MBC contra nenhuma das linhagens na

concentração máxima testada (73 μM). Em contraste, os análogos butylatus-1 e -2 apresentaram CIMs e CBMs de 5,3 e 43,1 μM , respectivamente, contra *E. coli* ATCC 25922. Nos testes realizados com butylatus-1 e -2 contra *E. coli* KpC+ 001812446, eles não apresentaram resultados de MIC e MBC até 85,2 e 86,3 μM , respectivamente. No entanto, butylatus-3 apresentou resultados satisfatórios de CIM e CBM a 39,6 μM . Além disso, quando avaliados contra bactéria Gram-positiva, *E. faecalis* ATCC 19433, butylatus-1 e -2 apresentaram resultados satisfatórios de CIM e CBM em 5,3 e 43,1 μM , respectivamente. Em contraste, TsAP-1 e butylatus-3 foram ineficazes contra *E. faecalis* ATCC 19433, até a maior concentração testada (Tabela 4). Esta seletividade de butylatus-1 e -2 para *E. coli* ATCC 25922 e *E. faecalis* ATCC 19433, e do butylatus-3 para *E. coli* KpC+ 001812446 poderia ser explicada devido à distribuição de carga ao longo da hélice e sua estrutura imperfeitamente anfipática. Estudos anteriores sugeriram que uma anfipacidade imperfeita de um peptídeo α -helicoidal aumenta a seletividade do peptídeo para algumas bactérias patogênicas (MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2012).

Por fim, nenhum dos peptídeos (parentais e análogos) foi capaz de inibir as linhagens de *A. baumannii* 003326263, *K. pneumoniae* KpC+ 002210477 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 nas concentrações máximas testadas. De acordo com Ilić et al., (2013), foi demonstrado que alguns tipos de PAM, como adepantinas (ADP1–7), possuem um índice de seletividade muito alto para *E. coli* quando comparado com outras bactérias Gram-negativas. Além disso, uma diminuição no crescimento de algumas bactérias específicas, principalmente contra linhagem de *E. coli*, pode ser observado quando peptídeos sintéticos com a faixa de fenilalanina e lisina foram testados (SU et al., 2017).

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), *Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Ensaio Hemolítico obtidas usando TsAP-1 e seus análogos butylatus-1(B1), -2 (B2) e -3 (B3), testados em modelos específicos de microrganismos e de atividade hemolítica com eritrócitos de murinos. (>) Todas as concentrações testadas até este valor não apresentaram CIM.

	TsAP-1	B1	B2	B3
Bactérias	MIC (µM)			
<i>A. baumannii</i> 003326263	>73	>85.2	> 86.3	> 79.3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>73	*5.3	*43.1	> 79.3
<i>E. coli</i> KpC+ 001812446	>73	>85.2	> 86.3	*39.6
<i>K. pneumoniae</i> KpC+ 002210477	>73	>85.2	> 86.3	> 79.3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>73	>85.2	> 86.3	> 79.3
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	>73	*5.3	*43.1	> 79.3
Células de Mamíferos	(µM)			
Eritrócitos	>73	>85.2	43.1	> 79.3

Fonte: Autor.

TsAP-1, butylatus-1 e -3 não apresentaram atividade hemolítica contra eritrócitos de camundongos até a máxima concentração utilizada nos bioensaios. Além disso, o butylatus-2 apresentou 100% de hemólise contra os eritrócitos dos ratos na concentração de 43,1 μM (Tabela 4). Desse modo, outros peptídeos análogos derivados de TsAP-1 e TsAP-2, tais como TsAP-S1 e TsAP-S2 também foram ativos contra os patógenos humanos, porém com o aumento do momento hidrofóbico e da carga líquida pode se observar aumento na sua taxa de hemólise, bem como ocorrido com butylatus-2 (CARDOSO, MARLON H. *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2013). Embora seja conhecido que o aumento da natureza anfipática de um peptídeo, quer seja, aumentando o momento hidrofóbico e/ou aumento da carga líquida positiva, pode levar ao aumento da sua potência antimicrobiana, contudo, também pode resultar num aumento da citotoxicidade para células eucarióticas. Assim, poder-se-ia explicar o aumento da atividade hemolítica para o butylatus-2 e a ausência de hemólise para os demais (KIM; CHA, 2010).

Um dos principais desafios é o desenvolvimento de PAM que permeabilizam as membranas bacterianas com seletividade e, portanto, excluem os potenciais efeitos citotóxicos nas células eucarióticas (MAHLAPUU *et al.*, 2016; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Em resumo, a inserção de trincas de alaninas ao final das sequências, juntamente com a alta incidência de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a presença de resíduos polares carregados positivamente, convertem os peptídeos análogos butylatus em moléculas anfipáticas com atividade antibacteriana seletiva. Os peptídeos butylatus apresentam vantagens potenciais sobre os antibióticos convencionais, contudo, devido ao alto potencial de ação do butylatus-1 em baixas doses, e ainda sim não apresentando hemólise em nenhuma das concentrações testadas, destacou-se como excelente candidato no tratamento e desenvolvimento de uma nova alternativa contra infecções nosocomiais. Essas características são relevantes para a produção em larga escala de fármacos, uma vez que peptídeos mais eficazes terão menores custos de produção e, portanto, a relação custo-benefício do produto final é mais atrativa para o marketing do produto.

6. CONCLUSÕES

A compreensão da estabilidade estrutural dos peptídeos butylatus-1, -2 e -3 e a preferência conformacional em nível molecular em um ambiente hidrofóbico podem levar a avanços no desenvolvimento de novos medicamentos e terapias para o tratamento de infecções hospitalares. Os cuidados à saúde se tornaram um sério desafio, devido à alta taxa de resistência bacteriana nos hospitais e às necessidades urgentes de novos compostos para tratar essas doenças. Considerando o comportamento físico-químico dos peptídeos projetados racionalmente e sua relação com as atividades *in vitro*, é possível afirmar que estes peptídeos são candidatos a futuros produtos antibacterianos. Apesar dos dados relatados sobre o bom desempenho desses peptídeos, butylatus-1e -3 se destacaram devido apresentarem potencial de ação em baixas dosagens e não apresentar atividade hemolítica em nenhuma das concentração testada, em especial o butylatus-3 por ter ação contra uma linhagem resistente a antibióticos, sendo assim considerados potenciais candidatos no desenvolvimento de novas alternativas contra infecções causadas por bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- ALMAAYTAH, Ammar *et al.* Enhanced antimicrobial activity of Aam AP1-Lysine, a novel synthetic peptide analog derived from the scorpion venom peptide Aam AP1. **Pharmaceuticals** v. 7, n. 5, p. 502–516, 2014. Disponível em: <<https://www.mendeley.com/catalogue/enhanced-antimicrobial-activity-aam-ap1lysine-novel-synthetic-peptide-analog-derived-scorpion-venom/>>.
- ALMAAYTAH, Ammar *et al.* Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *Androctonus mauritanicus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics** v. 19, n. 4, p. 281–293, 2013. Disponível em: <<https://www.mendeley.com/catalogue/mauriporin-novel-cationic-alpha-helical-peptide-selective-cytotoxic-activity-against-prostate-cancer-cell/>>.
- ALMAAYTAH, Ammar; ALBALAS, Qosay. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides** v. 51, p. 35–45, jan. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978113003537>>.0196-9781.
- ALTMAN, Edward I. Predicting financial distress of companies: Revisiting the Z-Score and ZETA® models. **Handbook of Research Methods and Applications in Empirical Finance**. Melbourne: Edward Elgar Publishing, 2013. 53 v. p. 428–455. Disponível em: <<https://www.mendeley.com/catalogue/predicting-financial-distress-companies-revisiting-z-score-zeta-models/>>. 9780857936080.
- ANDRADE, Leonardo Neves De; DARINI, Ana Lúcia da Costa. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos - Bomba de efluxo. **Journal of Infection Control** v. 7, n. 3, p. 11, 2018. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_bomba.htm>.
- BARREIRO, Eliezer J. *et al.* Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova** v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421997000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.0100-4042.
- BLAIR, Jessica M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology** v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro3380>>. Acesso em: 26 set. 2018.
- BORTOLUZZI, Luis Roberval *et al.* **Notas sobre a ocorrência de Tityus serrulatus Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil**. [S.l.: s.n.], 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br>>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- BRASIL. **Manual de Controle de Escorpiões / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: [s.n.], 2009. 72 p. Disponível em: <www.saude.gov.br/svswww.saude.gov.br/bvsdisquesaude:0800.61.1997>. Acesso em: 7 ago. 2019. .978-85-334-1573-7.

BROWN, Eric D.; WRIGHT, Gerard D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature** v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature17042>>.0028-0836.

CALISKAN, Figen *et al.* Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies. **Toxicon** v. 76, p. 350–361, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010113003590>>.0041-0101.

CANTÓN, Rafael; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion in Pharmacology** v. 11, n. 5, p. 477–485, 1 out. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489211001299>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

CARDOSO, Gabriele de Azevedo. **Síntese e caracterização do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I para estudos biofísicos e estruturais de interação peptídeo-membrana**. UFVJM, 2017. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1476>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

CARDOSO, Marlon H. *et al.* A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific Reports** v. 6, n. 1, p. 21385, 26 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep21385>>. Acesso em: 27 set. 2018.

CATTOIR, Vincent. **Mechanisms of Antibiotic Resistance**. [S.l.]: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866217>>. Acesso em: 12 jun. 2019. .

CONWELL, M. *et al.* Interspecies transfer of vancomycin, erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. **BMC Microbiology** v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0928-3>>.

CRAIK, D. Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. By N. C. Cohen. **Molecules** v. 2, n. 12, p. 154–154, 1997. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/2/10/154>>.9780080532332.

DATHE, Margitta *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Letters** v. 403, n. 2, p. 208–212, 17 fev. 1997. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(97\)2900055-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(97)2900055-0)>. Acesso em: 7 ago. 2019.

DATHE, Margitta; WIEPRECHT, Torsten. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, 15 dez. 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273699002011?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2018.

DE MELO, Edinara Targino *et al.* Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin.

Peptides v. 68, p. 3–10, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978115000613?via%3Dihub>>.1873-5169 (Electronic)r0196-9781 (Linking).

DESLOUCHES, Berthony; DI, Y Peter. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. **Oncotarget** v. 8, n. 28, p. 46635–46651, 11 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28422728>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

DI SANTI, Bárbara Trindade *et al.* Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico frente aos antibióticos de uso sistêmico. **Revista de Odontologia da UNESP** v. 44, n. 4, p. 200–206, 2015. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-25772015000400200&lng=pt&tlng=pt>.

DÍAZ, Patricia *et al.* Antibacterial activity of six novel peptides from Tityus discrepans scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. **Toxicon** v. 54, n. 6, p. 802–817, 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109003018?via%3Dihub>>.1879-3150 (Electronic).

DIEGO-GARCÍA, Elia *et al.* Novel potassium channel blocker venom peptides from Mesobuthus gibbosus (Scorpiones: Buthidae). **Toxicon** v. 61, n. 1, p. 72–82, 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011200774X?via%3Dihub>>.0041-0101.

DU, Qiang *et al.* AaeAP1 and AaeAP2: Novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion, Androctonus aeneas: Structural characterisation, molecular cloning of biosynthetic precursor-encoding cDNAs and engineering of analogues with enhanced antimicrobial and antica. **Toxins** v. 7, n. 2, p. 219–237, 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/7/2/219>>.2072-6651 (Electronic)r2072-6651 (Linking).

EISENBERG, D; WEISS, R M; TERWILLIGER, T C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 81, n. 1, p. 140–4, 1 jan. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6582470>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

FALCAO, Loeni L. *et al.* Antimicrobial properties of two novel peptides derived from Theobroma cacao osmotin. **Peptides** v. 79, p. 75–82, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978116300304?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2018.

FAN, Zheng *et al.* Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus peptide from the venom of the scorpion Chaerilus tricostatus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 55, n. 11, p. 5220–5229, 2011. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/55/11/5220>>.0066-4804.

FISHER, Jed F; MOBASHERY, Shahriar. β -Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and Mycobacterium tuberculosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine** v.

6, n. 5, p. a025221, 2 maio 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091943>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GAUTIER, Romain *et al.* HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics** v. 24, n. 18, p. 2101–2102, 15 set. 2008. Disponível em:

<[https://academic.oup.com/bioinformatics/article-](https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btn392)

lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btn392>. Acesso em: 27 set. 2018.

GOMES, Isabela Pereira. **Síntese, estudos estruturais, conformacionais e de interação do peptídeo antimicrobiano HSP-1 em meios biomiméticos**. Acervo UFVJM, 2016. 124 p.

Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1132>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GONZÁLEZ-CANDELAS, Fernando *et al.* The Evolution of Antibiotic resistance. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2011. p. 305–337. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123848901000121?via%3Dihub>>.

9780123848901.

GUO, Xiaoxiao *et al.* Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie** v. 95, n. 9, p. 1784–1794, 1 set. 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908413001648?via%3Dihub>>.

Acesso em: 27 set. 2018.

GURGEL, Thaís C; CARVALHO, Wânia S. A assistência farmacêutica e o aumento da

resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy** v. 27, n. 1, p. 118–123, 2008. Disponível em:

<http://www.latamjpharm.org/resumenes/27/1/LAJOP_27_1_7_1.pdf>. Acesso em: 27 set.

2018.

HANCOCK, Robert E. W.; NIJNIK, Anastasia; PHILPOTT, Dana J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology** v. 10, n. 4, p. 243–254, 16

abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421877>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

HANCOCK, Robert E W; SAHL, Hans Georg. *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. **Nature Biotechnology**. [S.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160061>>. Acesso em: 13 jun. 2019. , 11 dez. 2006

HARRISON, Patrick L. *et al.* Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon** v. 88, p. 115–137, 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114001688?via%3Dihub>>.0041-0101.

HARRISON, Patrick L. *et al.* Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of *Scorpio maurus palmatus*. **Toxicon** v. 117, p. 30–36, 2016. Disponível

em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010116300538?via%3Dihub>>.

HASSAN, M. *et al.* Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology** v. 113, n. 4, p. 723–736, out. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583565>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

HECHT, David W.; *et al.* Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite. **Clinical and Laboratory Standards Institute** v. 32, n. 5, p. 1–38 , 2012. Disponível em: <www.clsi.org>.1562385879.

HEINEN, Tiago Elias *et al.* Effects of Lonomia obliqua caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines. **Cytotechnology** v. 66, n. 1, p. 63–74 , 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10616-013-9537-7>.0920-9069 (Print)r0920-9069 (Linking).

HICKMAN, Cleveland P; ROBERTS, Larry S; LARSON, Allan. **Princípios integrados de zoologia**. 11. ed. ed. Rio de Janeiro, 2004: Guanabara Koogan, 2004, 2016. 846 p. CITAÇÃO.9780073524214.

HOLTJE, H.-D. *et al.* Introduction to Comparative Protein Modeling. **In: Molecular Modeling. Basic Principles and Applications**. [S.l: s.n.], 2008. p. 111–180. 9783527315680.

HONG, Wei *et al.* Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research** v. 102, n. 1, p. 1–10 , 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213003550?via%3Dihub>.

HOVMÖLLER, Sven; ZHOU, Tuping; OHLSON, Tomas. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography** v. 58, n. 5, p. 768–776 , 2002. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444902003359>.0907-4449.

HUIJBERS, Patricia M.C. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms. **Veterinary Microbiology** v. 176, n. 1–2, p. 120–125 , 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514005835?via%3Dihub>.1873-2542r0378-1135.

HWANG, In Sok *et al.* Synergistic effect and antibiofilm activity between the antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria. **Current Microbiology** v. 66, n. 1, p. 56–60 , jan. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-012-0239-8>.

ILIĆ, Nada *et al.* Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1828, n. 3, p. 1004–1012 , 1 mar. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273612004087>. Acesso em: 24 jun. 2019.

IRAZABAL, Luz noemí. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional**. Universidade de Brasília, 2016. 101 p.

KIM, Young Soo; CHA, Hyung Joon. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. **Biotechnology**

and Bioengineering v. 107, n. 2, p. 216–223 , 20 maio 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22810>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

KING, Glenn F.; HARDY, Margaret C. Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. **Annual Review of Entomology** v. 58, n. 1, p. 475–496 , 7 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-120811-153650>>. Acesso em: 27 set. 2018.

KITAGAWA, Haruaki *et al.* Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry** v. 47, p. 18–22 , 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571216300239?via%3Dihub>>.

KOVAŘÍK. František *et al.* **Scorpions of Ethiopia. Part IV. Genus Uroplectes Peters, 1861 (Scorpiones: Buthidae)**. [S.l: s.n.], 2016. Disponível em: <<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:AE9EEC2B-8D5B-4699-B9CE-595C26EB9C1B>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

LADRAM, Ali; NICOLAS, Pierre. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. **Frontiers in Bioscience - Landmark** v. 21, n. 7, p. 1341–1371 , 2016. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/2016/v21/af/4461/list.htm>>.

LASKOWSKI, Roman A. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR** v. 8, n. 4, p. 477–486 , 1996. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2FBBF00228148>>.1111111111.

LEE, Jin Kyung *et al.* Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. **Journal of Endodontics** v. 39, n. 12, p. 1625–1629 , dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239913006560>>.

LI, Lirong *et al.* Mechanism of antifungal activity of antimicrobial peptide APP, a cell-penetrating peptide derivative, against *Candida albicans*: intracellular DNA binding and cell cycle arrest. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 100, n. 7, p. 3245–3253 , 8 abr. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-7265-y>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

LUNA-RAMÍREZ, Karen *et al.* Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoii*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. **Toxicon** v. 63, p. 44–54 , 1 mar. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112008124?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2018.

LUPETTI, A. *et al.* Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v. 27, n. 11, p. 1125–1129 , 20 nov. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-008-0553-z>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John; BENDER, Kelly. **Microbiologia de Brock**. 14^o ed. [S.l: s.n.], 2016. 987 p. applicability for this approach.9788578110796.

MAHLAPUU, Margit *et al.* Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic

Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** v. 6, p. 194 , 27 dez. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00194/full>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

MARR, A; GOODERHAM, W; HANCOCK, R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology** v. 6, n. 5, p. 468–472 , out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890021>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

MELETIS, Georgios. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease** v. 3, n. 1, p. 15–21 , 10 fev. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2049936115621709>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

METHATHAM, Thanachai *et al.* Antiviral action of the antimicrobial peptide ALFPm3 from *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. **Developmental & Comparative Immunology** v. 69, p. 23–32 , 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X16303639>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

MIGLIOLO, Ludovico *et al.* Structural and Functional Characterization of a Multifunctional Alanine-Rich Peptide Analogue from *Pleuronectes americanus*. **PLoS ONE** v. 7, n. 10, p. 1–13 , 8 out. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047047>>. Acesso em: 27 set. 2018.

MIGLIOLO, Ludovico *et al.* Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1858, n. 7, p. 1488–1498 , 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273616301298?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2018.

MIHAJLOVIC, Maja; LAZARIDIS, Themis. Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1818, n. 5, p. 1274–1283 , 1 maio 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527361200020X?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2019.

MOJSOSKA, Biljana; ZUCKERMANN, Ronald N.; JENSSEN, Håvard. Structure-Activity Relationship Study of Novel Peptoids That Mimic the Structure of Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 59, n. 7, p. 4112–4120 , 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/59/7/4112.short>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

MUNOZ-PRICE, L Silvia *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases** v. 13, n. 9, p. 785–796 , 1 set. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913701907>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 45, p. 382–384 , 1960. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19611403400>>. Acesso em: 27 set. 2018.

- NGUYEN, Leonard T.; HANEY, Evan F.; VOGEL, Hans J. *The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action*. **Trends in Biotechnology**. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779911000886?via%3Dihub>>. , 2011
- OLIVEIRA, Daiane Medeiros De; LACERDA, Ariane Ferreira. Peptídeos antimicrobianos: biotecnologia aplicada a saúde. **Revista de Saúde da Fiaciplac** v. 1, n. 1, p. 31–45 , 2014. Disponível em: <<http://revista.faciplac.edu.br/index.php/RSF/article/view/56>>.
- ORRY, Andrew J. W.; ABAGYAN, Ruben (Orgs.). **Homology Modeling**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. 857 v. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-588-6>>. Acesso em: 27 set. 2018. (Methods in Molecular Biology). .978-1-61779-587-9.
- PEDRON, Cibele Nicolaski *et al.* Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 126, p. 456–463 , 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416309795?via%3Dihub>>.
- PEREIRA, Milca Severino *et al.* A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto & Contexto - Enfermagem** v. 14, n. 2, p. 250–257 , 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-07072005000200013&lng=pt&tlng=pt>.0104-0707.
- PORTO, William F.; PIRES, Állan S.; FRANCO, Octavio L. CS-AMPPred: An Updated SVM Model for Antimicrobial Activity Prediction in Cysteine-Stabilized Peptides. **PLoS ONE** v. 7, n. 12, p. e51444 , 11 dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051444>>. Acesso em: 7 ago. 2019.
- POWERS, Jon Paul S.; HANCOCK, Robert E.W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides** v. 24, n. 11, p. 1681–1691 , 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978103003425?via%3Dihub>>.0196-9781 (Print)r0196-9781 (Linking).
- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. *et al.* Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon** v. 76, p. 328–342 , 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113002559?via%3Dihub>>.0041-0101.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology** v. 7, n. 1, p. 95–99 , 1963. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283663800236?via%3Dihub>>.
- RAMÍREZ-CARRETO, Santos *et al.* Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. **Peptides** v. 34, n. 2, p. 290–295 , 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978112000629?via%3Dihub>>.1873-5169 (Electronic)r0196-9781 (Linking).
- RATES, Breno *et al.* Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide

diversity. **Toxicon** v. 52, n. 5, p. 611–618 , 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108004339?via%3Dihub>>.0041-0101 (Print)r0041-0101 (Linking).

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 24, n. 6, p. 536–547 , dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15555874>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

RICE, Louis B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. **Mayo Clinic Proceedings** v. 87, n. 2, p. 198–208 , 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025619611000760>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

RODRIGUES. Maria do Rosário et al. **Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos**. [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <www.dgs.pt>. Acesso em: 15 ago. 2019.

ROUSSILHON, Christian *et al.* The antimicrobial molecule trappin-2/elafin has anti-parasitic properties and is protective in vivo in a murine model of cerebral malaria. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 42243 , 9 set. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep42243>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

ROY, Ambrish; KUCUKURAL, Alper; ZHANG, Yang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols** v. 5, n. 4, p. 725–738 , 25 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2010.5>>. Acesso em: 27 set. 2018.

RTIMI, S. *et al.* Duality in the Escherichia coli and methicillin resistant Staphylococcus aureus reduction mechanism under actinic light on innovative co-sputtered surfaces. **Applied Catalysis A: General** v. 498, p. 185–191 , 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926860X15002148?via%3Dihub>>.

SADREDINAMIN, Mehrzad *et al.* Antimicrobial Peptides (AMPs). **Novelty in Biomedicine** v. 4, n. 2, p. 70–76 , 10 abr. 2016. Disponível em: <<http://journals.sbmu.ac.ir/nbm/article/view/9158>>. Acesso em: 27 set. 2018.

SAMY, Ramar Perumal *et al.* Identification of natural peptides as a new class of antimalarial drugs by in silico approaches. **Frontiers in Bioscience - Scholar** v. 9, n. 1, p. 88–110 , 2017. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/2017/v9s/af/475/list.htm>>.

SAROJINI, Viji. Peptides: From Emil Fischer to Psa. **Chemistry in New Zealand** v. 1142, p. 79–86 , 2013. Disponível em: <<https://nzic.org.nz/app/uploads/2018/06/CiNZ-July-2013-min.pdf#page=19>>.

SHEN, Yang *et al.* TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. **Journal of Biomolecular NMR** v. 44, n. 4, p. 213–223 , 23 ago. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10858-009-9333-z>>. Acesso em: 27 set. 2018.

- SISSOM, W. David. Scorpions (Scorpiones). **Medical and Veterinary Entomology** p. 489–504 , 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140437000236>>. Acesso em: 13 jun. 2019.9780128140437.
- STRÖMSTEDT, Adam A. *et al.* Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** v. 15, n. 6, p. 467–478 , 1 dez. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029410000488>>. Acesso em: 26 jun. 2019.
- STRYJEWSKI, Martin E.; JONES, Ronald N.; COREY, G. Ralph. Ceftaroline: Clinical and microbiology experience with focus on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after regulatory approval in the USA. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 81, n. 3, p. 183–188 , 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889314004878?via%3Dihub>>.
- SU, Xiaokai *et al.* Highly efficient antibacterial diblock copolypeptides based on lysine and phenylalanine. **Biopolymers** v. 107, n. 11, p. e23041 , 1 nov. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bip.23041>>. Acesso em: 14 maio 2019.
- TARAZI, Shadi. Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article. **The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents** p. 1–9 , 2015. Disponível em: <<http://imed.pub/ojs/index.php/IAJAA/article/view/1384>>.
- VALDEZ-VELÁZQUEZ, Laura L. *et al.* Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **PLoS ONE** v. 8, n. 6 , 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066486>>.1932-6203.
- VAN HOEK, Monique L. Antimicrobial peptides in reptiles. **Pharmaceuticals** v. 7, n. 6, p. 723–753 , 2014. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/7/6/723>>.1424-8247.
- VERLI, Hugo. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1 edição ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. 1689–1699 p. 53 v.
- VIANNA, Júlia Silveira *et al.* Drug Resistance in *Helicobacter Pylori*. **Arquivos de Gastroenterologia** v. 53, n. 4, p. 215–223 , dez. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032016000400215&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 27 set. 2018.
- WANG, Guangshun. **Antimicrobial peptides: Discovery, design, and novel therapeutic strategies**. [S.l: s.n.], 2010. 1–230 p. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=vn46DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Wang,+G+\(ed.\)+Antimicrobial+Peptides:+Discovery,+Design+and+Novel+Therapeutic+Strategies.+CABI,+England%3B+2010.&ots=51MO3Iywr8&sig=wrqjfswgR-EJfR_LpcdazJELk8o#v=onepage&q=Wan](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=vn46DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Wang,+G+(ed.)+Antimicrobial+Peptides:+Discovery,+Design+and+Novel+Therapeutic+Strategies.+CABI,+England%3B+2010.&ots=51MO3Iywr8&sig=wrqjfswgR-EJfR_LpcdazJELk8o#v=onepage&q=Wan)>. Acesso em: 11 jun. 2019.
- WANG, Guangshun. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** v. 1268, p. 43–66 ,

2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2285-7_3>. Acesso em: 11 jun. 2019.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **ISSN 1810-0791** v. 1, n. 4, p. 1–5 , 2004. Disponível em: <https://extensao.cederj.edu.br/material_didatico/sau2203/pdfs/aula05_LC.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.1810-0791.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Humana Press, 2017. 1654 v. p. 39–54. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-7231-9_4>. 978-1-58829-809-6.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research** v. 35, n. SUPPL.2, p. 407–410 , 8 maio 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkm290>>. Acesso em: 27 set. 2018.

XU, Xiaobo *et al.* Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii*. **Journal of Proteomics** v. 106, p. 162–180 , 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914002085?via%3Dihub>>.1874-3919.

YEAMAN, Michael R; YOUNT, Nannette Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological reviews** v. 55, n. 1, p. 27–55 , 1 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615953>>. Acesso em: 27 set. 2018.

YEUNG, Amy T. Y.; GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 68, n. 13, p. 2161–2176 , 15 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573784>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

YUAN, Wenying *et al.* Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides** v. 31, n. 1, p. 22–26 , 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978109004598>>.0196-9781.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** v. 415, n. 6870, p. 389–395 , 24 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807545>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

ZENG, Xian Chun *et al.* Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides** v. 45, p. 28–34 , 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978113001198?via%3Dihub>>.0196-9781.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics** v. 9, n. 1, p. 40 , 23 jan. 2008. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-40>>. Acesso em: 26 out. 2018.