



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MENILLA MARIA ALVES DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUELANTE, ANTIOXIDANTE, ANTICOAGULANTE,
IMUNOMODULADORA E CICATRIZANTE DO PEPTÍDEO ANIÔNICO (TanP) DA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus*.**

NATAL/RN

2021

MENILLA MARIA ALVES DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUELANTE, ANTIOXIDANTE, ANTICOAGULANTE,
IMUNOMODULADORA E CICATRIZANTE DO PEPTÍDEO ANIÔNICO (TanP) DA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus*.**

Tese apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Bioanálises e Medicamentos).

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

NATAL/RN

2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Melo, Menilla Maria Alves de.

Avaliação da atividade quelante, antioxidante, anticoagulante, imunomoduladora e cicatrizante do peptídeo aniônico (TanP) da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* / Menilla Maria Alves de Melo. - 2021.

96f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2021.

Orientador: Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

1. Escorpião (*Tityus stigmurus*) - Tese. 2. Peptídeo aniônico - Tese. 3. Quelante - Tese. 4. Antioxidante - Tese. 5. Imunomodulador - Tese. I. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 596.46

Menilla Maria Alves de Melo

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUELANTE, ANTIOXIDANTE,
ANTICOAGULANTE, IMUNOMODULADORA E CICATRIZANTE
DO PEPTÍDEO ANIÔNICO (TanP) DA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Tityus stigmurus*.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Presidente – UFRN

Dr. Eneas de Carvalho
Examinador Externo – Butantan

Prof. Dr. Norberto de Kássio Vieira Monteiro
Examinador Externo – UFC

Profa. Dra. Cristiane Fernandes de Assis
Examinador Interno – UFRN

Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes
Examinador Interno – UFRN

Natal, 30 de junho de 2021

NATAL / RN
2021



Emitido em 30/06/2021

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº ATA Nº 16/2021 - PPGCF/CCS (15.27)
(Nº do Documento: 6)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 07/07/2021 21:04)

CRISTIANE FERNANDES DE ASSIS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFARM/CCS (15.13)
Matrícula: 2378605

(Assinado digitalmente em 08/07/2021 10:34)

DANIEL DE LIMA PONTES
DIRETOR - TITULAR
AGIR/UFRN (11.24.12)
Matrícula: 1715109

(Assinado digitalmente em 09/07/2021 08:28)

MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFARM/CCS (15.13)
Matrícula: 1544647

(Assinado digitalmente em 08/07/2021 12:23)

ENÉAS DE CARVALHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 260.079.118-37

(Assinado digitalmente em 09/07/2021 10:28)

NORBERTO DE KÁSSIO VIEIRA MONTEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 050.117.384-69

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: **6**,
ano: **2021**, tipo: **DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO**, data de emissão: **07/07/2021** e o código de verificação:
e410e908c4

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a todo o universo que sempre conspira a favor dos meus sonhos. À minha família: Dona Marta e Diocílio (mãe e padrasto), Mylane e Melina (irmãs – 1/3M), Julia e Laura (sobrinhas amadas), Márcio e Eloy (cunhados queridos); obrigada pela paciência, força e boas energias de sempre. Ao meu parceiro e companheiro de vida, Amaury, por toda paciência, cumplicidade, amor e torcida.

Agradeço também (MUITO) ao meu orientador, Prof. Matheus Pedrosa, por todos os ensinamentos, por sua gentileza, palavras de incentivo e orientação, e pelo desafio que me foi proposto, bem como pela confiança depositada. Aos colaboradores diretos e indiretos desse trabalho, que fizeram toda a diferença para que esse projeto desse certo: Prof. Euzébio Guimarães, Prof. Daniel Pontes, Prof. Hugo Rocha, Prof. Miguel Ângelo, Dr. Sérgio Rushi, Dr. Eneas Carvalho, Dra. Verônica Oliveira, Dra. Alessandra Daniele, Dr. Moacir Queiroz, Dra. Allany Furtado, Dra. Yamara Arruda, Msc Diana Pontes, Msc Wesley Paiva. Obrigada por todas as experiências e conhecimentos compartilhados, e ajuda nos experimentos.

Agradeço aos amigos e colegas do TECBIOFAR (em especial Lucas, Alessandra, Allany, Fiamma). Obrigada pela amizade além das bancadas, pelas palavras de incentivo e ombro amigo. Foi uma jornada EXCEPCIONAL, principalmente por compartilhar o dia a dia com vocês. Agradeço aos amigos da vida e de sempre (sem citações, rsrs). Já dizia Tom Jobim “é impossível ser feliz sozinho”.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN (todos os docentes/pesquisadores envolvidos e funcionários da secretaria) por esses 8 anos de convivência e aprendizado. À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, mediante aprovação de projetos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço A MIM! Pela persistência, resiliência, determinação e coragem para chegar ao fim desse ciclo, mesmo com todas as adversidades. “A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível – Alice no país das maravilhas”.

*“Faça o seu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores para
fazer melhor ainda!”*

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Peptídeos aniônicos, ou ácidos, de escorpiões correspondem a classe de peptídeos sem ligações dissulfeto, ricos em resíduos de ácido aspártico e/ou glutâmico em sua sequência primária. TanP é um peptídeo aniônico, linear, com 50 resíduos de aminoácidos e carga líquida -20, identificado na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* através de uma análise transcriptômica e com posterior confirmação por espectrometria de massas. Um estudo anterior indicou que TanP possui potencial quelante para o íon Cu^{2+} , além de potencial imunomodulador. A aplicação terapêutica de moléculas quelantes está relacionada a casos de intoxicações agudas ou crônicas por metais, doenças neurodegenerativas, doenças hematológicas, cicatrização de feridas cutâneas, doenças cardiovasculares e câncer. Neste estudo foi realizada a avaliação da atividade quelante de TanP com relação a novos metais de importância biológica (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}), através da espectroscopia UV-visível, métodos computacionais e espectroscopia de fluorescência, bem como ampliado a investigação do potencial biológico do peptídeo, como molécula antioxidante, hemostática, imunomoduladora e cicatrizante de feridas, através de ensaios *in vitro*. TanP (25 μM) foi capaz de formar complexos estáveis com Fe^{2+} numa proporção de 1:5 (TanP: Fe^{2+}). As geometrias obtidas para os complexos Zn^{2+} e Fe^{2+} apresentaram formas tetraédricas e octaédricas, respectivamente. Resultados teóricos sugerem que TanP pode funcionar como um sensor para identificar e quantificar íons Fe^{2+} . A intensidade de fluorescência de TanP (1,12 μM) diminuiu significativamente após adição de Fe^{2+} , obtendo-se que a maior relação 1:7,4 (TanP: Fe^{2+}) levou à menor intensidade de fluorescência. TanP apresentou o máximo de 3% de atividade hemolítica quando avaliado na maior concentração (50 μM). TanP exibiu capacidade de sequestro dos radicais DPPH acima de 70% em todas as concentrações testadas (1 a 25 μM), 89,7% de atividade quelante de ferro em 25 μM e 96% de atividade de sequestro do radical hidroxila em 73,6 μM . TanP apresentou também atividade anticoagulante significativa nas concentrações de 12,5 μM e 25 μM para os ensaios de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa). Nenhum efeito fibrinogenolítico foi observado. TanP (12,5 e 25 μM) induziu liberação de $\text{TNF-}\alpha$ por macrófagos murinos, na ausência de lipopolissacarídeo (LPS), sendo esse aumento dose-dependente. A migração de células 3T3 foi estimulada por TanP (2 μM , 12,5 μM e 50 μM) em ensaio de cicatrização *in vitro*. Dessa forma, sugere-se que a avaliação do potencial quelante associado a ação antioxidante, anticoagulante, imunomodulador e cicatrizante de TanP poderá fornecer subsídios para maiores estudos que viabilizem o desenvolvimento de uma molécula protótipo para aplicação terapêutica e biotecnológica.

Palavras-chave: Peptídeo aniônico. Quelante. Antioxidante. Imunomodulador. *Tityus stigmurus*.

ABSTRACT

Anionic peptides, or acids, of scorpions correspond to the class of peptides without disulfide bonds, rich in aspartic and / or glutamic acid residues in their primary sequence. TanP is a linear anionic peptide, with 50 amino acid residues and net charge -20, which is present in the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*, identified by a transcriptomic approach and after confirmed by mass spectroscopy. A previous study indicated that TanP has a chelating potential for Cu^{2+} ion, in addition to an immunomodular potential. The therapeutic application of chelating molecules is related to cases of acute or chronic intoxication by metals, neurodegenerative diseases, hematological diseases, healing of skin wounds, cardiovascular diseases and cancer. This work evaluated TanP chelating activity in relation to new metals of biological importance (Fe^{2+} , Ca^{2+} and Zn^{2+}), by UV-visible spectroscopy, computational methods, and fluorescence, as well as expanding the investigation of the biological potential of the peptide, as an antioxidant, hemostatic, immunomodulatory and wound healing molecule, by in vitro assay. TanP (25 μM) was able to form stable complexes with Fe^{2+} in a ratio of 1: 5 (TanP: Fe^{2+}). The obtained geometries for Zn^{2+} and Fe^{2+} complexes present tetrahedral and octahedral shapes, respectively. Theoretical results suggest that TanP can work as a sensor to identify and quantify Fe^{2+} ions. The fluorescence intensity of TanP (1.12 μM) decreased significantly after the addition of Fe^{2+} , obtaining that the highest ratio 1: 7.4 (TanP: Fe^{2+}) led to the lowest fluorescence intensity. TanP showed a maximum of 3% of hemolytic activity when evaluated at the highest concentration (50 μM). TanP exhibited DPPH radical scavenging above 70% at all concentrations tested (1 to 25 μM), 89.7% iron chelating activity at 25 μM , 96% hydroxyl radical scavenging activity at 73.6 μM . TanP showed significant anticoagulant activity at concentrations of 12.5 μM and 25 μM for the TP and TTPa assays. No fibrinogenolytic effect was observed. TanP (12.5 and 25 μM) induced release of $\text{TNF-}\alpha$ by murine macrophages, in the absence of LPS, this increase being dose-dependent. The migration of 3T3 cells was stimulated by TanP (2 μM , 12.5 μM and 50 μM) in an in vitro healing assay. Thus, it is suggesting that the assessment of the chelating potential associated with the antioxidant, anticoagulant, immunomodulatory and healing effects of TanP supports further studies that enable the development of a prototype molecule for therapeutic and biotechnological applications.

Keywords: Anionic peptide. Chelating. Antioxidant. Immunomodulator. *Tityus stigmurus*.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	15
Figura 2. Estruturas químicas de moléculas dos aminoácidos: ácido aspártico e ácido glutâmico.....	26
Figura 3. Espectro de absorção na região do Uv-Vis de TanP em meio aquoso em uma solução diluída (1,12 μM) e concentrada (25 μM)	47
Figura 4. Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP e íons metálicos. (A) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (23,6 μM) e Ca^{2+} (4,0 a 120 μM). (B) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (23,6 μM) e Zn^{2+} (4,0 a 120 μM). (C) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (25 μM) e Fe^{2+} (0 a 225,0 μM).....	48
Figura 5. Variação da absorbância do TanP em função da variação da concentração dos íons Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} . (A) Absorbância versus concentração dos íons no comprimento de 255 nm. (B) Absorbância versus concentração dos íons no comprimento de 275 nm.....	50
Figura 6. Estrutura calculada no nível da teoria BP86 / Def2-TZVP para os complexos (A) $\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ e (B) $\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2$. Distâncias de ligação relevantes (Å) e ângulos são exibidos.....	51
Figura 7. Espectros eletrônicos teóricos e transições eletrônicas verticais dos complexos $\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ (linha azul) e $\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (linha verde) em água, calculados pelo modelo TD-DFT (no nível teórico CAM-B3LYP / Def2-TZVP)	52
Figura 8. Diagrama de energia NBO para os complexos $\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ e $\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2$	55
Figura 9. Imagens NBO envolvidas nas principais transições eletrônicas obtidas para o complexo $\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4$	56
Figura 10. Imagens NBO envolvidas nas principais transições eletrônicas obtidas para o complexo $\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2$	57
Figura 11. Demonstração da fluorescência de TanP	58
Figura 12. Espectro de fluorescência de TanP. Peptídeo em solução (água) com concentração de 1,12 μM	59
Figura 13. Espectro de fluorescência representativo de TanP (1,12 μM) após adição: (A) Fe^{2+} (0 a 47,7 μM) e (B) Zn^{2+} (0 a 50 μM)	60

Figura 14. Intensidade de fluorescência de TanP em 353 nm com o aumento das concentrações de Fe^{2+} e Zn^{2+} ...	60
Figura 15. Atividade hemolítica de TanP <i>in vitro</i>	64
Figura 16. Atividade antioxidante de TanP. (A) Porcentagem de sequestro do radical DPPH, em que o eixo y corresponde a porcentagem de atividade de sequestro de DPPH. (B) Porcentagem do efeito quelante de ferro de TanP, em que o eixo y corresponde a porcentagem da atividade quelante de íons ferro. (C) Porcentagem do efeito do sequestro de radical hidroxila, em que o eixo y corresponde a porcentagem da atividade de sequestro de radical hidroxila.....	66
Figura 17. Avaliação da atividade anticoagulante de TanP <i>in vitro</i> . (A) Ensaio de Tempo de Protrombina. (B) Ensaio de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada.....	69
Figura 18. Esquema da cascata da coagulação, proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias.....	70
Figura 19. Atividade fibrinogenolítica de TanP. (A) Gel de SDS-PAGE 12%, corado por Coomassie Brilliant Blue G-250. (B) Análise densitométrica da degradação das cadeias A α e B β do fibrinogênio.....	71
Figura 20. Efeito de TanP nos níveis de citocinas em sobrenadante de macrófagos murinos. (A) Liberação de citocina TNF- α na presença ou ausência de LPS. (B) Liberação de citocina IL-6 na presença ou ausência de LPS.....	73
Figura 21. Efeito de TanP na proliferação de células 3T3, <i>in vitro</i> , após 24 h de tratamento.....	76
Figura 22. Imagens representativas da migração de 3T3 tratados com TanP após o ensaio do Scratch.....	78
Figura 23. Migração celular de células 3T3 tratadas com TanP após ensaio de <i>Scratch</i>	79

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Exemplos de peptídeos com potencial terapêutico e biotecnológico identificados em peçonhas de algumas espécies de escorpiões.....	21
Quadro 2. Peptídeos aniônicos identificados em glândulas de peçonha de escorpiões.....	27
Tabela 1. Titulações dos metais para ensaio de reatividade.....	38
Tabela 2. Energia / comprimento de onda, força do oscilador (f) e tipo de orbitais envolvidos nas transições eletrônicas calculadas no nível de teoria CAM-B3LYP / Def2-TZVP para os complexos $\text{Fe(Asp.)}_2(\text{H}_2\text{O})_4$ e $\text{Zn(Asp.)}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DPPH	1-Difenil-2-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Glu	Ácido Glutâmico
His	Histidina
IL-6	Interleucina-6
Leu	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NBO	Orbitais naturais de ligação
NO	Óxido nítrico
NTO	Orbitais naturais de transição
PAM	Peptídeo antimicrobiano
TanP	Peptídeo Aniônico do <i>Tityus stigmurus</i>
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSLDs	Peptídeos sem ligações de sulfeto
RAW 264.7	Linhagem celular normal de macrófagos murinos
SBF	Soro Bovino Fetal
TCA	Ácido Tricloroacético
Tyr	Tirosina
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
TistH	Hipotensina do escorpião <i>Tityus stigmurus</i>
Val	Valina
3T3	Linhagem celular normal de fibroblastos de murinos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	15
2.2 Componentes da peçonha do escorpião <i>T. stigmurus</i>	18
2.3 Peptídeos de escorpiões com potencial terapêutico e biotecnológico	21
2.4 Peptídeos Aniônicos de escorpiões.....	26
2.5 Peptídeos quelantes de metais	31
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Síntese do peptídeo TanP	37
4.2 Reatividade do TanP com Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} via espectroscopia Uv-Vis	37
4.3 Reatividade do TanP com Fe^{2+} e Zn^{2+} via Espectroscopia de Fluorescência.....	38
4.4 Métodos computacionais	39
4.5 Atividade hemolítica de TanP	39
4.6 Avaliação da atividade antioxidante in vitro de TanP	40
4.6.1 Sequestro do radical DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)	40
4.6.2 Sequestro do radical Hidroxila	41
4.6.3 Quelação de Ferro	41
4.6.4 Sequestro do Radical Superóxido	42
4.6.5 Poder Redutor	42
4.7 Avaliação da atividade aticoagulante in vitro de TanP	43
4.7.1 Tempo de protrombina (TP).....	43
4.7.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)	43
4.7.3 Atividade fibrinogenolítica	44
4.8 Atividade imunomoduladora de TanP in vitro	44
4.9 Ensaio de viabilidade celular para células 3T3	45
4.10 Ensaio de migração celular in vitro	45
4.11 Análise estatística	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Avaliação da reatividade de TanP com metais bivalentes.....	47
5.2 Avaliação da atividade hemolítica de TanP in vitro.....	63
5.3 Avaliação do potencial antioxidante de TanP in vitro.....	65
5.4 Avaliação do potencial hemostático de TanP in vitro	68
5.5 Avaliação do potencial imunomodulador de TanP	72
5.6 Viabilidade celular de 3T3	76
5.7 Avaliação do potencial cicatrizante de TanP utilizando ensaio de migração celular	77
6. CONCLUSÕES.....	81
REFERENCIAS	82
APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

A peçonha de escorpiões constitui uma mistura complexa de componentes bioativos secretados por órgãos especializados, com potencial farmacológico e biotecnológico (ORTIZ et al., 2015; PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018). Os peptídeos presentes na peçonha de escorpiões podem ser classificados em dois diferentes grupos, de acordo com a sua estrutura: peptídeos com ligações dissulfeto (PLD) e peptídeos sem ligação dissulfeto (PSLD) (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; RASHID et al., 2014; PUCCA et al., 2016; LI et al., 2019).

Tityus stigmurus, também conhecido como escorpião amarelo, é a espécie de escorpião predominante na região Nordeste do Brasil, sendo responsável pelo maior número de casos de escorpionismo (BATISTA et al., 2007; FURTADO; DANIELE-SILVA, 2020a). Diferentes peptídeos com potencial biológico foram identificados a partir de uma análise transcriptômica da glândula de peçonha de *T. stigmurus* realizada por nosso grupo de pesquisa, sendo a classe de peptídeos aniônicos correspondente ao maior percentual de transcritos (27,22%), seguido dos peptídeos antimicrobiano (25,19%) (ALMEIDA et al., 2012).

Os peptídeos aniônicos, ou ácidos, de escorpiões correspondem a PSLDs ricos em resíduos de ácido aspártico (Asp) e/ou glutâmico (Glu) em sua sequência primária, estando presente nas famílias Buthidae e não-Buthidae (HE et al., 2013). Trata-se de uma nova classe de peptídeos da peçonha de escorpiões, que raramente foram identificados e com poucos estudos envolvendo sua caracterização. Geralmente apresentam ponto isoelétrico menor que 5,0, altamente hidrofílicos, compostos por regiões randômicas e com alguns domínios α -helicoidais (SHI et al., 2018) e de estruturas em espiral (NIE et al., 2012).

Com relação às outras espécies do gênero *Tityus* observou-se que 7,75%, 4,9% e 3,14% do total das toxinas expressas na peçonha dos escorpiões *T. serrulatus* (ALVARENGA, 2012), *T. bahiensis* e (OLIVEIRA et al., 2015) e *T. obscurus* (DE OLIVEIRA et al., 2018), respectivamente, correspondem a peptídeos aniônicos. Outros gêneros como *Centruroides tecomanus* (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013), *Buthus martensii* Karsch (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005), *Centruroides hirsuti palpus* (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2020), *Mesobuthus eupeus* (BARADARAN et al., 2018a) também apresentaram peptídeo aniônico na composição da peçonha.

Embora a função dos peptídeos aniônicos na peçonha não esteja totalmente elucidada, acredita-se que os peptídeos ácidos podem equilibrar o balanço de pH da peçonha, atuar sinergicamente com outras toxinas (ZENG et al., 2004; MA et al., 2009; HE et al., 2013a; DE OLIVEIRA et al., 2015) e fazer parte do sistema de defesa do hospedeiro em escorpiões e outros filos (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2020). Além disso, é sugerido também o seu potencial regulador das atividades dos peptídeos antimicrobianos da peçonha do escorpião, justificando por que as atividades de formação de poros dos peptídeos antimicrobianos nas células de armazenamento do escorpião não danificam as próprias células de armazenamento (SHI et al., 2018).

Peptídeos aniônicos presentes em animais vertebrados e invertebrados tem revelado ação antimicrobiana, imunomoduladora, e quelante de metais (LAI et al., 2002; SILVA et al., 2009; SEGURA-RAMÍREZ; SILVA JÚNIOR, 2018).

Até a presente data, de acordo com o PubMed, há 34 trabalhos publicados quando se realiza a busca com o descritor “*Tityus stigmurus*”, destes 12 (33,33%) são estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com relação a caracterização de moléculas presente na peçonha, descobertas a partir de uma análise transcriptômica.

A peçonha de *T. stigmurus* tem sido alvo de estudos no nosso grupo de pesquisa nos últimos anos e diferentes peptídeos têm sido identificados e caracterizados, demonstrando que possuem potencial bioquímico e farmacológico.

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi caracterizado pela primeira vez um peptídeo aniônico presente no escorpião *T. stigmurus*, denominado de TanP, com carga negativa de -20 e ponto isoelétrico teórico de 2,75. Ensaio *in vitro* demonstraram que o peptídeo possui atividade quelante de íons Cu^{2+} , e com potencial imunomodulador, uma vez que induziu a proliferação de macrófagos, bem como reduziu a liberação de óxido nítrico por essas células, na presença de lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) (MELO et al., 2017).

A aplicação terapêutica de moléculas quelantes está relacionada a casos de intoxicações agudas ou crônicas por metais (ANDERSEN; AASETH, 2002; ANDERSEN, 2005; SMITH, 2013), doenças neurodegenerativas (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2012), doenças hematológicas (PRETORIUS et al., 2014; LEITCH; GATTERMANN, 2019), cicatrização de feridas cutâneas (WRIGHT; RICHARDS; SRAI, 2014), doenças

cardiovasculares (SULTAN et al., 2017) e câncer (YU et al., 2012; ANTONIADES et al., 2013). Nessa abordagem foi realizada a avaliação da atividade quelante de TanP com relação a novos metais de importância biológica, bem como ampliado a investigação do potencial biológico do peptídeo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Escorpião *Tityus stigmurus*

Tityus stigmurus (Thorell, 1876) (Figura 1) é uma espécie de escorpião de relevância clínica, pertencente à família Buthiadae, com capacidade de partenogênese e predominantemente distribuído na região Nordeste do Brasil (VENANCIO et al., 2013), embora a sua presença tenha sido recentemente reportada no estado de São Paulo (BERTANI et al., 2018; FURTADO; DANIELE-SILVA, 2020a).

Figura 1. Escorpião *Tityus stigmurus*



Fonte: Fiamma Gláucia da Silva.

Os escorpiões *T. stigmurus* possuem coloração que varia de amarelo claro ao amarelo escuro e o comprimento total de 55 a 65 mm. Com relação a suas características morfológicas apresentam uma carapaça (prossoma), o cefalotórax, contendo um par de quelíceras, um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas. O abdômen (opistossoma) é dividido em tronco (mesossoma) e cauda (metassoma). A região do prossoma possui um triângulo na porção anterior aos olhos medianos, com uma listra negra central no mesossoma. O télson constitui de uma vesícula elíptica e bem proeminente. Os machos possuem segmentos metassomais mais largos e fêmur-tarsi do pedipalpo levemente mais longo que as fêmeas (ALMEIDA, 2010).

Segundo dados disponíveis no DATASUS, em 2019 os acidentes causados por escorpiões correspondem a maior parte dos acidentes por animais peçonhentos, estando a frente de acidentes por serpentes ou aranhas. A região Nordeste é a que mais notifica casos de escorpionismo, apresentando em 2019 um quantitativo de 69.181 casos, sendo o envenenamento por escorpião considerado um problema de saúde pública no Brasil (SILVA et al., 2016; DATASUS, 2020).

O quadro do envenenamento causado por *T. stigmurus* é semelhante ao observado em acidentes pelo *T. serrulatus*, espécie responsável pelo maior número de casos na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo caracterizado por dor, edema, eritema, parestesia, cefaleia, e vômitos (NENCIONI et al., 2018). Apenas em 1983, o primeiro caso com experiência clínica e terapêutica foi reportado em Recife (Pernambuco), onde foram registrados acidentes com crianças picadas por *T. stigmurus*, incluindo um óbito (LIRA-DA-SILVA; MONTEIRO DE AMORIM; KOBLEER BRAZIL, 2000).

O estudo realizado por Silva e colaboradores (SILVA et al., 2016) revelou que a peçonha de *T. stigmurus* causa alterações histológicas indicativas de lesão tubular renal em ratos, a qual acarreta em aumento da excreção de eletrólitos. É sabido que os principais efeitos causados pelas peçonhas de escorpião como danos ao miocárdio, arritmias cardíacas, edema pulmonar e choque são devidos, principalmente, à liberação de mediadores do sistema nervoso autônomo, central e processos inflamatórios, porém não há estudos experimentais nem dados clínicos demonstrando o efeito central da peçonha de *T. stigmurus* (NENCIONI et al., 2018).

A peçonha dos escorpiões é uma fonte rica de moléculas bioativas com alto potencial para aplicação terapêutica e biotecnológica (HARRISON et al., 2014; MELO et al., 2017), contendo principalmente peptídeos e proteínas como as neurotoxinas, fosfolipases, mucoproteínas, hialuronidases, fosfolipases (ALMEIDA et al., 2012; FURTADO; DANIELE-SILVA, 2020b), além de nucleotídeos, lipídios e aminas biogênicas (serotonina e histamina) (SILVA et al., 2016).

Uma análise proteômica da peçonha do escorpião *T. stigmurus* realizada por Batista e colaboradores (2007) evidenciou a presença de quinze novos componentes na peçonha, sendo quatro deles atuantes em canais de sódio ou potássio (Tst-17, Tst-3, Tst β KTx), um

peptídeo rico em prolina (Pape) e entre os onze componentes parcialmente sequenciados estavam duas enzimas: hialuronidase e lisozima.

Posteriormente, foi realizada, por nosso grupo de pesquisa, uma análise transcriptômica para caracterizar o perfil de expressão gênica da glândula de peçonha não estimulada do escorpião *T. stigmurus*. Como resultado obteve-se o repertório molecular da glândula de peçonha do escorpião *T. stigmurus*, e os clusters foram organizados em três categorias: proteínas semelhantes às conhecidas toxinas da peçonha (41%), moléculas com provável atividade tóxica (34%) e proteínas associadas às funções celulares (15%). Dentre as toxinas conhecidas estão: α -KTX-like, β -KTX-like, α -NaTX-like, β NaTX-like, hipotensinas e peptídeos antimicrobianos. Cinco grupos corresponderam às moléculas com provável atividade tóxica: lectinas, metaloproteases, peptídeos aniônicos, peptídeos secretados hipotéticos e peptídeos ricos em cisteína (ALMEIDA et al., 2012).

Os peptídeos presente na peçonha de escorpiões podem ser classificados em dois grupos de acordo com a presença ou não de ligações dissulfeto (ZENG; LUO; LI, 2006; OLIVEIRA et al., 2015), ambos envolvidos em atividades multifuncionais.

Os peptídeos com ligações dissulfeto (PLD) são os componentes mais abundantes das peçonhas de escorpiões (GRASHOF et al., 2019) e possuem, em sua maioria, 3 a 4 ligações dissulfeto. São, em sua maioria, neurotoxinas que atuam em canais de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} (UZAIR et al., 2018). Tais moléculas são importantes para predação e estão envolvidas em inúmeras preocupações clínicas (ALMEIDA et al., 2013). Além disso são importantes ferramentas para a investigação das funções fisiológicas dos canais iônicos nas células e instrumentos relevantes nos estudos de estrutura e função dos canais iônicos (JOLODAR, 2019).

Os peptídeos sem ligações dissulfeto (PSLD), são relativamente pequenos, contendo entre 13 e 56 resíduos de aminoácidos, com sequência variável, podendo ser catiônicos ou aniônicos e com estrutura flexível (MACHADO et al., 2016), que exibem atividades multifuncionais como a ação antibacteriana, antifúngica, citolítica, antiviral, antimalárica, potenciadora de bradicinina, ativação de processos de sinalização celular, inflamação, modulação imunológica e alterações da pressão arterial (GAO et al., 2010; ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; MACHADO et al., 2015; ORTIZ et al., 2015; DANIELE-SILVA et al., 2016; PUCCA et al., 2016; DIAS et al., 2018; TORRES-RÊGO et al., 2019).

Até a presente data, de acordo com o PubMed, há 34 trabalhos publicados quando se realiza a busca com o descritor “*Tityus stigmurus*”, destes 12 (33,33%) são estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com relação a caracterização de moléculas presente na peçonha, descobertas a partir de uma análise transcriptômica.

A peçonha de *T. stigmurus* tem sido alvo de estudos no nosso grupo de pesquisa nos últimos anos e diferentes peptídeos têm sido identificados e caracterizados, demonstrando que possuem potencial bioquímico e farmacológico.

2.2 Componentes da peçonha do escorpião *T. stigmurus*

Os peptídeos representam os componentes mais abundantes da peçonha de escorpião. Peptídeos aniônicos (27,22%), peptídeos antimicrobianos (25,19%), toxinas alfa (α -KTx, 8,89%) e beta (β -KTx, 4,63%) que atuam no canal de potássio, peptídeos hipoteticamente secretados (3,70%), peptídeos com função desconhecida (1,48%), metaloproteases (1,30%), peptídeos hipotensores (1,11%), toxinas beta que atuam nos canais de sódio (β -NaTx, 0,93%), toxinas alfa que atuam nos canais de sódio (NaTx- α , 0,37%) e peptídeos ricos em cisteína (0,37%) constituem a peçonha do escorpião *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012; FURTADO; DANIELE-SILVA, 2020b)

As neurotoxinas interagem com os canais iônicos das células excitáveis, levando a uma liberação maciça de neurotransmissores (VASCONCELOS et al., 2005), os quais perturbam os sistemas neuromuscular, cardiovascular e respiratório e provocam um padrão complexo de sinais e sintomas clínicos que podem levar à morte em caso de picada por escorpião (HORTA et al., 2014). Embora as neurotoxinas sejam os componentes mais estudados nas peçonhas de escorpiões, são escassos os estudos realizados com relação a peçonha de *T. stigmurus*, havendo maior número de trabalhos relacionados aos diferentes PSLD.

Papp e colaboradores (2009) purificaram um alfa-KTx de *T. stigmurus* (Tst26), em que a sequência primária foi determinada por análise automática da degradação de Edman e espectrometria de massas. Tst26 inibiu os canais kv 1.2 e kv 1.3 com alta afinidade. Em seguida foi realizada uma caracterização estrutural e análise molecular do TstKMK, um peptídeo bloqueador de canal de potássio pertencente a subfamília β -ktx, com 47 resíduos de aminoácidos. Através de ensaios *in silico* de dinâmica molecular, ficou evidenciado que o

resíduo Lys46 do TstKMK seja provavelmente um resíduo importante no mecanismo de inibição para esse canal iônico (ALMEIDA et al., 2013).

Estudos moleculares também foram realizados com o peptídeo alpha-KTx do *T. stigmurus*, a fim de esclarecer o mecanismo dessa molécula com os canais de potássio. Os resíduos de aminoácidos foram mapeados e suas interações eletrostáticas e de contato foram avaliadas, revelando a influência de resíduos de lisina positivos e a contribuição adicional de uma asparagina para a estabilização do complexo, trazendo novas idéias sobre o mecanismo de ação dessa toxina (FREIRE et al., 2019).

Os peptídeos antimicrobianos representam o segundo grupo com maior expressão no transcriptoma do escorpião *T. stigmurus*. Os invertebrados carecem de um sistema imunológico adaptativo e dependem do sistema imunológico inato para proteção, desse modo esses peptídeos servem como seu principal mecanismo de defesa (YACOUN et al., 2020).

Os peptídeos antimicrobianos de peçonha de escorpiões são anfipáticos, com carga positiva ou negativa e podem ser convenientemente divididos em três categorias estruturais: (1) peptídeos contendo cisteína com pontes dissulfeto; (2) peptídeos com uma α -hélice anfipática, mas sem resíduos de cisteína e (3) peptídeos ricos em certos aminoácidos, como prolina e glicina (HARRISON et al., 2014). Tais moléculas se destacam por sua atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras e protozoários (CESA-LUNA et al., 2019).

Stigmurina e TsAP-2 são os peptídeos antimicrobianos catiônicos presentes na peçonha do escorpião *T. stigmurus*, com 17 resíduos de aminoácidos, em sua sequência madura, havendo predominância de conformação α -hélice quando em solvente que mimetiza o ambiente de membrana biológica (DE MELO et al., 2015; DANIELE-SILVA et al., 2016; AMORIM-CARMO et al., 2019). O TsAP-2, peptídeo idêntico ao presente na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, apresentou atividade bactericida contra cepas gram-positivas (GUO et al., 2013), já a Stigmurina apresentou atividade bacteriostática e bactericida apenas para bactérias gram-positivas, além de atividade antifúngica frente a leveduras (DE MELO et al., 2015). Ambos os peptídeos mostraram atividade antiproliferativa em relação a linhagem celular de HepG2, mas apenas a Stigmurina teve efeito citotóxico para SiHa, Vero, RAW 264.7 e MDCK. Ambos os peptídeos também foram eficientes no controle do foco infeccioso

na sepse polimicrobiana, reduzindo o infiltrado leucocitário no pulmão e ceco dos animais sépticos (DANIELE-SILVA et al., 2016).

A análise do cluster TSTI0006C revelou o peptídeo hipotensina de *T. stigmurus* (TistH), com 25 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 2,7 kDa, ausência de resíduos de cisteína e a presença de dois resíduos de prolina C-terminais. TistH possui predominância de conformação helicoidal em 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE), além de se mostrar estável, estruturalmente, em variáveis pH. TistH foi capaz de potencializar a ação hipotensora da bradicinina em ratos normotensos e induziu um efeito vasorrelaxante nos anéis da artéria mesentérica pela liberação dependente de endotélio do óxido nítrico. Revelando uma inibição independente da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo um peptídeo com potencial uso em doenças cardiovasculares (MACHADO et al., 2015).

Além de ação hipotensora, em estudos posteriores, TistH apresentou potencial antifúngico frente a leveduras e fungos que causam infecções orais, vaginais, candidíase e alergias respiratórias (MACHADO et al., 2016). Tal eficácia antifúngica foi otimizada através da incorporação do peptídeo em nanopartículas biodegradáveis de quitosana, de modo que este complexo apresentou maior atividade contra leveduras do gênero *Candida*, além de reduzir a formação do biofilme pelas mesmas (TORRES-RÊGO et al., 2019).

De acordo com a análise transcriptômica, os peptídeos aniônicos correspondem a classe mais abundante na peçonha de *T. stigmurus* (27,7%). Partindo-se da análise do cluster TSTI0012C, foi identificado o TanP (Peptídeo Aniônico do *T. stigmurus*), o qual possui uma sequência madura com 50 resíduos aminoácidos, sendo em sua maioria ácido aspártico, acarreatando-o uma carga negativa de -20. Com relação a estrutura secundária, TanP apresentou predominância de conformação randômica quando em tampão fosfato e α -hélice quando em TFE 50%, quando analisado por dicroísmo circular. O potencial quelante de cobre do peptídeo foi evidenciando por técnicas de dinâmica molecular, dicroísmo circular e espectroscopia Uv-Vis. Com relação a atividade biológica, o peptídeo não apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares MDCK e 786-0, entretanto apresentou efeito proliferativo em relação às células RAW 264.7, diminuindo ao mesmo tempo a liberação de óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório (MELO et al., 2017).

Informações moleculares sobre peptídeos de escorpião representam uma área de pesquisa importante e uma ferramenta biotecnológica em potencial para o desenvolvimento

de novos fármacos a serem utilizados no tratamento de diversas patologias (FREIRE et al., 2019), desse modo pesquisas objetivando elucidar o potencial terapêutico e caracterização de novos peptídeos da peçonha de *T. stigmurus* devem ser intensificadas.

2.3 Peptídeos de escorpiões com potencial terapêutico e biotecnológico

Devido a pressão seletiva aplicada aos escorpiões, estes conseguiram desenvolver uma série de peptídeos de peçonha que exibem diversas atividades biológicas e funções farmacológicas (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; ORTIZ et al., 2015; LI et al., 2019), sendo considerada uma grande fonte para medicamentos no tratamento de vários cânceres e doenças infecciosas (KAZEMI; SABATIER, 2019), epilepsia (ZHAO et al., 2011), doenças autoimunes (RASHID et al., 2014) e analgesia (CUI et al., 2010).

No quadro 1 estão descritos alguns peptídeos presentes na peçonha de diversas espécies de escorpião que possuem potencial terapêutico e/ou biotecnológico em estudo, sendo alvo para desenvolvimento de novos fármacos.

Quadro 1. Exemplos de peptídeos com potencial terapêutico e biotecnológico identificados em peçonhas de algumas espécies de escorpiões.

Espécie	Peptídeo	Atividade	Autores
<i>T. discrepans</i>	Discreplasminin	Inibidor de Plasmina	(BRAZÓN et al., 2009)
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	RK	Antitumoral (desintegrina)	(KHAMESSI et al., 2018a)
<i>Androctonus mauritanicus</i>	Mauriporin	Antimicrobiano e Antibiofilme	(ALMAAYTAH et al., 2014)
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Chlorotoxin	Detecção e tratamento de câncer (glioblastoma)	(OJEDA; WANG; CRAIK, 2016)
<i>Pandinus imperator</i>	Scorpine	Antibacteriano e antimalária	(CONDE et al., 2000)
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	IsCT1 e IsCT2	Antimicrobiano	(DAI et al., 2001)
<i>Hadrurus aztecus</i>	Hadrurin	Antimicrobiano	(TORRES-LARIOS et al., 2000)

<i>Pandinus imperator</i>	Pandinin 1 e 2	Antimicrobiano	(CORZO et al., 2001)
<i>Opisthophthal muscarinatus</i>	Opistoporin 1 e 2	Antimicrobiano	(MOERMAN et al., 2002)
<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKn1 e BmKn2	Antimicrobiano	(ZENG et al., 2004)
<i>Isometrus maculatus</i>	Imcroporin	Antimicrobiano	(ZHAO et al., 2009)
<i>Lychas mucronatus</i>	Mucroporin	Antimicrobiano	(DAI et al., 2008)
<i>Centruroides Suffusus Suffusus</i>	Css54	Antimicrobiano	(GARCIA et al., 2013)
<i>Vaejovis punctatus</i>	VpAmp1.0 VpAmp2.0	Antimicrobiano	(RAMÍREZ-CARRETO et al., 2015)
<i>Urodacus yaschenkoi</i>	Uy234, Uy17 e Uy192	Antimicrobiano	(CESA-LUNA et al., 2019)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp1404	Antimicrobiano	(LI et al., 2014)
<i>Tityus obscurus</i>	ToAP1 e ToAP2	Antifúngico	(GUILHELMELLI et al., 2016)
<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKn2	Antiviral	(CHEN et al., 2012)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp1090	Antiviral	(YAN et al., 2011)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP1 e AaeAP2	Antimicrobiano	(DU et al., 2015)
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	RK1	Anticâncer	(KHAMESSI et al., 2018b)
<i>Buthus martensi</i> Karsch	BmKAS	Analgesia	(CUI et al., 2010)
<i>Buthus martensi</i> Karsch	ANTP	Anticâncer	(LIU et al., 2002)
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Charybdotoxin	Anticâncer	(SCHWAB et al., 1999)
<i>Mesobuthus tamulus</i>	Iberiotoxin	Anticâncer	(GALVEZ et al., 1990)
<i>Buthus martensi</i> Karsch	ANEP	Analgesia e Antiepileptico	(LI et al., 2019)
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-1 e TsAP2	Anticâncer	(GUO et al., 2013)
<i>Tityus discrepans</i>	Neopladines 1 e 2	Anticâncer	(D'SUZE et al., 2010)
<i>Mesobuthus eupeus</i>	Meucin-24 e Meucin-25	Antimalárico	(GAO et al., 2010)

Fonte: Autoria própria.

Dentre as biomoléculas mais estudadas de interesse farmacológico presente na peçonha de escorpiões, destacam-se os peptídeos antimicrobianos (PAM), em que sua importância se dá por sua atividade de amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, leveduras e protozoários, além de apresentarem efeito sinérgico quando associados a fármacos já disponíveis na terapêutica antimicrobiana (GARCIA et al., 2013; HARRISON et al., 2014; GUILHELMELLI et al., 2016; MACHADO et al., 2016; WANG; WANG, 2016; PRIMON-BARROS; MACEDO, 2017; CESA-LUNA et al., 2019), sendo também sugerido que a presença de PAMs possa proteger a glândula de peçonha de infecção e facilitar a ação de outras neuro-toxinas (HARRISON et al., 2014).

Os PAMs de peçonha de escorpião são peptídeos anfipáticos com carga positiva e podem ser divididos em três categorias estruturais: (1) peptídeos contendo cisteína com ligações dissulfeto, como o Scorpine (CONDE et al., 2000); (2) peptídeos com uma α -hélice anfipática, mas sem resíduos de cisteína, como o hadrurin (TORRES-LARIOS et al., 2000) e o IsCT (DAI et al., 2001); e (3) peptídeos ricos em certos aminoácidos, como prolina e glicina (CORZO et al., 2001; HARRISON et al., 2014b; WANG; WANG, 2016).

Css54, peptídeo isolado do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*, teve sua atividade antibacteriana avaliada contra cepas de *Staphylococcus aureus*, na presença de antibióticos tuberculostáticos (rifampicina, pirazinamida, isoniazida e etambutol). Ao final, verificou-se que as misturas de Css54 e antibióticos comerciais aumentam a eficiência bacteriostática ou bactericida contra *S. aureus*. Esse fenômeno pode estar relacionado ao fato de os PAMs permearem as membranas celulares lipídicas e ajudarem na difusão de antibióticos de baixo peso molecular. Desse modo, os PAMs provavelmente formam lacunas na membrana celular que permitem a troca de material orgânico da região extracelular para o meio intracelular e vice-versa (GARCIA et al., 2013).

A atividade antiparasitária também tem sido observada em estudos envolvendo peptídeos de escorpião. Meucin-24 e Meucin-25, são peptídeos catiônicos e lineares, ambos componentes da peçonha do *Mesobuthus eupeus*, os quais apresentaram atividade antiparasitária sobre o parasita intraeritrocítico *Plasmodium falciparum*, causador da malária (GAO et al., 2010).

A principal desvantagem dos PAMs em geral é a citotoxicidade frequente contra células eucarióticas, o que limita sua aplicação clínica. Porém, o desenvolvimento de

peptídeos análogos, com substituição de aminoácidos da sequência primária do peptídeo nativo, para potencializar o espectro antimicrobiano, bem como diminuir sua toxicidade para células humanas, tornando-o mais seguro (PARENTE et al., 2018; AMORIM-CARMO et al., 2019).

Peptídeos com atividade antiviral foram anteriormente identificados, como o Hp1090 isolado da glândula de peçonha do escorpião *Heterometrus petersii*, que inibiu infecção por vírus de hepatite C *in vitro* (YAN et al., 2011). O BmKn2, presente na peçonha do escorpião *M. martensii* Karsch apresentou atividade contra o vírus do HIV (CHEN et al., 2012). Tais moléculas são bons candidatos ao desenvolvimento de novos medicamentos antivirais.

A resistência aos quimioterápicos pelas células cancerígenas tornou seu tratamento mais complicado e nesse contexto, as peçonhas de animais surgiram como uma estratégia alternativa para a terapêutica anticâncer, incluindo inibição da proliferação de células cancerígenas, invasão, parada do ciclo celular, indução de apoptose e identificação de vias de sinalização envolvidas (CHATTERJEE, 2018). Nesse contexto, tem-se que ambas as classes de peptídeos de escorpião, PLD e PSLD, possuem atividade anticâncer já descrita na literatura.

A ativação dos canais de Cl^- , Na^+ , K^+ e Ca^{2+} está envolvida na proliferação e apoptose celular. Os canais iônicos podem marcar a progressão do câncer através do crescimento de sinais de auto-suficiência, em que as células não são responsivas a sinais de anti-crescimento, apresentando resistência à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, capacidade de invasão tecidual e metástase. A ação de neurotoxinas da peçonha de escorpiões em canais iônicos indica o potencial anticâncer destes componentes, uma vez que esses peptídeos possuem alta especificidade, boa permeabilidade e estabilidade nas células cancerígenas (DUEÑAS-CUELLAR et al., 2020). São exemplos de neurotoxinas com atividade anticâncer a Charybdotoxin (ChTx), Iberiotoxin e Chlorotoxin, os quais atuam em canais de canal de potássio ativado por cálcio e cloreto, respectivamente.

Com relação aos peptídeos lineares de escorpião descritos na literatura com atividade anticâncer, há uma predominância pelos catiônicos. TsAP-1 e TsAP-2 são peptídeos presente na peçonha do escorpião brasileiro *T. serrulatus*, tendo o primeiro apresentando efeito antiproliferativo sobre linhagens tumorais de pulmão H157 e H838, e o segundo sobre as linhagens tumorais anteriormente citadas, além de MCF-7 (carcinoma mamário), PC3

(carcinoma de próstata) e U251-MG (glioblastoma) (GUO et al., 2013). Neopladines 1 e 2 foram purificados a partir da peçonha de *T. discrepans* e apresentaram atividade apoptótica em células de carcinoma de mama humano SKBR3 (D'SUZE et al., 2010).

Os PSLD são, em sua maioria, carregados positivamente, logo podem interagir facilmente com os grupos de lipídios com carga negativa das membranas biológicas. O processo de adesão à membrana impulsiona a formação estruturas helicoidais anfipáticas e a inserção dos resíduos hidrofóbicos na membrana, o que leva à sua atividade exibida. E uma vez que não há um alvo específico, como as neurotoxinas, isso resulta em seu amplo espectro de alvos biológicos, classificando esses peptídeos como multifuncionais (ORTIZ et al., 2015).

Embora já esteja descrito na literatura que componentes da peçonha de escorpião do gênero *Tityus* podem atuar como substâncias procoagulantes e anticoagulantes, alterando o tempo parcial de tromboplastina e o tempo de protrombina, além de alterar a agregação plaquetária (BRAZÓN et al., 2008, 2011), escassos trabalhos tem sido realizados com peptídeos isolados da peçonha de escorpiões para avaliação dos parâmetros de hemostasia.

Devido ao declínio do número de novos medicamentos aprovados nos últimos anos, a indústria farmacêutica apresenta uma tendência de buscar alternativas para desenvolver medicamentos inovadores. Nesse contexto, medicamentos à base de peptídeos podem ser uma alternativa para superar essa demanda, uma vez que a terapêutica biofarmacêutica está constantemente aumentando e um número inesperado de peptídeos terapêuticos sintéticos chegam ao mercado (PRIMON-BARROS; MACEDO, 2017).

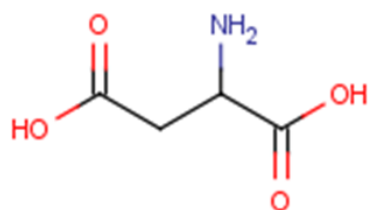
Como pode-se observar, os peptídeos com ligações dissulfeto e peptídeos lineares catiônicos são as classes de componentes mais estudadas e caracterizadas, quando se trata de escorpiões, quando comparado com peptídeos aniônicos, levando a necessidade da avaliação da ação e caracterização destes peptídeos presentes na peçonha de escorpiões da família Buthiadae e não Buthidae (DIEGO-GARCÍA et al., 2005; MA et al., 2009; RUIMING et al., 2010), uma vez que essas moléculas também possuem um potencial terapêutico e biotecnológico.

2.4 Peptídeos Aniônicos de escorpiões

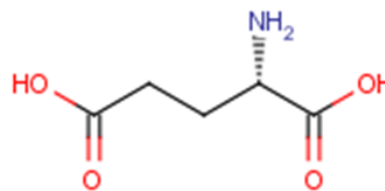
Os peptídeos de peçonha de escorpião sem ligações dissulfeto exibem diversas estruturas primárias, que são helicoidais e catiônicas com 13 a 47 resíduos de aminoácidos ou altamente ácidos com 19 a 50 resíduos, sendo classificados em peptídeos catiônicos ou aniônicos, respectivamente (NIE et al., 2012; ZHONG et al., 2017; SHI et al., 2018).

Peptídeos aniônicos são moléculas ricas em resíduos de aminoácidos ácidos: ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp) (Figura 2) (MA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012; HE et al., 2013b). Ambos os aminoácidos possuem dois grupos carboxilatos (COO^-) e caráter ácido. Em pH 7,0 os grupos carboxilatos encontram-se dissociados.

Figura 2. Estruturas químicas de moléculas dos aminoácidos: ácido aspártico e ácido glutâmico.



Ácido aspártico



Ácido glutâmico

Fonte: Autoria própria

Peptídeos aniônicos, também denominados de peptídeos ácidos, são uma nova classe de peptídeos de peçonha de escorpiões, que embora tenham sido relatados como peptídeos altamente expressos e conservados entre as espécies de escorpião Buthidae e não Buthidae, foram pouco caracterizados até o momento (BARADARAN et al., 2018a)

As propriedades comuns desses peptídeos são: altamente ácido com um ponto isoelétrico calculado menor que 5,0, elevado caráter hidrofílico, composto por regiões randômicas e com alguns domínios α -helicoidais (SHI et al., 2018), bem como apresentam principalmente estruturas em espiral (NIE et al., 2012). Nos últimos anos, mais de 20

peptídeos desse tipo foram identificados em espécies de escorpião, como citado no quadro 2 a seguir:

Quadro 2. Peptídeos aniônicos identificados em glândulas de peçonha de escorpiões.

Peptídeo Aniônico	Escorpião	Nº de aminoácidos do Peptídeo maduro	Referência
JK31735	<i>Tityus serrulatus</i>	49	(ALVARENGA et al., 2012)
C9X4J1.1	<i>Tityus discrepans</i>	51	(D'SUZE et al., 2009)
Q5G8B2, Q5G8A9, Q5G8B1 e Q5G8B0	<i>Tityus costatus</i>	49	(DIEGO-GARCÍA et al., 2005)
Tbah02322	<i>Tityus bahiensis</i>	50	(OLIVEIRA et al., 2015)
TanP	<i>Tityus stigmurus</i>	50	(MELO et al., 2017)
BmKa1 e BmKa2	<i>Buthus martensii</i> Karsch	38 e 50	(ZENG et al., 2004)
HAP-1	<i>Mesobuthus martensii</i> Karsch	19	(SHI et al., 2018)
SJE098.1 e SJE098.2	<i>Scorpiops jendeki</i>	57	(MA et al., 2009)
MeVAP-1, AMX81473.1, ABR21055.1, ABR20121.1, e ABR20108	<i>Mesobuthus eupeus</i>	49	(BARADARAN et al., 2018a)
P0CI96.1 e P0CI97	<i>Lychas mucronatus</i>	53 e 43	(RUIMING et al., 2010)
Aba-1 (KJ787284) e Aba-2 (KJ787285)	<i>Androctonus bicolor</i>	51 e 40	(ZHANG et al., 2015)
ChiHDPAni01	<i>Centruroides hirsutipalpus</i>	51	(VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2020)
Hta1, Hta2, Hta3, Hta4, Ht186 e Ht169	<i>Hadogenes troglodytes</i>	54	(ZHONG et al., 2017)

Fonte: Autoria própria.

Embora estudos envolvendo a função e mecanismo de ação de peptídeos aniônicos de escorpião ainda sejam raros, comparados a outras classes como os antimicrobianos, por exemplo, autores sugerem que essas moléculas fazem parte do sistema de defesa do hospedeiro em escorpiões e outros filos (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2020), que podem funcionar como um regulador das atividades dos peptídeos antimicrobianos da peçonha do escorpião (SHI et al., 2018).

Acredita-se que os peptídeos ácidos podem equilibrar o balanço de pH da peçonha, uma vez que as neurotoxinas são moléculas básicas, bem como atuar sinergicamente com outras toxinas (ZENG et al., 2004; MA et al., 2009; HE et al., 2013a; DE OLIVEIRA et al., 2015). TanP, um peptídeo aniônico identificado na peçonha de *T. stigmurus*, possui atividade quelante e potencial imunomodulador, uma vez que induz proliferação de macrófagos, ao mesmo tempo que diminui a liberação de óxido nítrico por essas células, quando estimuladas por LPS (MELO et al., 2017).

Na peçonha de *T. costatus* foram identificados quatro possíveis peptídeos antimicrobianos aniônicos, cujas cargas variam de -19 a -20, porém não há estudos de caracterização destes peptídeos na literatura (DIEGO-GARCÍA et al., 2005; HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). A análise transcriptômica da peçonha do *T. discrepans* apresentou que a sequência mais representativa correspondia a um precursor de peptídeo aniônico (TdAP) com 51 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico 2,78, revelando alta similaridade com os peptídeos ácidos de *T. costatus* (D'SUZE et al., 2009).

Peptídeos aniônicos também foram identificados na glândula da peçonha de escorpiões, por análise transcriptômica e proteômica, de outros gêneros da família Buthidae como o *Centruroides tecomanus* (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013), *Buthus martensii* Karsch (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005), *Centruroides hirsuti palpus* (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2020), *Mesobuthus eupeus* (BARADARAN et al., 2018a). Na peçonha do escorpião *Buthus occitanus israelis*, não tem sido identificados transcritos de peptídeos aniônicos (KOZMINSKY-ATIAS et al., 2008). Em *S. magerisonae* e *S. jendeki*, os precursores de peptídeos aniônicos representam 0,5 % e menos de 0,25% do total de transcritos, respectivamente (MA et al., 2009).

Ma e colaboradores (2012) apresentaram uma análise comparativa do transcriptoma das glândulas da peçonha e uma análise filogenética de peptídeos que seriam compartilhados

por escorpiões da família Buthidae (*Lychasmucronatus* e *Isometrus maculatus*) e Euscorpiidae (*Scorpiops margerisonae*). A análise filogenética molecular revelou que algumas classes de peptídeos, dentre elas os peptídeos aniônicos, estão presentes em as ambas famílias avaliadas e que esses peptídeos foram provavelmente recrutados no proteoma da peçonha de escorpião antes da divisão da linhagem entre Buthidae e Euscorpiidae, ocorrendo eventos no genoma de duplicação de genes individuais ou múltiplos. Os peptídeos aniônicos apresentaram altos níveis de expressão nas glândulas da peçonha dos escorpiões da família Buthidae *L. mucronatus* e *I. maculatus*, mas foram pouco expressos no *S. margerisonae*. No alinhamento realizado entre as sequências primárias dos peptídeos aniônicos, estas apresentaram grande diversidade, sugerindo que estes peptídeos devem estar presentes na peçonha de outras famílias de escorpião que ainda não foram examinados, como *Chaerilidae* sp., *Iuridae* sp., e *Vaejovidae* sp..

Outro estudo comparativo do transcriptoma da glândula da peçonha do escorpião *Lychas mucronatus*, de duas regiões geográficas diferentes classificou os peptídeos aniônicos encontrados como um tipo de peptídeo antimicrobiano, embora não tenham testado sua atividade. Os peptídeos aniônicos corresponderam a 12% e 6% dos peptídeos semelhantes a toxinas nos escorpiões das regiões de Hainan e Yunnan, respectivamente (RUIMING et al., 2010). Seis novos peptídeos ácidos (Hta1, Hta2, Hta3, Hta4, Ht186 e Ht169) sem ligações dissulfeto, foram identificados na glândula de peçonha do escorpião *Hadogene stroglydites*, correspondendo a 3,45% do total de transcritos obtidos (ZHONG et al., 2017).

BmKa1 e BmKa2, identificados na peçonha do escorpião chinês *Buthus martensi*, são ricos em aminoácidos ácidos, Asp e Glu (Asp+Glu: 39 and 36%, respectivamente). Possuem carga líquida de -12 e -13, respectivamente, e foram classificados como peptídeos de caráter ácido e hidrofílico, sem ligações dissulfeto. Não possuem ancestral comum com os demais PSLDs identificados em escorpiões (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005). Em relação à predição da estrutura secundária, BmKa1 possui 100% de estrutura randômica, enquanto BmKa2, peptídeo anfipático, possui três regiões randômicas separadas por 2 domínios α -hélice. Baseando-se na molécula BmKa1, sugeriu-se que este peptídeo poderia ser responsável por balancear o pH da peçonha, uma vez que a maioria dos demais peptídeos são catiônicos. Já BmKa2 poderia representar uma nova classe de peptídeos de defesa de escorpiões, uma vez

que apresenta sequencia semelhante a lipopeptídeos isolados de *Bacillus subtilis* (ZENG et al., 2004).

HAP-1 é um peptídeo de cadeia curta (19 aminoácidos) e altamente ácido, com ponto isoelétrico de 4,25 presente na glândula da peçonha do escorpião *Mesobuthus martensii* Karsch. Com relação a estrutura secundária, este peptídeo é composto de duas regiões randômicas separadas por uma β -folha. Embora não tenha apresentado atividade antimicrobiana para cepas gram positivas, gram-negativas e leveduras, bem como ter demonstrado efeito sinérgico quando associado a outro peptídeo antimicrobiano nativo da peçonha (ApHt_20), HAP-1 inibiu completamente a atividade antimicrobiana de ApHt_20, um peptídeo catiônico com 13 resíduos de aminoácidos, numa concentração mínima de 140 nM. Provavelmente, a inibição foi resultado da interação molecular entre HAP-1 e ApHt_20, uma vez que o pH do meio não foi alterado, modificando a estrutura em α -hélice do peptídeo catiônico (SHI et al., 2018).

He e colaboradores (2013) observaram dois *contigs* que codificam peptídeos aniônicos a partir de uma abordagem por transcriptômica da glândula da peçonha de *Chaerilus tryznai* e *Chaerilus tricostatus*, escorpiões da família Chaerilidae. Esta família tem um arsenal de peçonha específico que é intermediário entre as famílias Buthidae e não-Buthidae. Os peptídeos aniônicos revelaram ser os mais expressos no *Chaerilustri costatus*, coincidindo com a maior expressão de peptídeos antimicrobianos catiônicos também nesta espécie. Diante do achado, especulou-se que esse dado se relacione ao fato do peptídeo aniônico apresentar a função de equilibrar o pH da peçonha do escorpião, considerando-se que a abundância de outros tipos de toxinas foi semelhante entre *Chaerilus tricostatus* e *Chaerilus tryznai*.

TanP (cluster TSTI0012C), é um peptídeo de carga líquida -20, rico em resíduos de Asp e Glu, e massa molecular de 5,8 kDa, identificado na peçonha do escorpião *T. stigmurus* através de uma análise transcriptômica (ALMEIDA et al., 2012; MELO et al., 2017). Trata-se do primeiro peptídeo aniônico de escorpião caracterizado estruturalmente e com função biológica avaliada. A análise por discoísmo circular indicou predominância de conformação de randômica em meio aquoso, mas modificou sua estrutura em TFE, aumentando sua porcentagem helicoidal. TanP apresentou atividade quelante em íons de cobre, o que modificou a estrutura secundária do peptídeo, ocorrendo aumento de α -hélice. Semelhante

efeito na conformação estrutural do peptídeo tem sido relatado quando analisado por dinâmica molecular. Verificou-se também, por análise Uv-vis, que a razão molar de ligação (TanP: cobre) é dependente da concentração de peptídeo. Em menor concentração de TanP (2,11 μM), a razão molar foi de 1: 5 (TanP: Cu^{2+}), enquanto que na solução concentrada de TanP (23,6 μM) a razão molar foi de 1: 3 (TanP : Cu^{2+}). TanP também revelou potencial indução na proliferação de macrófagos murinos, ao passo que ainda diminui a liberação de óxido nítrico por tais células, quando sensibilizadas com um componente inflamatório, lipopolissacarídeos (MELO et al., 2017). Desta forma mais estudos são necessários para caracterizar o peptídeo TanP, uma vez que os estudos revelaram ser uma molécula com elevado potencial terapêutico e biotecnológico.

2.5 Peptídeos quelantes de metais

Íons metálicos são componentes indispensáveis para funcionalidade celular, estando envolvidos em vários processos essenciais como estabilização da estrutura do ácido nucleico e da proteína, catálise enzimática, transdução de sinal, contração muscular, secreção de hormônio, paladar e sensação de dor, respiração e fotossíntese (DUDEV; LIM, 2014). Dentre os cátions metálicos biogênicos, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} estão frequentemente envolvidos em processos bioquímicos. No entanto, apesar de sua essencialidade, metais em excesso ou mal regulados também estão implicados em uma série de doenças, desde infecção e câncer até distúrbios neurodegenerativos e metabólicos (WANG; FRANZ, 2017).

O uso de metais para restaurar a fisiologia normal do corpo, seja por administração direta de metais essenciais, quelação de metais em excesso ou tóxicos, uso como transportadores para a administração de drogas direcionadas, ou como marcador biomolecular para diagnóstico, constitui técnicas que podem ser classificadas sob o título geral de metalofarmacologia (FLORA; PACHAURI, 2010).

Dada a importância da homeostase do metal para a saúde ideal, o uso de pequenas moléculas ou peptídeos quelantes corresponde a uma estratégia atraente tanto para entender os fundamentos da regulação biológica do metal, quanto para desenvolver novas terapias (WANG; FRANZ, 2017).

Os agentes quelantes são compostos inorgânicos ou orgânicos capazes de se ligarem a íons metálicos de modo a formar complexos estruturais em forma de anel denominados “quelatos”. Tais compostos possuem átomos doadores que podem formar ligações covalentes coordenadas com centros metálicos. Os principais átomos que podem atuar como doadores são enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O) (FLORA; PACHAURI, 2010).

A composição de aminoácidos, a desprotonação do grupo ácido e as propriedades estruturais dos peptídeos são importantes fatores na determinação da atividade quelante de metal (YOUSR; HOWELL, 2015; WU et al., 2017), enquanto que a constante de estabilidade do complexo depende da estrutura atômica dos metais quelados (FLORA; PACHAURI, 2010). As interações podem ser aumentadas ou diminuídas modificando os resíduos de aminoácidos presentes na sequência do peptídeo (CARLTON; SCHUG, 2011).

As características do quelato (geometria do complexo de coordenação, carga, volume estérico, quiralidade e isomeria) devem influenciar na seletividade da proteína ligante ao metal (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003). A proporção de complexação varia de acordo com o pH, pois a maioria dos agentes quelantes são instáveis a pH baixo, ao passo que em pH mais elevado os metais tendem a formar hidróxidos insolúveis, que são menos acessíveis a agentes quelantes. Esta característica torna-se significativa em condições patológicas que levam a acidose ou alcalose (FLORA; PACHAURI, 2010).

Resíduos de aminoácidos como Cisteína (Cys), Histidina (His), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu) e Prolina (Pro) em peptídeos estão intimamente relacionados à sua capacidade quelante de metais. Enquanto peptídeos ricos em Asp e Glu foram encontrados em muitos complexos metal-peptídeo (CRUZ-HUERTA et al., 2016; LIU et al., 2019).

O princípio geral da coordenação de íons metálicos com ligantes segue a teoria ácido-base. Um íon hidrogênio é dissociado dos grupos de ácido nos ligantes, resultando na combinação entre o ligante e o íon metálico. Muitos peptídeos quelantes de metais isolados de hidrolisados foram relatados, e a maioria deles tem alto teor de Asp. Grupos COO⁻ carregados negativamente foram relatados como locais de ligação em potencial, e os grupos NH₂ ou NH das ligações amido também podem participar na coordenação dos complexos de quelação (ZHAO et al., 2014).

O cobre (Cu) é um metal essencial que atua como cofator e/ou catalisador em vários processos biológicos, como a embriogênese, crescimento, homeostasia, angiogênese (GEORGOPOULOS et al., 2001 apud RIGIRACCILO et al., 2015) e proliferação de células da medula óssea (BREWER, 2005). Trata-se de um componente essencial para enzimas, sendo importantes em reações do tipo redox, tais como citocromo C oxidase (cadeia de transporte de elétrons mitocondrial), superóxido dismutase (desintoxicação de espécies reativas de oxigênio) e lisil oxidase (cross-linking de elastina e colágeno) (ANTONIADES et al., 2013). A perda da homeostase do cobre em humanos é bem ilustrada nas doenças de Menkes e Wilson, que estão relacionadas à deficiência ou sobrecarga de cobre, respectivamente (CHOI et al., 2015). O estresse oxidativo gerado por elevados níveis de Cu está correlacionado com o aparecimento de câncer, sendo o íon cobre um fator de prognóstico útil e um marcador da capacidade de resposta à terapia (RIGIRACCILO et al., 2015).

Íons Cu^{2+} possuem afinidade por ligantes doadores de nitrogênio ou oxigênio, destacando a histidina como aminoácido preferível para esta ligação, uma vez que há o nitrogênio da amida e do grupo imidazol (CHOI et al., 2015). Entretanto, ensaio *in silico* realizado com peptídeo TanP na presença de íons Cu^{2+} sugeriu que o metal interage com o peptídeo através dos grupamentos ácidos (Asp e Glu) (MELO et al., 2017). Ensaios de dinâmica molecular envolvendo íons Cu^{2+} e peptídeos ricos em His com a presença de resíduos de Asp e Glu na região N-terminal demonstraram inicialmente que apenas o grupo imidazol da His interage com Cu^{2+} , ocorrendo durante as simulações a interação espontânea do Cu^{2+} também com os grupos carboxílicos do Glu e Asp (PONTECCHIANI et al., 2014).

Assim como o cobre, o ferro também desempenha papéis biológicos fundamentais, como estar presente em grupos prostéticos de proteínas, incluindo heme e aglomerados de ferro-enxofre, além de estarem relacionados às reações redox envolvidas na respiração e na geração de ATP (YU et al., 2012). Porém o ferro funciona como um cofator pró-oxidante associado com o aumento da produção de radicais hidroxila em tecidos cardiovasculares, desse modo associando o acúmulo desse íon ao risco trombótico devido ao um mecanismo pró-oxidante (FRANCHINI et al., 2008). Aminoácidos como Leucina (Leu), Valina (Val), Prolina (Pro) e Tirosina (Tyr) foram reconhecidos como críticos para coordenação de íons Fe^{2+} (ECKERT et al., 2016). Posteriormente, um estudo realizado por Wu et al. (2017) apresentou três peptídeos quelantes de ferro, com prováveis sítios de ligação no grupo

terminal amino, carboxilato e ligação peptídica da estrutura do peptídeo, bem como o amino e a imina da cadeia lateral da arginina. Além disso, os grupos da cadeia lateral de Lys, His e Asp também desempenharam um papel importante na coordenação do ferro, incluindo amino (Lys), imina (His) e carboxilato (Asp).

Concentrações indesejáveis de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} fazem com que estes metais reajam com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio que danificam o DNA, lipídios e proteínas (DI BELLA et al., 2017). Desse modo seus níveis devem ser estritamente regulados. Em sistemas vivos, a presença de íon metálico transitório, como Fe^{2+} e Cu^{2+} , envolve a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) como, por exemplo, radicais hidroxílicos ($\text{OH}\cdot$) formados pela reação de Fenton. Além disso, os íons ferrosos (Fe^{2+}) podem catalisar a formação de radicais hidroxilo através da reação de Haber-Weiss, que ocorre na presença de superóxido. Esses radicais livres, produzidos localmente, podem reagir com biomoléculas adjacentes e são responsáveis por danos sérios no tecido biológico. Devido a algumas condições ambientais um stress oxidante é gerado, o que pode levar ao desenvolvimento de várias patologias em seres humanos, como diabetes, artrite reumatoide e câncer (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

Em relação aos peptídeos quelantes de zinco, vários fatores particulares, como o grupo carboxila da Asparagina (Asn), quantidade e distribuição de grupos hidrofílicos e átomos de oxigênio carboxílico e nitrogênio amínico têm sido sugeridos como importantes. Além disso a presença de carboxilatos nas cadeias laterais e a localização espacial particular dos resíduos de Asp na molécula podem influenciar a capacidade de quelação do zinco e também contribuir simultaneamente para a estabilidade termodinâmica dos peptídeos (LIU et al., 2019). Resíduos de His presente em peptídeos também se coordenam tetraedricamente com íons Zn^{2+} (PONTECCHIANI et al., 2014).

Estudos revelaram que, enquanto as concentrações de zinco, ferro e selênio estavam significativamente reduzidos em pacientes com câncer, os níveis de cobre foram quase sempre elevados em comparação com amostras de tecido normal (KUO et al., 2002 apud GUPTE; MUMPER, 2009).

O acúmulo de metais como cobre, ferro e zinco no cérebro é apontado como a causa do dano oxidativo, bem como outras funções críticas no cérebro de pacientes que sofrem de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (SALES et al., 2019). Nesse

contexto foi sugerido que a remoção do excesso de metais por agentes quelantes poderia retardar a progressão da neurodegeneração, melhorando assim a função da cognição e do cérebro e, conseqüentemente, a qualidade de vida (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2012).

Peptídeos ligantes de cálcio devem possuir carga negativa e ligações iônicas, destacando os resíduos de Asp e Glu, devido ao grupo carboxila (LEE, 2009; ZHAO et al., 2014). Entretanto há registros na literatura que apresentam Ser e Val, como os sítios de ligação desse metal, devido a capacidade do Ca^{2+} se coordenar ao grupo hidroxila da cadeia lateral desses aminoácidos (ZHANG; LIN; WANG, 2018).

O desenvolvimento de moléculas multifuncionais, incluindo produtos naturais, capazes de combater simultaneamente várias características patológicas, atuando como agentes quelantes, antioxidantes, antiinflamatórios, redutores de agregação de peptídeos, dentre outros é considerado uma nova perspectiva para o tratamento doenças neurodegenerativas (SALES et al., 2019). A aplicação terapêutica de moléculas quelantes está relacionada a casos de intoxicação agudas ou crônicas por metais (ANDERSEN; AASETH, 2002; ANDERSEN, 2005; SMITH, 2013), doenças neurodegenerativas (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2012), doenças hematológicas (PRETORIUS et al., 2014; LEITCH; GATTERMANN, 2019), cicatrização de feridas cutâneas (WRIGHT; RICHARDS; SRAI, 2014), doenças cardiovasculares (SULTAN et al., 2017) e câncer (YU et al., 2012; ANTONIADES et al., 2013).

Embora exista na atualidade uma variedade de agentes quelantes que podem ser usados no tratamento de enfermidades derivadas da perda da homeostasia de íons essenciais, ainda não há um agente ideal. Desta forma, torna-se essencial a realização de estudos para descoberta de novas moléculas com ação quelante e com potencial uso na terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial quelante, antioxidante, hemostático, imunomodulador e cicatrizante do peptídeo aniônico TanP da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial quelante de TanP com relação a diferentes metais bivalentes essenciais utilizando técnicas *in vitro* e *in silico*;
- Propor geometria do complexo formado (peptídeo:metal) utilizando métodos computacionais, com base na interação do metal com ácidos aspárticos;
- Verificar o potencial hemolítico de TanP *in vitro*;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de TanP;
- Investigar o potencial hemostático de TanP por ensaios de coagulação *in vitro*;
- Avaliar o potencial imunomodulador de TanP a partir da dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos;
- Investigar a ação de TanP na proliferação e migração de fibroblastos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese do peptídeo TanP

O peptídeo sintético maduro, não amidado, TanP (YPASFDDDDFDALDDLDDLDDLLDLEPADLVLLDMWANMMDSQDFEDFE) foi obtido comercialmente da empresa particular *Aminotech* (São Paulo, Brasil), com a pureza de, no mínimo, 90% e foi mantido a temperatura -20 °C até o momento do uso. A massa e a pureza foram analisadas, respectivamente, por espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta performance, ambas realizadas pelo fabricante. O estudo com TanP foi conduzido mediante autorização do Sistema Nacional de Gestão e Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o número de registro AAF17D9 (24 de abril de 2018).

4.2 Reatividade do TanP com Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} via espectroscopia UV-Vis

Os ensaios de reatividade do TanP com os íons metálicos foram realizados utilizando um espectrofotômetro Agilent modelo 8453 UV-visible Spectroscopy System, com detector DAD, medidos em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, na região espectral compreendida entre 190 e 800 nm. O experimento foi realizado no Laboratório de Química de Coordenação e Polímeros (LQCPol) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Para elucidar a atividade quelante com metais, realizou-se ensaios de reatividade do TanP com os íons Zn^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} , em que foi preparada uma solução estoque aquosa do TanP 2 mg/mL (343,6 μM). A solução de trabalho consistiu na diluição da solução do peptídeo de 343,6 μM para 23,6 μM . O peptídeo foi diluído em uma solução de água associado a 5% de hidróxido de amônia.

Preparou-se duas soluções para cada um dos sais $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com concentrações de 5000 e 1000 mM, de modo que fosse possível realizar titulações desses à solução do peptídeo (23,6 μM), conforme a tabela 1. Após 5 min da adição do íon, a leitura era realizada no espectrofotômetro.

Tabela 1. Titulações dos metais para ensaio de reatividade.

Adição	Experimento 1 [Ca ²⁺] (cubeta) (μ M)	Experimento 2 [Zn ²⁺] (cubeta) (μ M)	Experimento 3 [Fe ²⁺] (cubeta) (μ M)
1 ^a	4,0	4,0	12,5
2 ^a	8,0	8,0	25,0
3 ^a	12,0	12,0	37,5
4 ^a	16,0	16,0	50,0
5 ^a	18,0	18,0	62,5
6 ^a	23,6	23,6	75,0
7 ^a	26,0	26,0	87,5
8 ^a	34,0	34,0	100,0
9 ^a	48,0	48,0	125,0
10 ^a	60,0	60,0	135,0
11 ^a	80,0	80,0	150,0
12 ^a	90,0	90,0	162,5
13 ^a	120,0	120,0	175,0
14 ^a	-	-	187,5
15 ^a	-	-	200,0
16 ^a	-	-	212,5
17 ^a	-	-	225,0

Fonte: Dados obtidos e analisados.

4.3 Reatividade do TanP com Fe²⁺ e Zn²⁺ via espectroscopia de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo RF-5301PC) do Instituto de Química da UFRN. A leitura dos espectros de emissão foi registrada na faixa de 300 a 500 nm, com excitação no comprimento de 280 nm. Todas as medidas foram realizadas com largura das fendas de excitação e emissão iguais a 1,5 e 15 nm, respectivamente.

Uma solução de TanP (1,12 μ M) foi titulada com íons Fe (0 - 47,7 μ M) e Zn (0 - 50 μ M), em ensaios distintos, proveniente de soluções estoques de FeSO₄.7H₂O (250 μ M e 500 μ M) e ZnCl₂ (250 μ M e 500 μ M), previamente preparadas. Após 5 min da adição do íon, os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos sendo expressos como um gráfico da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda (nm) (CAETANO-SILVA et al., 2017).

4.4 Métodos computacionais

Os cálculos teóricos foram focados na interação metal-TanP. Resultados experimentais anteriores para íons Cu^{2+} e TanP indicam que este processo de quelação provavelmente ocorre via pares de aspartato localizados ao longo da estrutura terciária do peptídeo (MELO et al., 2017). Nesse contexto, um modelo de complexação entre um par de aspartato, moléculas de água e íons metálicos (Fe^{2+} e Zn^{2+}), foi elaborado para apoiar e compreender o efeito quelante, bem como propor um possível mecanismo de quelação do peptídeo com íons metálico através dos ácidos aspárticos.

A busca conformacional foi realizada usando uma ferramenta computacional de amostragem CREST (conformer-rotamer ensemble sampling tool) versão 2.10.2 (PRACHT; BOHLE; GRIMME, 2020) com o pacote do programa xtb (BANNWARTH et al., 2021). O método semi-empírico de química quântica baseado em ligação forte GFN2-xTB foi usado na estrutura da meta-dinâmica para explorar globalmente os conformadores (GRIMME, 2019). O melhor conformero para cada metal foi submetido à otimização da geometria utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o nível de teoria BP86/ Def2-TZVP (PERDEW, 1986; BECKE, 1988; WEIGEND; AHLRICHS, 2005), em um solvente implícito (água) usando o modelo continuum polarizável (IEFPCM) (SCALMANI; FRISCH, 2010).

Após cálculos de otimização, o modelo TD-DFT (*time-dependent density functional theory*) (PRACHT; BOHLE; GRIMME, 2020), para predizer energias de transição vertical dos primeiros estados excitados, foi realizado no CAM-B3LYP (YANAI; TEW; HANDY, 2004) / Def2-TZVP. Além disso, análises dos orbitais natural de ligação (NBO) (FOSTER; WEINHOLD, 1980; REED; WEINHOLD, 1983) e orbitais natural de transição (NTO) (MARTIN, 2003) também foram realizadas para fornecer uma imagem mais intuitiva dos orbitais moleculares. O programa Gaussian 16 foi usado para todos os cálculos DFT (FRISCH et al., 2016).

4.5 Atividade hemolítica de TanP

O ensaio para avaliar o efeito hemolítico de TanP foi realizado seguindo a metodologia descrita por De Menezes e colaboradores (2014), com modificações. Inicialmente, para a obtenção da suspensão de eritrócitos de um doador saudável (grupo

sanguíneo O⁺, Rh⁺), o sangue foi lavado três vezes com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, seguido da centrifugação a 2000 rpm por 10 min em centrífuga refrigerada (Eppendorf® 5424 R, Germany) a 25°C. Em microtubos, 8µL da suspensão de eritrócitos à 20% (v/v) foi incubada com 292 µL TanP (1,56 – 50 µM), por 1 h à 37 °C, resultando em uma concentração final de eritrócitos 1%. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 min e 200 µL do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços, com posterior avaliação da absorbância a 540 nm em um leitor de microplacas (Epoch-Biotek, Winooski, VT, USA). Triton X-100 1% (v / v) e PBS (pH 7,4) foram usados como controle positivo (100% de hemólise) e controle negativo (0% de hemólise), respectivamente. Os resultados foram expressos como a porcentagem de lise de glóbulos vermelhos em comparação com o controle positivo (100% de hemólise). A porcentagem de hemólise foi calculada com a seguinte formula:

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\frac{Abs_{teste} - Abs_{Cn}}{Abs_{Cp} - Abs_{Cn}} \right) \times 100$$

Em que Abs_{teste} = absorbância da amostra teste; Abs_{Cn} = absorbância do controle negativo; e Abs_{Cp} = absorbância do controle positivo.

A utilização de sangue de doador humanon e saudável foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – HUOL/UFRN sob número de parecer 3127063.

4.6 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de TanP

Todos os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), da UFRN.

4.6.1 Sequestro do radical DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

A atividade de sequestro de radicais DPPH avaliou a capacidade de TanP em doar hidrogênios ou anular o radical DPPH em uma solução etanólica. Foi realizada conforme metodologia descrita por Melo-Silveira e colaboradores (2014), com modificações. Inicialmente, 100 µL de TanP (1 – 25 µM) foi adicionado à 100 µL de uma solução etanólica de DPPH (150 µM) e incubado por 30 min, protegido da luz, a temperatura ambiente. Após

período de incubação, a leitura da absorbância foi realizada num leitor de placas a 517 nm. Utilizou-se solução de DPPH como controle, e solução de etanol como branco do ensaio. O percentual da atividade do sequestro do radical DPPH foi expresso através da equação:

$$\text{Atividade do sequestro de radical DPPH (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}}{\text{Abs. controle}} \right) \right) \times 100$$

Em que Abs. amostra é a absorbância das amostras, Abs. branco é a absorbância do branco (solução de etanol) e Abs. controle é a absorbância do controle (DPPH).

4.6.2 Sequestro do radical hidroxila

A avaliação da capacidade de sequestro do radical hidroxila por TanP foi investigada usando a reação de Fenton conforme descrito anteriormente na literatura, com poucas modificações (MELO-SILVEIRA et al., 2014). Em uma microplaca de 96 poços, TanP (1 – 73,6 µM) foi incubado com a solução reagente (tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4, contendo sulfato ferroso 10 mM, EDTA 10 mM, salicilato de sódio 2 mM e 30% de peróxido de hidrogênio), a 37 °C por 60 min, levando a formação do radical hidroxila. O volume final foi de 250 µL por poço. Para o branco, não houve adição de peróxido, sendo o volume substituído pelo tampão. Tubos sem a amostra de peptídeo, porém com as mesmas proporções dos demais reagentes foram usados como controle. Os resultados foram expressos como percentual de sequestro de radical hidroxila (%) em comparação com o ácido gálico padrão (0,25 a 2 mg / mL). A leitura foi realizada num leitor de placa a 510 nm. O percentual de sequestro de radical hidroxila (%) foi obtido pela fórmula abaixo:

$$\text{Sequestro do Radical Hidroxila (\%)} = \frac{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra})}{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Branco})} \times 100$$

Em que Abs. controle é a absorbância das amostras sem o peptídeo, Abs. amostras é a absorbância das amostras com o peptídeo e Abs. branco é a absorbância do branco (amostras sem peróxido de hidrogênio).

4.6.3 Quelação de ferro

A capacidade de quelação de íons Fe^{2+} foi avaliada conforme descrito previamente na literatura, com algumas modificações (MELO-SILVEIRA et al., 2014). Para um volume final de 200 μL , adicionou-se FeCl_2 2 mM, ferrozina 5 mM e concentrações variadas de TanP (1 – 25 μM). As amostras foram agitadas e em seguida incubadas a 37 °C por 10 min, à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lidas num leitor de placas, a 562 nm. O branco correspondeu a reação de todos os componentes, exceto TanP. O EDTA (0,1 mg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram apresentados na forma de percentual de quelação férrica (%), de acordo com a equação:

$$\text{Quelação de ferro (\%)} = \frac{(\text{Abs. branco} - \text{Abs. Amostra})}{(\text{Abs. branco})} \times 100$$

Em que Abs.branco é a absorbância das amostras sem o peptídeo, Abs.amostras é a absorbância das amostras com o peptídeo.

4.6.4 Sequestro do radical superóxido

O ensaio baseia-se na capacidade de TanP em inibir a redução fotoquímica do nitrobluetetrazolium (NBT), pelo sequestro de íons superóxido, por meio do sistema riboflavina – luz – NBT, conforme descrito na literatura, com algumas modificações (MELO et al., 2013). O ensaio foi realizado numa microplaca de 96 poços, com um volume final de 250 μL por poço, contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,8, metionina 13mM, riboflavina 2mM, EDTA 100 mM, NBT 75 mM e TanP em diferentes concentrações (1 – 25 μM). Após 15 min sob iluminação com uma lâmpada fluorescente, para produção de azul de formazan, a absorbância das amostras foi mensurada em um leitor de placa a 560 nm. Poços contendo soluções com os mesmos componentes (exceto amostra) foram colocados ao abrigo da luz e utilizados como branco. Ácido gálico foi utilizado como padrão (0,01 a 0,6 mg/mL). O percentual de atividade sequestradora de radical superóxido foi obtido pela equação:

$$\text{Sequestro do Radical superóxido (\%)} = \frac{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra})}{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Branco})} \times 100$$

4.6.5 Poder redutor

O poder redutor foi quantificado de acordo com a metodologia descrita por Melo e colaboradores (MELO et al., 2013), com algumas modificações. TanP (1 – 25 μ M), foi adicionado ao tampão fosfato 200 mM pH 6,6, contendo 1% de ferricianeto de potássio e incubado por 20 min, à 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, foi adicionado água destilada e cloreto de ferro 0,1% às amostras. A absorbância foi medida a 700 nm em um leitor de placa.

4.7 Avaliação da atividade anticoagulante *in vitro* de TanP

A atividade anticoagulante *in vitro* do peptídeo aniônico foi determinada por meio de ensaios de tempo de protrombina (TP), ação na via extrínseca, e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) para avaliar o efeito via intrínseca e comum da hemostasia. Além disso, também verificou-se a atividade fibrinogenolítica, conforme descrito previamente na literatura, com adaptações (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia da UFRN (TECBIOFAR).

A utilização de sangue de doador humano e saudável foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – HUOL/UFRN sob número de parecer 3127063.

4.7.1 Tempo de protrombina (TP)

Para o ensaio de TP utilizou-se kits comerciais de reagentes (CLOT Bios Diagnostica, São Paulo, SP, Brasil). Alíquota de 70 μ L de plasma humano foram incubados com 30 μ L de solução de TanP (2 – 25 μ M) por 5 min a 37 °C. Em seguida, 200 μ L do reagente TP (extrato de cérebro de coelho e cloreto de cálcio), pré-aquecido por 10 min a 37 °C foi adicionado e o tempo de coagulação determinado por meio de um coagulômetro digital (“Laser Sensor” Clotimer, CLOT, São Paulo, SP, Brazil). O plasma na ausência do peptídeo (apenas com o veículo) foi usado como controle negativo (ausência de atividade anticoagulante), e o plasma com Heparina (1 UI/mL) (Cristalia®, Itapira, SP, Brasil) foi usado como controle positivo.

4.7.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

Para o ensaio de TTPa utilizou-se kits comerciais de reagentes (CLOT Bios Diagnostica, São Paulo, SP, Brasil). Aliquota de 70 μ L de plasma humano foi incubado com 30 μ L de solução de TanP (2 – 25 μ M) por 5 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 50 μ L do reagente 1 de TTPa (extrato de cérebro de coelho e ácido elágico), pré-aquecido anteriormente a 37 °C, e incubou por 3 min. Passado o tempo determinado anteriormente, 50 μ L de CaCl_2 , pré-aquecido a 37 °C, foi adicionado e o tempo de coagulação aferido por meio do coagulômetro digital (“Laser Sensor” Clotimer, CLOT, São Paulo, SP, Brazil). O plasma na ausência do peptídeo (apenas com o veículo) foi usado como controle negativo (ausência de atividade anticoagulante), e o plasma com Heparina (1 UI/mL) (Cristalia®, Itapira, SP, Brasil) foi usada como controle positivo.

4.7.3 Atividade fibrinogenolítica

O efeito de TanP sobre o fibrinogênio foi avaliado por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Diferentes concentrações do TanP (2 – 171,8 μ M) foram adicionadas a 50 μ g de fibrinogênio (2 μ g/ μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e depois incubadas por 240 min a 37 °C. A reação foi interrompida por adição de 25 μ L de tampão de amostra contendo 10% de β -mercaptoetanol e 2% de SDS, seguido de ebulição por 5 min e submetido a SDS-PAGE (12%). O padrão de hidrólise de fibrinogênio foi visualizado por coloração com azul brilhante Coomassie R-250. O fibrinogênio sozinho foi usado como controle, para visualização do perfil intacto de fibrinogênio. A peçonha de *Bothrops leucurus* (10 μ g) foi utilizado como controle positivo para a atividade fibrinogenolítica. Uma amostra contendo apenas o peptídeo na concentração mais alta foi usada para controle. Ao final o gel foi digitalizado e a imagem foi binarizada para mensuração da área de uma das bandas referentes à degradação de fibrinogênio, utilizando o *software* ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, MD, EUA).

4.8 Atividade imunomoduladora de TanP *in vitro*

O potencial imunomodulador de TanP foi avaliado pela quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α no sobrenadante de cultura de células de macrófagos murinos (RAW 264.7), tratadas com peptídeo (TanP) na presença e ausência de LPS (2 μ g/mL, Sigma,

St Louis, EUA), de modo a analisar suas propriedades de modular macrófagos. A avaliação da citotoxicidade do peptídeo pelo método de redução do MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tem sido descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (MELO et al., 2017).

Em uma placa de 24 poços, células RAW 264.7 (3×10^5 células/poço) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), sendo posteriormente incubada a 37 °C por 24 h numa atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi substituído por TanP (2 – 25 µM) na presença e ausência de LPS (2 µg/mL). A placa foi mantida nas condições citadas anteriormente por 24 h. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas pelo método imunoenzimático, ELISA, usando o kit Ebioscience® (San Diego, EUA), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Os resultados foram apresentados como concentração de citocinas em pg/mL. Este ensaio foi realizado nos laboratórios BIOPOL e TECBIOFAR da UFRN.

4.9 Viabilidade celular para células 3T3 (ATCC CCL-92)

Para avaliar a viabilidade das células de fibroblastos murinos 3T3 (ATCC CCL-92) na presença de TanP utilizou-se o ensaio colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983), sendo realizado no laboratório BIOPOL da UFRN. As células foram cedidas por Dra. Carmem Ferreira, do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Inicialmente as células 3T3 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (5×10^3 células/poço) e incubadas em meio DMEM com SFB 10%, em estufa a 37 °C com 5% de saturação de CO₂. Posteriormente, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM sem SFB, processo chamado de carenciamento. Decorrido 24 h, o meio foi aspirado e foram adicionadas diferentes concentrações de TanP (2 – 50 µM) em meio DMEM com SFB. Após 24 h, o meio foi substituído por uma solução de MTT a 1 mg/mL em DMEM e incubada por 4 h nas condições descritas anteriormente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados pela redução do MTT foram solubilizados em álcool etílico PA. A placa foi mantida sob lenta agitação por 15 min, à temperatura ambiente, com posterior leitura em um leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT – EUA), a 570 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular, a qual é proporcional

à redução do MTT, considerando-se a absorbância do controle negativo (amostra com 0 μ M de TanP) como 100% de viabilidade celular (100% de redução do MTT).

4.10 Avaliação da migração celular *in vitro* de células 3T3 (ATCC CCL-92)

O ensaio de migração *in vitro*, também conhecido como ensaio de *Scratch*, possibilitou avaliar o efeito migratório das células 3T3 (ATCC CCL-92), fibroblastos de tecido de embrião de camundongo, na presença do peptídeo (TanP) e ocorreu conforme descrito por Justus e colaboradores (2014), com alterações. O modelo de *Scratch*, caracterizado por uma incisão contínua em uma monocamada de células confluentes, a qual simula uma lesão epitelial, permite mensurar a migração das células presentes na borda da ranhura, que possuem como propósito promover o fechamento da lacuna (JUSTUS et al., 2014). Este ensaio foi realizado no laboratório BIOPOL da UFRN.

Após a obtenção da confluência de células 3T3 em placa de 24 poços, foi realizado um risco horizontal na placa com auxílio de uma ponteira de 200 μ L, na superfície medial de cada poço. Para remover células soltas, os poços foram lavados com tampão PBS (fosfato salino, pH 7,4) e em seguida realizado o tratamento com TanP em diferentes concentrações (2 – 50 μ M). Poços contendo apenas meio de cultivo foram usados como o controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para acompanhar o fechamento da lesão, imagens foram obtidas usando o microscópio invertido *Nikon Eclipse* nos tempos de 0 h, 12 h e 24 h, após tratamento com TanP. A análise das imagens foi realizada utilizando o software *NIS-Elements AR*, considerando os resultados como porcentagem de fechamento da lesão em relação a área inicial.

4.11 Análise estatística

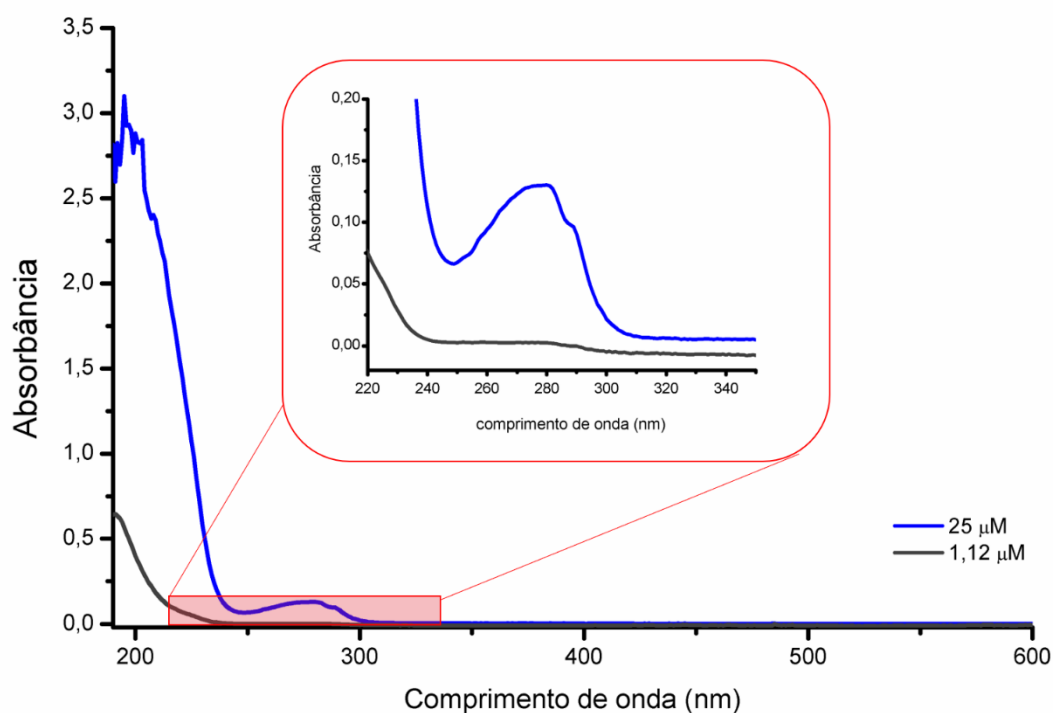
A análise estatística para os ensaios de atividade imunomoduladora e hemolítica foi realizada utilizando o ANOVA *oneway*, seguido do teste de *Turkey* para as comparações múltiplas entre os grupos, sendo utilizando o software *GraphPad Prism 5.1.4* (EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Para os ensaios experimentais com os metais, foi utilizado o programa *Origin Pro 8.5* para plotação dos gráficos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da reatividade de TanP com metais bivalentes

A fim de complementar a investigação sobre o comportamento de TanP em presença de íons metálicos, uma vez que o peptídeo demonstrou potencial quelante para íons Cu^{2+} (MELO et al., 2017), no presente trabalho um estudo espectroscópico sobre a formação dos complexos dos íons Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} com o mesmo peptídeo foi descrito, utilizando a técnica de UV-Vis. Inicialmente verificou-se o perfil de absorbância de TanP em uma solução diluída ($1,12 \mu\text{M}$) e concentrada ($25 \mu\text{M}$). O espectro eletrônico (UV-Vis) (Figura 3) mostrou bandas em 255 nm e 272 nm.

Figura 3. Espectro de absorção na região do Uv-Vis de TanP em meio aquoso em uma solução diluída ($1,12 \mu\text{M}$) e concentrada ($25 \mu\text{M}$)



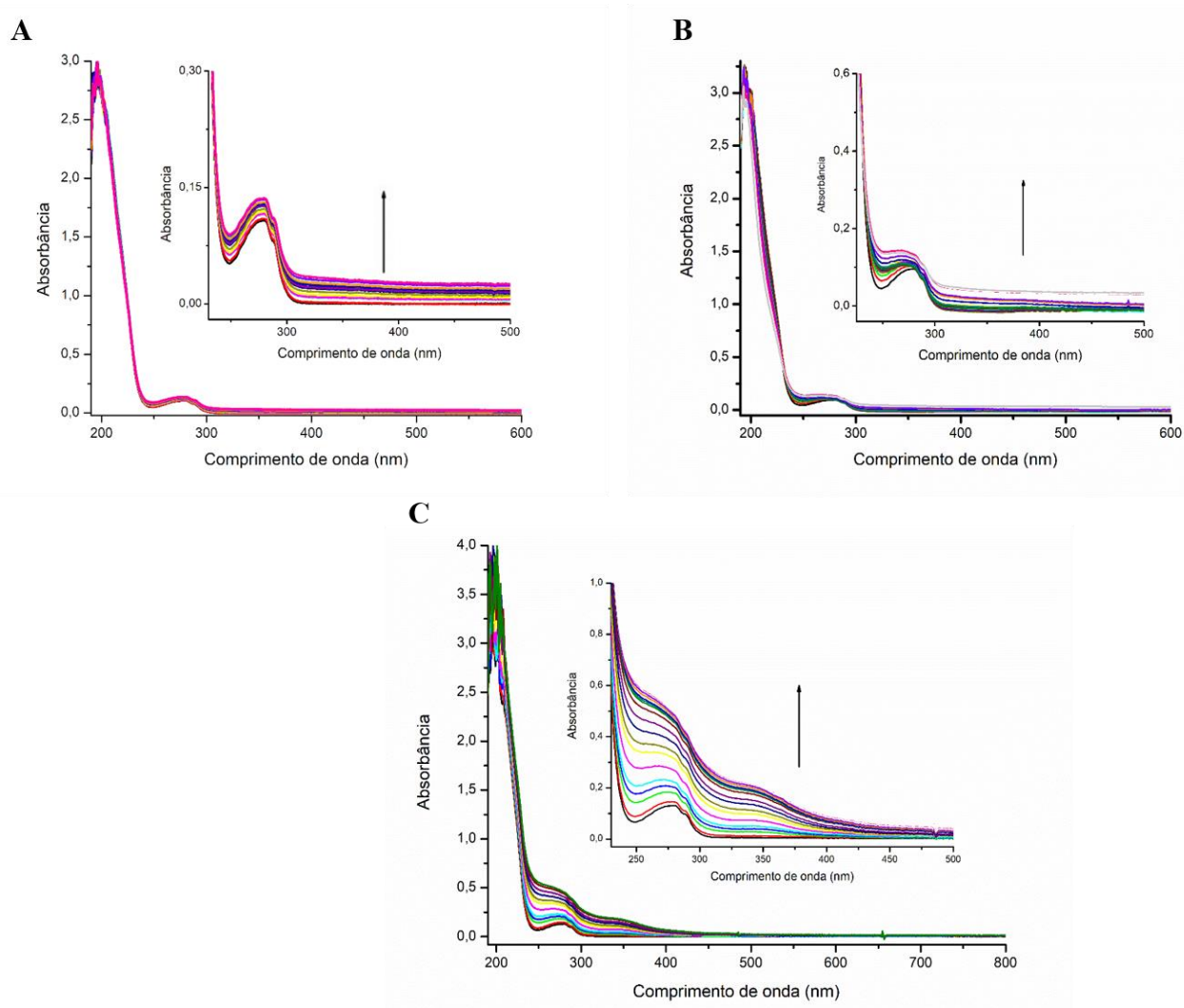
Fonte: Dados obtidos e analisados.

Linha azul corresponde ao espectro de absorbância de TanP ($25 \mu\text{M}$); Linha cinza corresponde ao espectro de absorbância de TanP ($1,12 \mu\text{M}$)

Posteriormente concentrações crescentes de cada metal foram adicionadas à solução de peptídeo e qualquer alteração na estrutura de TanP induzida pela interação com o centro metálico foi monitorada pelos espectros eletrônicos na região ultravioleta (Figura 4).

Figura 4. Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP e íons metálicos.

(A) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (23,6 μM) e Ca^{2+} (4,0 a 120 μM). (B) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (23,6 μM) e Zn^{2+} (4,0 a 120 μM). (C) Espectros obtidos em meio aquoso da reatividade entre TanP (25 μM) e Fe^{2+} (0 a 225,0 μM).

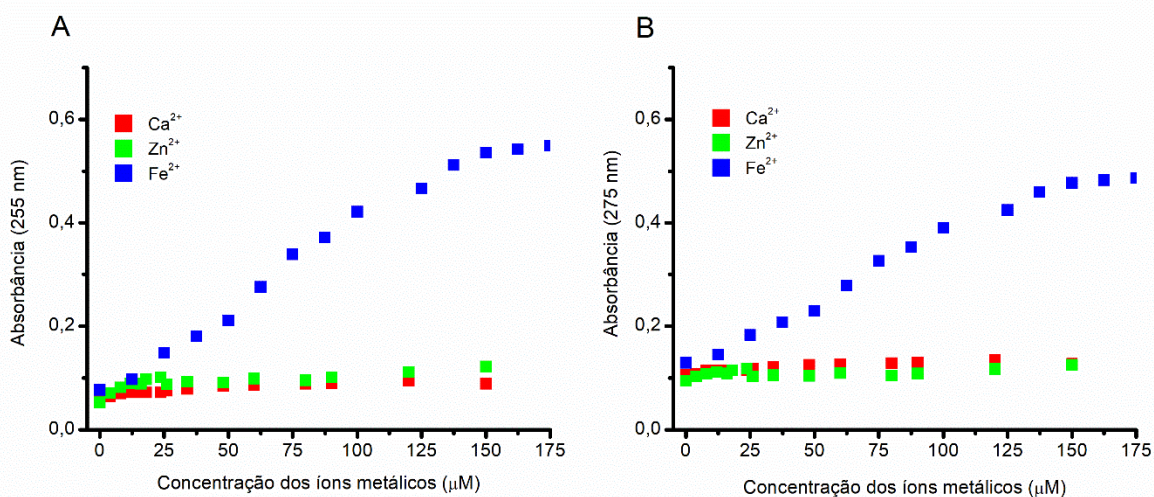


Fonte: Dados obtidos e analisados.

Nenhuma alteração significativa nos espectros, após adição de metais Ca^{2+} e Zn^{2+} (figuras 4A e 4B), nas concentrações avaliadas, foi verificada quando comparado ao espectro de TanP na ausência destes metais. Entretanto na figura 4C nota-se que há um aumento significativo das absorbâncias em função de adições sucessivas de Fe^{2+} , havendo alterações espectrais evidentes em 255 nm e 275 nm, bandas características de TanP (Figura 3). Desse modo pode-se sugerir que há uma interação química significativa entre o peptídeo e o íon ferro (II), a qual pode ser visualizada na região do UV-Vis, com provável formação de um complexo TanP- Fe^{2+} .

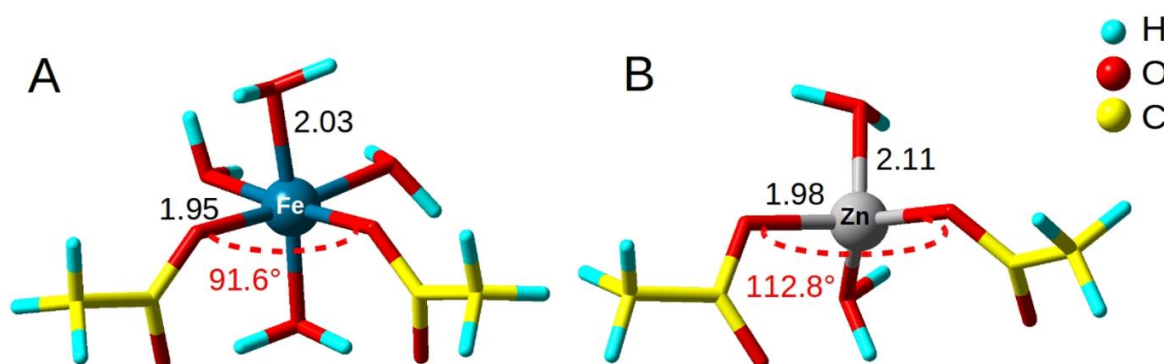
Em seguida, analisamos as alterações das absorbâncias nos comprimentos de onda específicos de 255 nm e 275 nm (Figura 5). Para Zn^{2+} e Ca^{2+} não foi notado qualquer alteração relevante no espectro de absorbância. Para Fe^{2+} verificamos que há um aumento da absorbância proporcional ao aumento da concentração do metal, e que a partir de, aproximadamente, 136 μM de Fe^{2+} a absorbância tende a se manter constante. Demonstrando que nessa concentração, provavelmente, houve saturação dos sítios de ligação do metal no peptídeo, chegando-se ao ponto estequiométrico da reação. Sugere-se que TanP (25 μM) foi capaz de formar complexos estáveis com Fe^{2+} numa proporção de 1:5 (TanP: Fe^{2+}).

Figura 5. Variação da absorbância do TanP em função da variação da concentração dos íons Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} , a partir do ensaio UV-Vis. (A) Absorbância versus concentração dos íons no comprimento de 255 nm. (B) Absorbância versus concentração dos íons no comprimento de 275 nm



Para entender o efeito quelante do TanP sobre os íons Fe^{2+} e Zn^{2+} , os seguintes complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ foram usados após a pesquisa conformacional. As geometrias obtidas para os complexos Zn^{2+} e Fe^{2+} apresentaram formas tetraédricas e octaédricas, respectivamente, e são apresentadas na figura 6.

Figura 6. Estrutura calculada no nível da teoria BP86 / Def2-TZVP para os complexos (A) $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e (B) $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Distâncias de ligação relevantes (Å) e ângulos são exibidos.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Os átomos azul, vermelho e amarelo correspondem a hidrogênio, oxigênio e carbono, respectivamente.

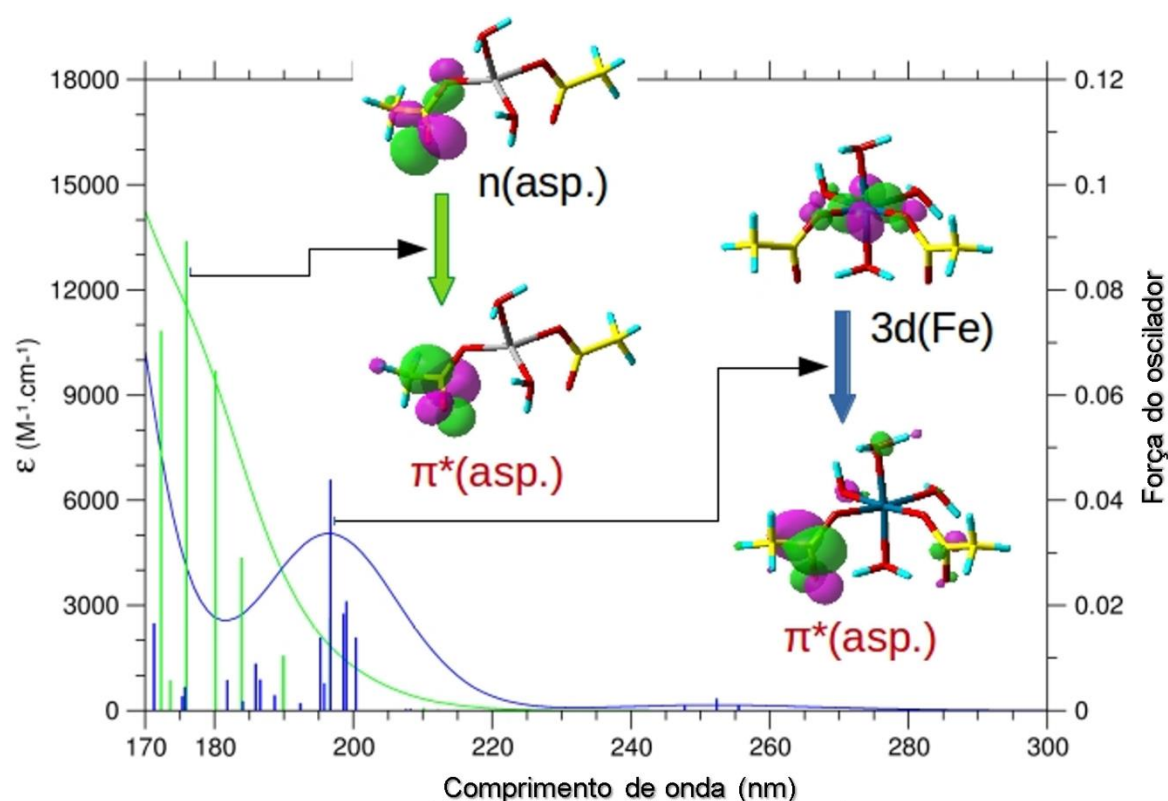
Para Zn^{2+} , duas moléculas de água e um oxigênio de cada aspartato estão localizados nos vértices de uma estrutura tetraédrica (Figura 6B). Os ângulos entre esses quatro ligantes que passam pelo átomo central metálico têm uma média de $108,7^\circ$, que caracteriza essa geometria, e uma distância média de $2,0 \text{ \AA}$. Assim como nos complexos com Zn^{2+} , o ferro do dicátion também interage com um oxigênio de cada carboxilato de aspartato, no entanto, quatro moléculas de água estão presentes na primeira camada de hidratação e formam um complexo octaédrico com isomeria cis (Figura 6A). Os ângulos médios entre os átomos de oxigênio adjacentes e opostos foram $90,0^\circ$ e $174,5^\circ$, respectivamente, em uma distância média de $2,0 \text{ \AA}$ do átomo central.

A geometria tetraédrica obtida para o complexo Zn^{2+} - TanP no ensaio computacional deste estudo revelou uma configuração comumente obtida para complexos dicátions de zinco, principalmente em biocomplexos, uma vez que o íon zinco interage com doadores como oxigênio e nitrogênio das cadeias laterais de enzimas para gerar complexos mais fortes

(KREŽEL; MARET, 2016). Em relação à geometria obtida para o complexo Fe^{2+} - TanP, a mesma está de acordo com vários complexos de ferro que geram a forma octaédrica em meio aquoso, incluindo moléculas biológicas como grupo heme (POULOS, 2014).

Os espectros de absorção teóricos para os dois complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ são exibidos na figura 7. Esses espectros foram simulados para a faixa espectral de comprimentos de onda entre 170 e 300 nm, o qual é consistente com a janela espectral usada para obter os dados experimentais de UV-Vis. Todas as transições verticais calculadas para os dois complexos foram caracterizadas (comprimento de onda, força do oscilador e tipos de orbitais envolvidos nas transições) e listadas na Tabela 2.

Figura 7. Espectros eletrônicos teóricos e transições eletrônicas verticais dos complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ (linha azul) e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (linha verde) em água, calculados pelo modelo TD-DFT (no nível teórico CAM-B3LYP / Def2-TZVP).



Fonte: Dados obtidos e analisados.

NTOs envolvidos nas principais transições eletrônicas dos complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ foram inseridos. A linha contínua de espectros simulados e barras de pico são dimensionadas pelo coeficiente de atenuação molar (eixo y esquerdo) e força do oscilador, respectivamente (eixo y direito).

Tabela 2. Energia / comprimento de onda, força do oscilador (f) e tipo de orbitais envolvidos nas transições eletrônicas calculadas no nível de teoria CAM-B3LYP / Def2-TZVP para os complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Espécies	Energia de excitação (eV / nm)	F	Transições	Estados
Fe²⁺				
1	1,4606 / 848,86	0,0000	HOMO $\rightarrow$ LUMO	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
2	1,5051 / 823,74	0,0000	HOMO – 1 $\rightarrow$ LUMO	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
3	1,5094 / 821,39	0,0000	HOMO – 2 $\rightarrow$ LUMO	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
4	2,5122 / 493,53	0,0000	HOMO $\rightarrow$ LUMO + 1	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
5	2,5738 / 481,71	0,0001	HOMO – 1 $\rightarrow$ LUMO + 1	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
6	2,5877 / 479,13	0,0000	HOMO – 2 $\rightarrow$ LUMO + 1	3d(Fe) $\rightarrow$ 3d(Fe)*
7	4,8529 / 255,49	0,0008	HOMO $\rightarrow$ LUMO + 2	3d(Fe) $\rightarrow$ 4s(Fe)*
8	4,9136 / 252,33	0,0022	HOMO – 1 $\rightarrow$ LUMO + 2	3d(Fe) $\rightarrow$ 4s(Fe)*
9	5,0048 / 247,73	0,0009	HOMO – 2 $\rightarrow$ LUMO + 2	3d(Fe) $\rightarrow$ 4s(Fe)*
10	5,9543 / 208,23	0,0002	HOMO – 3 $\rightarrow$ LUMO	n $\rightarrow$ 3d(Fe)*
11	5,9735 / 207,56	0,0002	HOMO – 3 $\rightarrow$ LUMO + 1	n $\rightarrow$ 3d(Fe)*
12	6,1890 / 200,33	0,0138	HOMO $\rightarrow$ LUMO + 3	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
13	6,2306 / 198,99	0,0207	HOMO – 1 $\rightarrow$ LUMO + 3	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
14	6,2445 / 198,55	0,0183	HOMO – 2 $\rightarrow$ LUMO + 3	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
15	6,3038 / 196,68	0,0438	HOMO $\rightarrow$ LUMO + 4	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
16	6,3330 / 195,78	0,0051	HOMO – 1 $\rightarrow$ LUMO + 4	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
17	6,3515 / 195,21	0,0138	HOMO – 2 $\rightarrow$ LUMO + 4	3d(Fe) $\rightarrow$ π^*
18	6,4455 / 192,36	0,0013	HOMO – 4 $\rightarrow$ LUMO	n $\rightarrow$ 3d(Fe)*
19	6,5728 / 188,63	0,0028	HOMO – 4 $\rightarrow$ LUMO + 1	n $\rightarrow$ 3d(Fe)*
20	6,6461 / 186,55	0,0058	HOMO – 3 $\rightarrow$ LUMO + 2	n $\rightarrow$ 4s(Fe)*

21	6,6686 / 185,92	0,0088	HOMO – 4 → LUMO + 2	$n \rightarrow 4s(Fe)^*$
22	6,7358 / 184,07	0,0017	HOMO → LUMO + 5	$3d(Fe) \rightarrow 4p(Fe)^*$
23	6,8191 / 181,82	0,0057	HOMO – 1 → LUMO + 5	$3d(Fe) \rightarrow 4p(Fe)^*$
24	7,0565 / 175,70	0,0044	HOMO – 2 → LUMO + 5	$3d(Fe) \rightarrow 4p(Fe)^*$
25	7,0722 / 175,31	0,0026	HOMO – 4 → LUMO + 4	$n \rightarrow \pi^*$
26	7,2399 / 171,25	0,0165	HOMO – 5 → LUMO + 4	$n \rightarrow \pi^*$
Zn²⁺				
1	5,8437 / 212,17	0,0001	HOMO → LUMO	$n \rightarrow \pi^*$
2	5,9010 / 210,11	0.0004	HOMO – 1 → LUMO + 1	$n \rightarrow \pi^*$
3	6.3054 / 196.63	0.0175	HOMO → LUMO + 2	$n \rightarrow 4s(Zn)^*$
4	6.5293 / 189.89	0.0103	HOMO – 1 → LUMO + 2	$n \rightarrow 4s(Zn)^*$
5	6.7440 / 183.84	0.0290	HOMO → LUMO + 3	$n \rightarrow 4p(Zn)^*$
6	6.8826 / 180.14	0.0646	HOMO – 1 → LUMO + 3	$n \rightarrow 4p(Zn)^*$
7	7.0467 / 175.95	0.0892	HOMO – 2 → LUMO	$n \rightarrow \pi^*$
8	7.1418 / 173.60	0.0056	HOMO – 3 → LUMO + 1	$n \rightarrow \pi^*$
9	7.1972 / 172.27	0.0721	HOMO – 4 → LUMO	$n \rightarrow \pi^*$

Fonte: Dados obtidos e analisados.

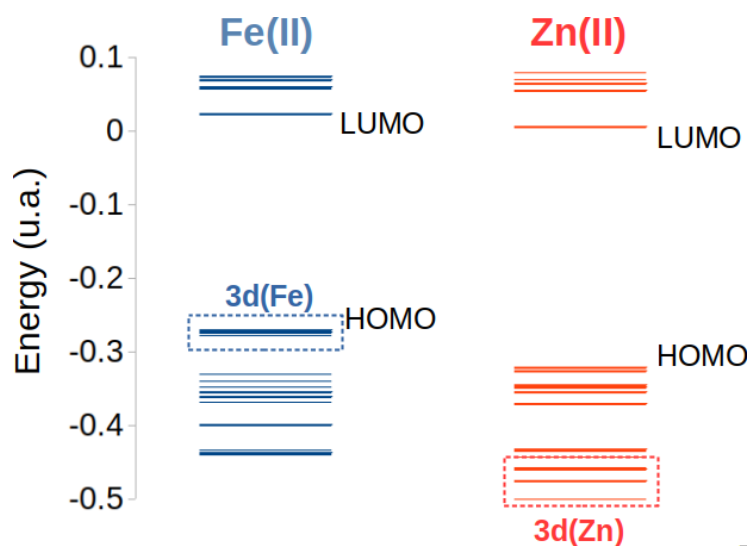
Como pode ser observado na figura 7 e na tabela 2 enquanto o complexo $[Zn(Asp.)_2(H_2O)_2]$ apresenta nove estados excitados (entre 172 e 212 nm), o complexo $[Fe(Asp.)_2(H_2O)_4]$ possui vinte estados excitados (entre 171 e 255 nm). Os NTOs do estado excitado principal para os complexos $[Fe(Asp.)_2(H_2O)_4]$ e $[Zn(Asp.)_2(H_2O)_2]$ também são exibidos na figura 7.

Por um lado, esses nove estados excitados do complexo $[Zn(Asp.)_2(H_2O)_2]$ são descritos principalmente a partir de transições originadas nos orbitais moleculares mais alto ocupados (HOMO, HOMO - 1 e HOMO - 2) centrados no ligante aspartato (orbitais tipo n) para orbitais moleculares mais baixo desocupados (LUMO, LUMO + 1 e LUMO +2)

associados também com a porção ligante de aspartato (orbitais tipo π^*). Por outro lado, para o complexo $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$, os estados excitados mais importantes descrevem uma banda de baixa intensidade (entre 185 e 220 nm), que é resultado principalmente de transições quase isoenergéticas originadas dos orbitais 3d (HOMO, HOMO - 1 e HOMO - 2) localizados no centro metálico para os orbitais tipo π^* localizados no ligante aspartato (LUMO + 3 e LUMO + 4).

Nossas análises NBO (Figuras 8, 9 e 10) indicam que, enquanto para o complexo $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$, os orbitais 3d do centro metálico definem os orbitais de fronteira HOMO-LUMO, para o $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ os orbitais 3d do zinco estão distantes dos orbitais limite.

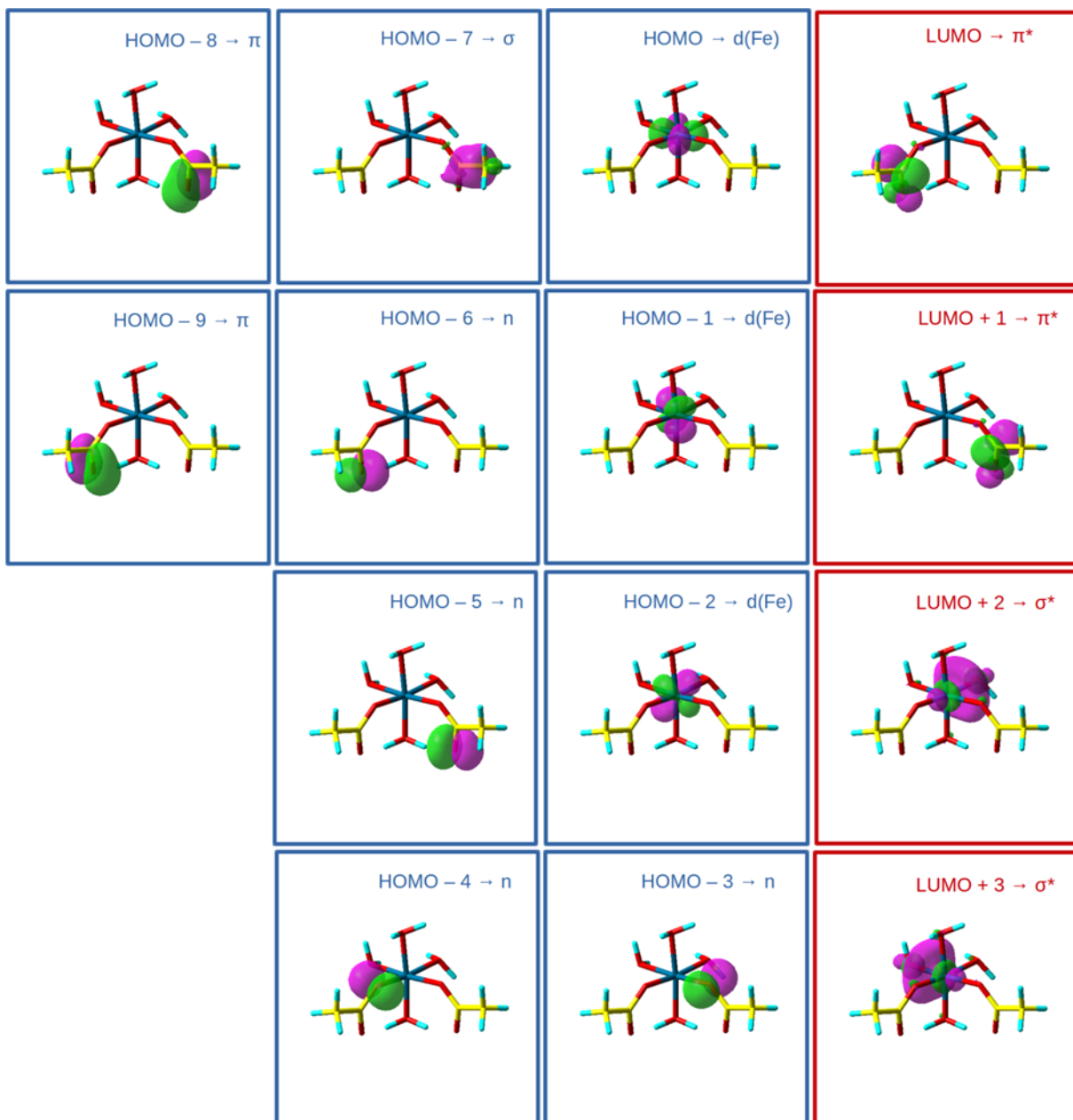
Figura 8. Diagrama de energia NBO para os complexos $[\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ e $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

HOMO (*highest occupied molecular orbital*). LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*).

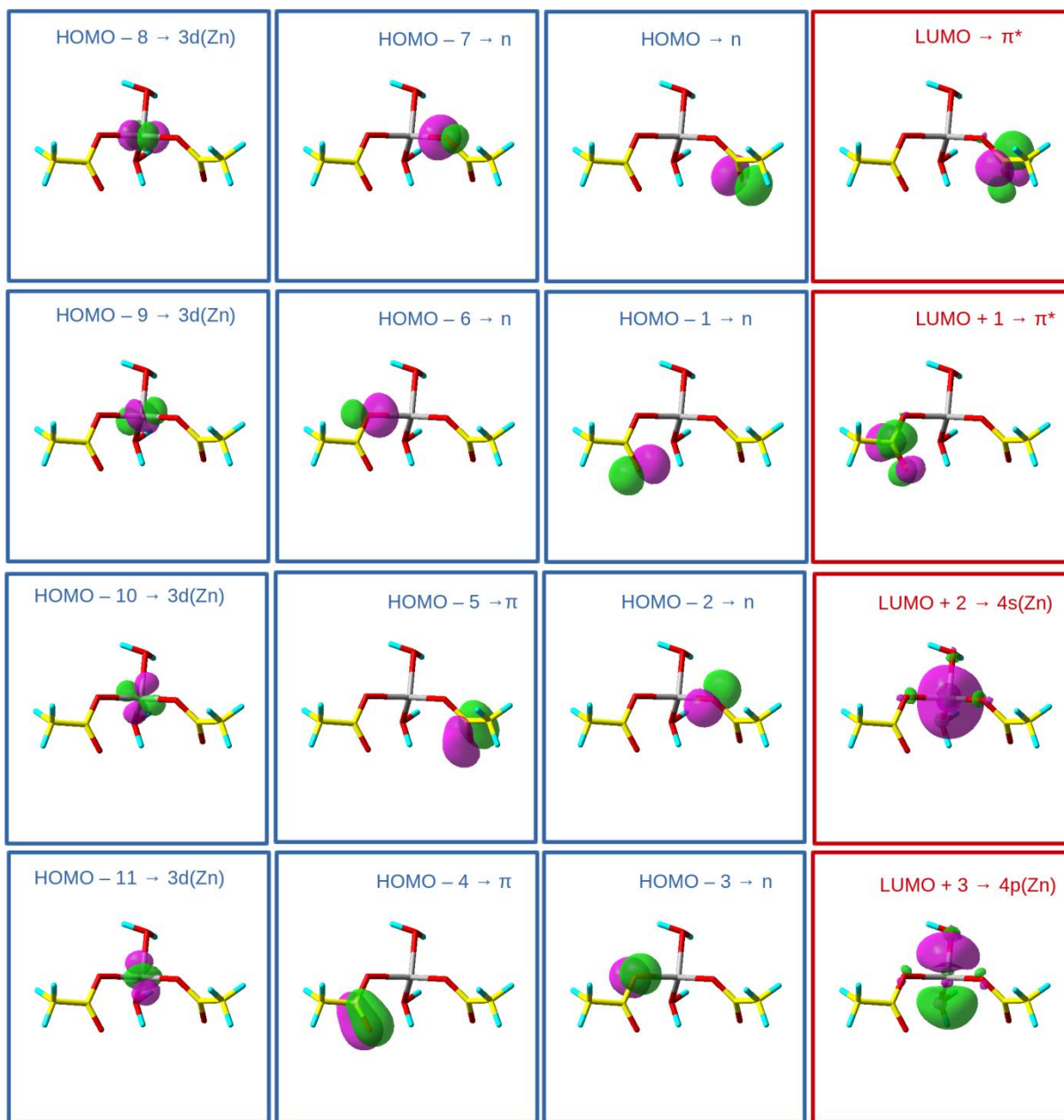
Figura 9. Imagens NBO envolvidas nas principais transições eletrônicas obtidas para o complexo $\text{Fe}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_4$.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

HOMO (*highest occupied molecular orbital*). LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*).

Figura 10. Imagens NBO envolvidas nas principais transições eletrônicas obtidas para o complexo $\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2$.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

HOMO (*highest occupied molecular orbital*). LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*).

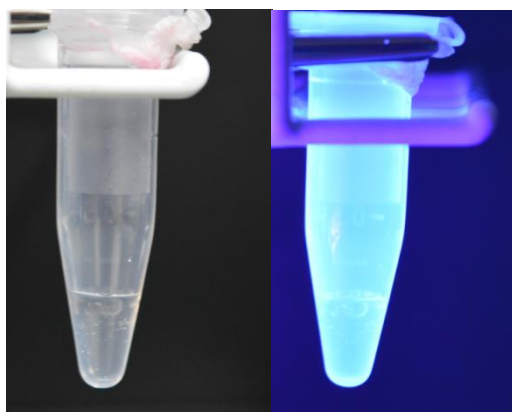
Então, considerando a participação dos orbitais moleculares relevantes, para o complexo $[\text{Zn}(\text{Asp.})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ os estados excitados podem ser atribuídos principalmente como transições envolvendo apenas orbitais do ligante aspartato. Diferentemente, para o complexo

[Fe(Asp.)₂(H₂O)₄], a banda de absorção principal pode ser atribuída principalmente como uma transferência de carga de metal para ligante. Esses resultados teóricos sugerem que por espectroscopia UV-vis: a) o TanP pode funcionar como um sensor para identificar e quantificar (nas concentrações avaliadas) íons de ferro (II); b) TanP parece não ter sensibilidade para o zinco (II) (nas concentrações avaliadas e na faixa espectral considerada).

Mudanças conformacionais de proteínas podem ser monitoradas usando sondas fluorescentes ou fluorescência intrínseca, devido a presença de resíduos de aminoácidos aromáticos, os quais são cromóforos (triptofano, tirosina e fenilalanina) (ZHDANOVA; SHIRSHIN; MAKSIMOV, 2012). Em sua sequência primária, TanP possui 1 resíduo de tirosina, 4 fenilalaninas e 1 triptofano que contribuem com sua fluorescência intrínseca.

Adicionalmente, o perfil de interação entre TanP e íons metálicos foi avaliado utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência (Figura 11).

Figura 11. Demonstração da fluorescência de TanP

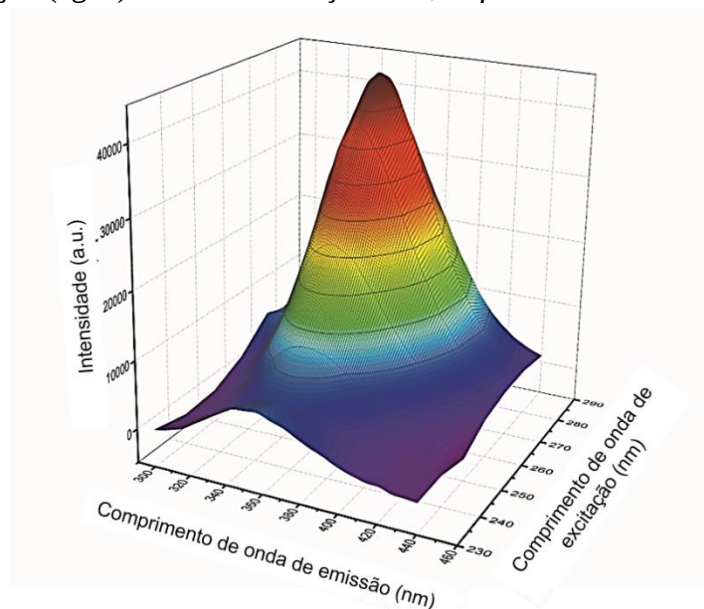


Fonte: Dados obtidos e analisados.

Solução do peptídeo submetida a luz branca (à esquerda). Solução do peptídeo submetida a luz ultravioleta (à direita) com emissão em 353 nm.

Quando avaliado pela técnica de espectroscopia de fluorescência, TanP apresentou uma banda intensa de emissão com $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 353 nm, quando excitado em 285 nm (Figura 12), o qual corrobora com o comprimento de emissão máxima do triptofano, que varia de 310 a 350 nm, a depender do ambiente eletrostático (ADAMS et al., 2002).

Figura 12. Mapa de fluorescência de TanP em diferentes comprimentos de excitação. Peptídeo em solução (água) com concentração de 1,12 μM .

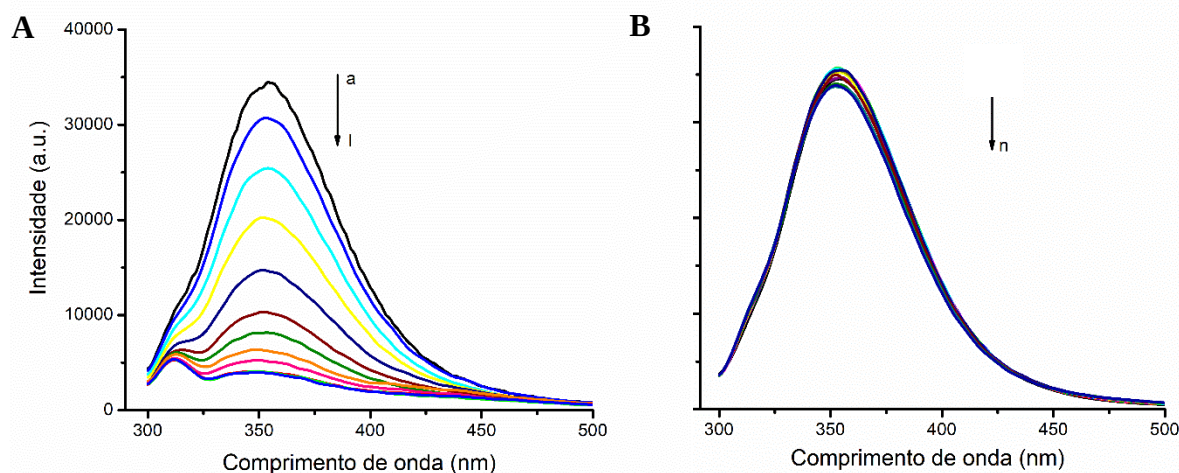


Fonte: Dados obtidos e analisados. O comprimento de onda máximo de excitação ($\lambda_{\text{excitação}}$) foi de 280 nm. A faixa de comprimento de onda de emissão observada foi de 300 nm a 500 nm.

Para os demais aminoácidos cromóforos, tirosina e fenilalanina, o espectro de emissão está na faixa de 290 nm, a qual se sobrepõe com o espectro de absorção do triptofano, fazendo com que haja uma transferência de energia desses aminoácidos para o triptofano, tornando este o cromóforo dominante no processo de fluorescência de peptídeos e proteínas (ZHDANOVA; SHIRSHIN; MAKSIMOV, 2012).

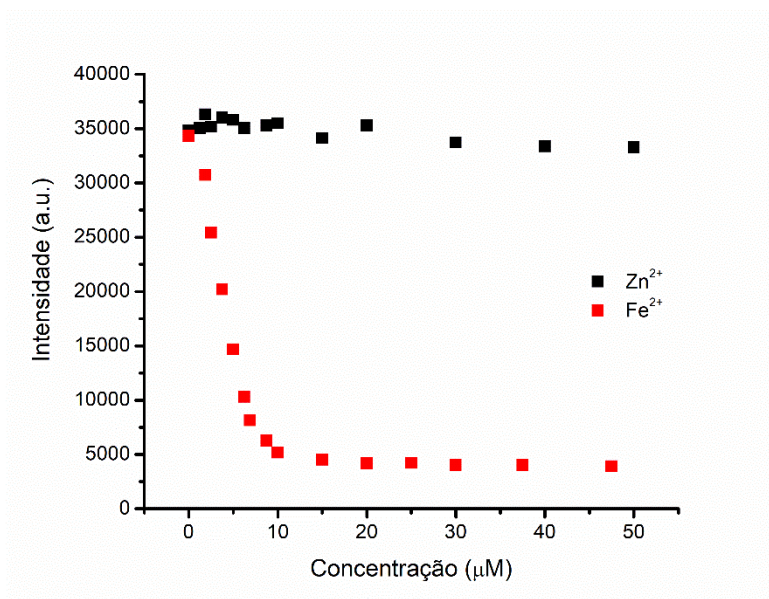
Os espectros de emissão de fluorescência de TanP (1,12 μM) com adição de Fe^{2+} (0 a 47,7 μM) e Zn^{2+} (0 a 50 μM) são apresentados na figura 13A e 13B, respectivamente. Analisando os espectros de emissão, foi observado que a intensidade de fluorescência de TanP diminuiu significativamente após adição de Fe^{2+} . Entretanto nenhuma mudança na emissão de fluorescência deste peptídeo foi observada pela adição de e Zn^{2+} . Além disso, obtivemos que a maior relação TanP: Fe^{2+} (1:7,4) levou à menor intensidade de fluorescência, conforme obtido no gráfico referente às variações espectrais da banda de emissão em função da concentração dos íons metálicos (Figura 14).

Figura 13. Espectro de fluorescência representativo de TanP (1,12 μ M) após adição: (A) Fe^{2+} (0 a 47,7 μ M) e (B) Zn^{2+} (0 a 50 μ M).



Legenda: A concentração de ferro na cubeta: (a) 0 μ M, (b) 1,87 μ M, (c) 2,50 μ M, (d) 3,75 μ M, (e) 5,0 μ M, (f) 6,25 μ M, (g) 6,87 μ M, (h) 8,75 μ M, (i) 10,0 μ M, (j) 30,0 μ M, (k) 35,5 μ M e (l) 47,7 μ M. A concentração de zinco na cubeta: (a) 0 μ M, (b) 1,25 μ M, (c) 1,87 μ M (d) 2,50 μ M, (e) 3,75 μ M, (f) 5,0 μ M, (g) 6,25 μ M, (h) 8,75 μ M, (i) 10,0 μ M, (j) 15,0 μ M, (k) 20,0 μ M (l) 30,0 μ M, (m) 40,0 μ M and (n) 50,0 μ M.

Figura 14. Intensidade de fluorescência de TanP em 353 nm com o aumento de Fe^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Pontos pretos e vermelhos correspondem ao Zn^{2+} e Fe^{2+} , respectivamente.

Quando um ligante se coordena a uma proteína nas proximidades do triptofano, pode ocorrer uma diminuição acentuada de sua intensidade de fluorescência e/ou tempo de vida de fluorescência. Além disso, o comprimento de onda máximo no espectro de fluorescência do triptofano depende fortemente da polaridade de seu microambiente. A fluorescência da tirosina em proteínas é geralmente extinta devido à ionização do resíduo por grupos amino ou carboxila vizinhos, ou transferência de energia de excitação para o triptofano (ZHDANOVA; SHIRSHIN; MAKSIMOV, 2012).

Pode-se atribuir a variação de intensidade da banda de emissão de TanP às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos cromóforos, em particular, o resíduo de triptofano, sugerindo que há uma interação do centro metálico (Fe^{2+}) com resíduos de aminoácidos próximos ao triptofano, que resultou na supressão da fluorescência intrínseca do próprio peptídeo (TanP).

As mudanças observadas nas bandas de emissão de TanP, na presença de Fe^{2+} , corroboram com os resultados obtidos em UV-Vis. No espectro eletrônico (UV-Vis) a razão encontrada foi de 1:5,5 (TanP: Fe^{2+}) para o ensaio com 25 μM de TanP. Em contrapartida, no acompanhamento da fluorescência, obteve-se uma relação de 1: 7,4 (TanP: Fe^{2+}) utilizando uma concentração menor de TanP (1,12 μM). Semelhante proporção foi relatada no ensaio UV-Vis com íons Cu^{2+} , para uma concentração de peptídeo de 2,11 μM , mencionando-se uma proporção 1:7 (TanP: Cu^{2+}) (MELO et al., 2017).

Dessa forma, pode-se sugerir que em maiores concentrações existe maior probabilidade de ocorrer um enovelamento da cadeia do peptídeo, bloqueando ou dificultando as interações do metal nos sítios de coordenação de TanP, e assim justificando uma menor proporção de interação TanP:Metal, em soluções mais concentradas.

Os resultados apresentados sugerem também que o Fe^{2+} , assim como o Cu^{2+} abordado em estudo anterior, possuem uma interação química significativa com TanP, não sendo observado perfil de coordenação semelhante com o Zn^{2+} e o Ca^{2+} divalentes, nas condições experimentais observadas. As diferenças no comprimento e na carga líquida dos peptídeos podem afetar a extensão da formação de quelatos com cátions metálicos divalentes (ZHANG; LIN; WANG, 2018), além da geometria formada.

Cada íon metálico, como um ácido de Lewis, apresenta maior afinidade por determinados átomos doadores. Essas preferências são baseadas na teoria *hard-soft* de ácidos

e bases (JEŻOWSKA-BOJCZUK; STOKOWA-SOŁTYS, 2018). Um íon hidrogênio é dissociado dos grupos de ácido dos ligantes, resultando na combinação entre o ligante e o íon metálico (ZHAO et al., 2014).

Com relação a interação entre peptídeo e centros metálicos, tem-se que os grupos doadores ocorrem na cadeia principal do peptídeo, bem como nas cadeias laterais dos aminoácidos. Os doadores pertencentes à cadeia principal incluem o grupo amino N-terminal, o carboxilato C-terminal e os átomos de nitrogênio das ligações peptídicas. Nos peptídeos que consistem em aminoácidos com cadeias laterais não coordenantes, o principal local de ligação para os íons metálicos é a amina N-terminal (JEŻOWSKA-BOJCZUK; STOKOWA-SOŁTYS, 2018).

Para a complexação com íons Fe^{2+} , as geometrias obtidas são geralmente octaédricas. Sítios de coordenação envolvendo doadores de enxofre, nitrogênio e oxigênio são conhecidos por promoverem tal interação (BAL et al., 2013; ANTONIETTI et al., 2017). Estudos com peptídeo quelante de ferro sugerem que os sítios de ligação ao metal também podem ser os grupos carboxila dos resíduos aspártico e glutâmico (LV et al., 2009; CAETANO-SILVA; CILLA; BERTOLDO-PACHECO, 2017).

Estudo envolvendo três novos peptídeos quelantes de ferro demonstrou que os grupos terminais amino e carboxilato e as ligação peptídica da estrutura do peptídeo, bem como os grupos amino e imina de arginina, amino de lisina, imina de histidina e carboxilato de cadeia lateral do ácido aspártico estavam envolvidos na complexação com o metal. Além disso, verificou-se que a ausência desses resíduos de aminoácidos na cadeia do peptídeo acarreta num menor potencial quelante de ferro (WU et al., 2017).

Ademais, resíduos de aminoácidos como leucina, valina e prolina também foram reconhecidos como críticos para a coordenação do ferro, com o grupo hidroxila envolvido na coordenação do metal (ECKERT et al., 2016). Assim, pode-se inferir que os íons Fe^{2+} complexam-se a TanP possivelmente pela ligação aos átomos de oxigênio dos grupos carboxilato da cadeia lateral do aspártico e glutâmico. Além da ligação covalente coordenada, outras interações, como forças de *Van der Waals*, forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, influenciam fortemente a formação do complexo peptídeo- Fe^{2+} e até mesmo sua estabilidade (ECKERT et al., 2016).

A fosforilação de resíduos de serina e tirosina permitem a ligação com metais de cálcio e zinco, sendo sítios de coordenação adequados. Além disso, a valina, aminoácido hidrofóbico, pode contribuir para coordenação de íons cálcio. A importância dos resíduos de serina na capacidade de quelação de cálcio está relacionada aos grupos hidroxilas presente na cadeia lateral do aminoácido (ZHANG; LIN; WANG, 2018).

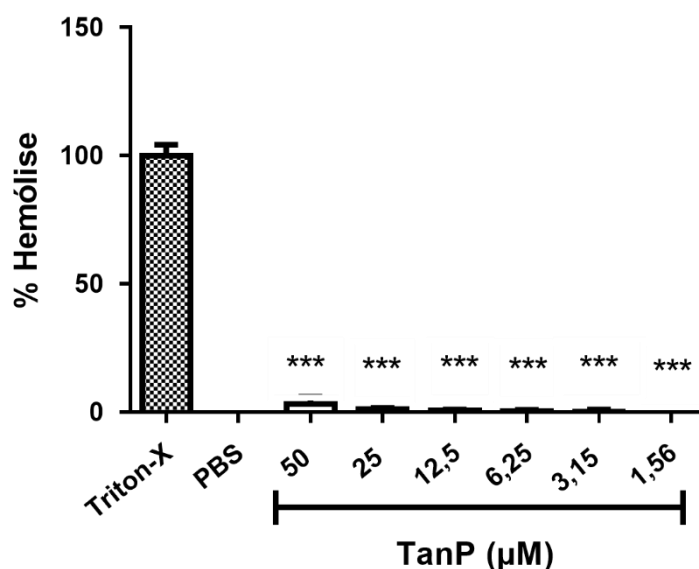
Em relação aos peptídeos quelantes de zinco, o grupo carboxila da asparagina, quantidade e distribuição de grupos hidrofílicos e átomos de oxigênio carboxílico e nitrogênio da amina foram sugeridos como sendo importantes para coordenar o Zn^{2+} , fornecendo sítios quelantes apropriados (LIU et al., 2019). Quanto maior o número de resíduos de histidinas em um peptídeo, mais forte é sua capacidade de coordenação a este metal e essa ligação ocorre juntamente com uma molécula de água formando uma estrutura tetraédrica (REMELLI et al., 2018). Além disso, a presença de carboxilatos nas cadeias laterais e a localização espacial particular dos resíduos de ácido aspártico na estrutura dos peptídeos podem influenciar a capacidade de quelação do zinco e também contribuir simultaneamente para a estabilidade termodinâmica dos peptídeos (LIU et al., 2019). Portanto, embora TanP tenha poucos resíduos de valina e serina, e nenhum resíduo de histidina em sua estrutura primária, o fato de TanP conter resíduos de ácido aspártico pode influenciar a coordenação do zinco metálico.

5.2 Avaliação da atividade hemolítica de TanP *in vitro*

A avaliação da atividade hemolítica de TanP em eritrócitos humanos foi realizada em concentrações de 1,56 a 50 μM do peptídeo. TanP apresentou baixa atividade hemolítica para todas as concentrações testadas, havendo 3% de atividade hemolítica quando avaliado na maior concentração (50 μM) (Figura 15). O perfil de toxicidade a eritrócitos de TanP se assemelha ao TistH, hipotensina identificada na peçonha de *T. stigmurus* (MACHADO et al., 2015). Enquanto a Stigmurina, peptídeo catiônico do *T. stigmurus*, apresentou atividade hemolítica de 22% quando avaliada na concentração de 139,5 μM (DE MELO et al., 2015). Esses dados sugerem que o mecanismo de ação de TanP provavelmente não envolve o rompimento das membranas celulares e que essa fração não faz parte do grupo de toxinas responsáveis por propriedades hemolíticas. Na perspectiva de utilizar TanP como um

protótipo de um novo fármaco com aplicação sistêmica, é importante o fato de apresentar baixa toxicidade contra eritrócitos.

Figura 15. Atividade hemolítica de TanP *in vitro*



Fonte: Dados obtidos e analisados.

A significância estatística foi realizada por meio de ANOVA seguida do teste de Tukey e expressa como média $\pm$ DP ($n = 3$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo de controle positivo (Triton-X).

Resultados similares ao de TanP foram observados para outros peptídeos aniônicos, com relação a baixa toxicidade para eritrócitos humanos. O peptídeo U1-SCRTX-Lg1a presente na peçonha da aranha *Loxosceles gaucho*, o qual possui carga -3, não apresentou liberação de hemoglobina, indicando que não causa hemólise de eritrócitos humanos nas concentrações avaliadas (0,13 a 137 μ M) (SEGURA-RAMÍREZ; SILVA JÚNIOR, 2018).

Maximim H5, peptídeo antimicrobiano aniônico do anfíbio *Bombina máxima*, não exibiu hemólise de glóbulos vermelhos de coelhos quando avaliados em concentrações até 80 μ M, sugerindo-se que tal resultado esteja relacionado com a ausência de carga positiva do peptídeo (LAI et al., 2002). PopuDef, uma defensina aniônica purificada a partir da pele do anfíbio *Polypedates puerensis*, possui 15 resíduos de aminoácidos, sendo 6 cisteínas, induziu 3,6% de hemólise de eritrócitos humanos na concentração de 43,14 μ M. Sugerindo que o fato

dos peptídeos aniônicos diferirem dos catiônicos na composição de aminoácidos, carga, estrutura secundária, hidrofobicidade e anfifilicidade deve estar relacionado a capacidade dos peptídeos catiônicos de se ligar e romper as membranas biológicas mais facilmente (WEI et al., 2015).

Peptídeos lipofílicos, bem como peptídeos com maior capacidade de assumir uma estrutura secundária anfipática estável tendem a ser mais hemolíticos e os aminoácidos que apresentam o efeito mais forte na atividade hemolítica por meio de hidrofobicidade ou carga são Trp, Lys e Arg (ARASTEH; BAGHERI, 2017).

5.3 Avaliação do potencial antioxidante de TanP *in vitro*

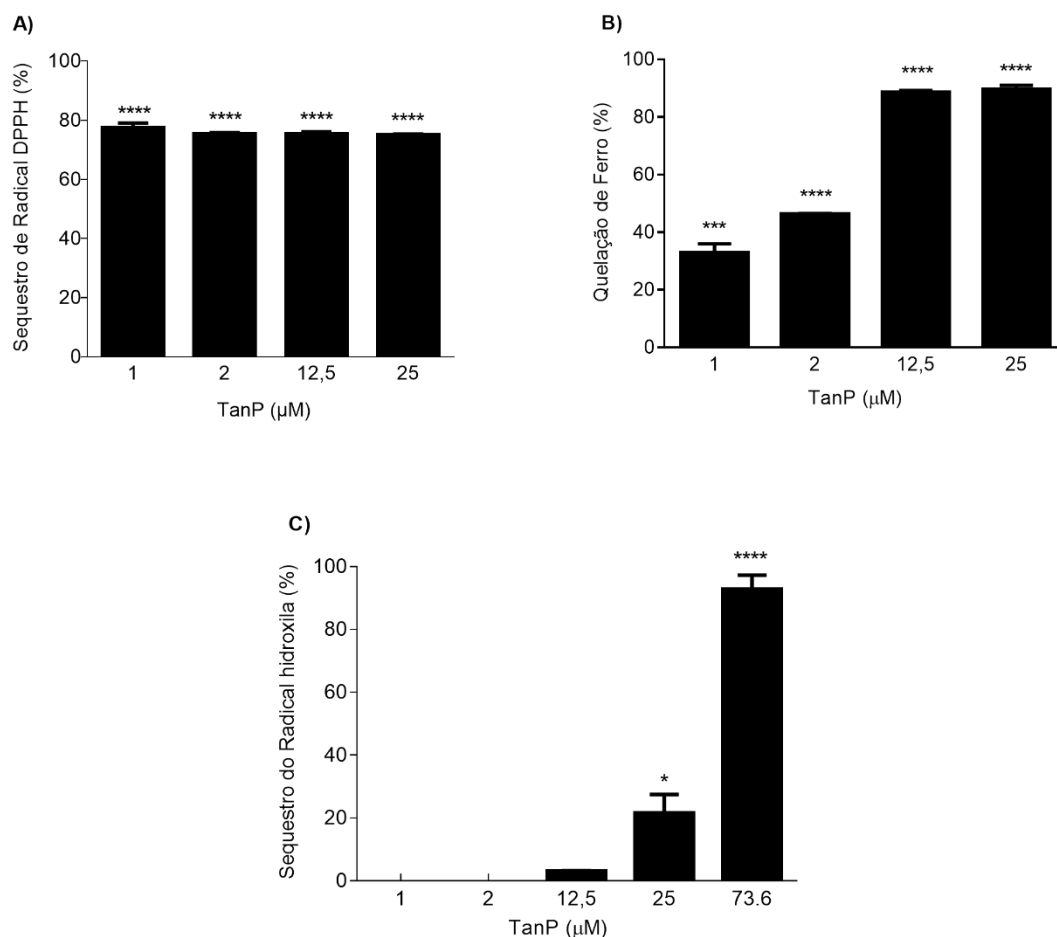
Os possíveis papéis dos íons metálicos no desenvolvimento e início de doenças neurodegenerativas motivaram estudos de complexos de peptídeos (SÓVÁGÓ et al., 2016). Além disso, muitas doenças como câncer, diabetes, arteriosclerose, doença inflamatória, autoimunidade, doença cardiovascular e doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer têm sido associadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou à incapacidade do organismo de reduzir essas ROS (NASCIMENTO et al., 2013).

O termo antioxidante refere-se a compostos que podem prevenir a formação de substâncias biológicas e danos de oxidação química induzidos por espécies reativas. O processo de formação dessas espécies reativas ocorre por meio de uma reação em cadeia envolvendo três etapas, a iniciação, propagação e terminação, em que os antioxidantes atuam por diversos mecanismos (WALI et al., 2019). Assim, neste trabalho, diferentes métodos foram usados para avaliar o efeito de TanP nos diferentes estágios de iniciação (sequestro do radical DPPH e poder redutor), propagação (quelção de íons) e terminação (sequestro do radical hidroxila e superóxido).

Em relação à capacidade de sequestro dos radicais DPPH, TanP apresentou atividade acima de 70% em todas as concentrações testadas (1 a 25 μ M) (Figura 16A). Para o ensaio de quelção de íons ferro, TanP apresentou 89,7% de atividade (Figura 16B) quando avaliado na maior concentração (25 μ M). Em relação aos radicais hidroxilas, embora nenhuma inibição tenha sido observada em concentrações mais baixas (até 12,5 μ M), na concentração mais alta de 73,6 μ M, TanP apresentou 96% de atividade de sequestro do radical hidroxila

(Figura 16C). Nenhuma das concentrações testadas de TanP apresentou atividade quanto ao sequestro de íon superóxido e capacidade redutora (dados não mostrados).

Figura 16. Atividade antioxidante de TanP. (A) Percentual de sequestro do radical DPPH. (B) Percentual de quelação de ferro. (C) Percentual de sequestro de radical hidroxila



Fonte: Dados obtidos e analisados

Em (A) Uma solução de DPPH (150 µM) foi utilizada como controle. Em (B) o EDTA (0,1 mg/mL) foi utilizado como controle positivo, apresentando atividade de 86,8% de quelação de íons ferro. Em (C) os resultados foram expressos como percentual de sequestro de radical hidroxila (%) em comparação com o ácido gálico padrão (0,25 a 2 mg / mL). Os dados são relatados como médias $\pm$ DP (n = 3). A significância estatística foi realizada por meio de ANOVA seguida do teste de Tukey e expressa como média $\pm$ DP (n = 3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo de controle.

A análise do efeito antioxidante relacionado à quelação de ferro tem como princípio o fato deste íon catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo radical hidroxila e radical superóxido, levando à oxidação de lipídios insaturados e promovendo dano oxidativo em diferentes níveis (NASCIMENTO et al., 2013).

Dentre as ROS, o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) é o mais reativo quimicamente, que pode reduzir os átomos de hidrogênio de moléculas de tiol biológicas e formar radicais de enxofre capazes de se combinar com o oxigênio para gerar radicais de óxido de enxofre, promovendo o dano as diferentes moléculas biológicas (SINGH; SINGH, 2008; MELO-SILVEIRA et al., 2012).

Embora atividades de moléculas de escorpiões sejam abordadas com frequência na literatura, até o presente momento são poucas as informações sobre peptídeos de escorpião com potencial antioxidante (WALI et al., 2019), fato esse que motiva este trabalho para avaliar a atividade antioxidante de TanP. Stigmurina, peptídeo antimicrobiano catiônico de *T. stigmurus* apresentou atividade de sequestro de íons hidroxila em baixas concentrações (DANIELE-SILVA et al., 2021). Frações peptídicas isoladas da peçonha de *Buthus occitanus* apresentaram efeito antioxidante e de sequestro de radicais livres (BEKHEET et al., 2013), enquanto peptídeos antioxidantes de *Buthus martensii* Karsch demonstraram alta atividade de sequestro de radicais $\text{ABTS}^{\cdot+}$ e DPPH, mas não apresentaram atividade de sequestro de radical hidroxila (WALI et al., 2019).

Diferentes resíduos de aminoácidos podem ser responsáveis pela atividade antioxidante de peptídeos, que geralmente ocorre devido a quelação de metais de transição e eliminação de radicais livres. O alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos nos peptídeos é um dos principais fatores responsáveis pela atividade antioxidante (WALI et al., 2019). Além disso, cadeias laterais contendo enxofre nucleofílico em resíduos de cisteína e metionina e cadeias laterais aromáticas em resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina podem facilmente doar átomos de hidrogênio (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012). Em sua sequência primária, TanP possui 23 resíduos hidrofóbicos, o que pode estar relacionado à sua atividade antioxidante.

O processo de formação de ROS ocorre por uma reação em cadeia envolvendo as etapas de iniciação, propagação e terminação, em que os antioxidantes atuam por diversos mecanismos (MELO et al., 2013). Assim, verificamos que TanP revelou efeito antioxidante

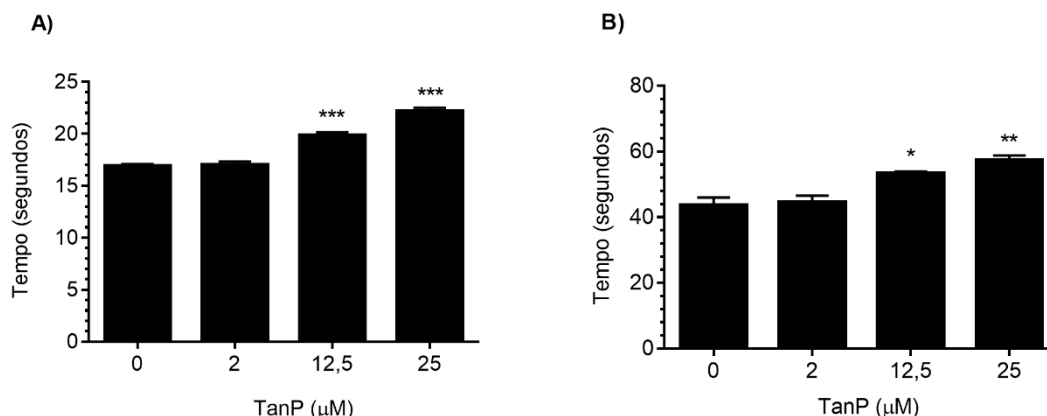
nos diferentes estágios de iniciação (redução do DPPH), propagação (quelção de íons) e terminação (eliminação do radical hidroxila), sendo este estudo pioneiro em demonstrar o potencial antioxidante dos peptídeos aniônicos presentes na peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*, sugerindo potencial aplicação como protótipo na obtenção de novos agentes antioxidantes.

5.4 Avaliação do potencial hemostático de TanP *in vitro*

Diversas peçonhas de animais têm apresentado capacidade de atuar no sistema hemostático humano como agente anticoagulante ou procoagulante. Os componentes procoagulantes causam ativação do sistema de coagulação, incluindo o consumo de diferentes fatores da cascata de coagulação, enquanto as moléculas anticoagulantes inibem enzimas como o fator Xa ou trombina (BRAZÓN et al., 2009)

Algumas peçonhas de escorpiões provocam desordens de coagulação sanguínea (BRAZÓN et al., 2008, 2011, 2014; REN et al., 2014; TRAN et al., 2017; KHAN et al., 2018), porém o número de moléculas coagulopáticas estudadas ainda é pequeno. TanP apresentou atividade anticoagulante nas concentrações de 12,5 μM e 25 μM (Figura 17). No ensaio de TP, verificou-se um tempo de coagulação de 20s e 22,5s, para as concentrações de 12,5 μM e 25 μM , respectivamente (Figura 17A). Paralelamente, no ensaio de TTPa verificou-se um tempo de coagulação de 53,4s e 58,4s, para as concentrações de 12,5 μM e 25 μM , respectivamente (Figura 17B). Plasma com Heparina foi usada como controle positivo e como já esperado, apresentou atividade anticoagulante significativa, com TP maior que 60s (controle negativo: 16.27 ± 0.32 s) e TTPa maior que 240s (controle negativo: 35.07 ± 0.03 s).

Figura 17. Avaliação da atividade anticoagulante de TanP *in vitro*. (A) Ensaio de Tempo de Protrombina. **(B)** Ensaio de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

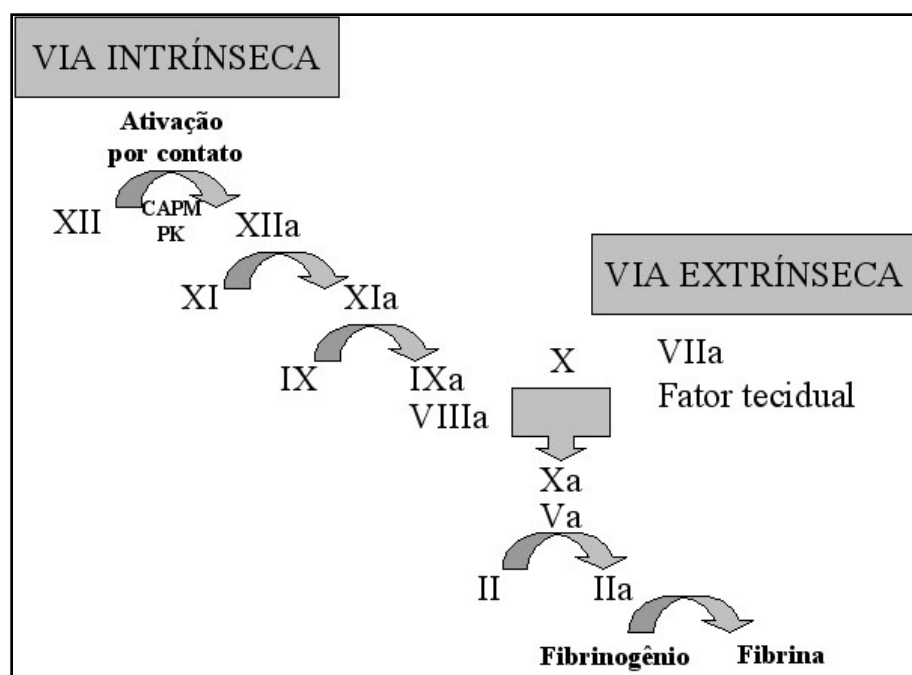


Fonte: Dados obtidos e analisados.

Plasma com Heparina foi usada como controle positivo em (A) TP > 60s (controle negativo: 16.27 ± 0.32 s) e (B) TTPa > 240s (controle negativo: 35.07 ± 0.03 s). Os dados são relatados como médias $\pm$ DP (n = 3). A significância estatística foi realizada por meio de ANOVA seguida do teste de Tukey e expressa como média $\pm$ DP (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001, em comparação com o grupo de controle negativo (plasma na ausência de TanP).

A coagulação sanguínea humana é dependente da via extrínseca e intrínseca, as quais envolvem cascatas enzimáticas. Essas duas vias são combinadas na etapa de ativação do fator IX ou X e terminam na formação de fibrinogênio (KHAN et al., 2018). Posteriormente, o fibrinogênio solúvel se converte em fibrina sob ação da trombina, e o excesso de fibrina no vaso pode desencadear uma doença trombótica (REN et al., 2014). A conversão do fibrinogênio em fibrina é iniciada como resultado da clivagem das cadeias A α e B β do fibrinogênio pela trombina (fator II ativado) (Figura 18). O sistema hemostático requer um equilíbrio entre a formação de fibrina (coagulação) e sua dissolução (fibrinólise) (BRAZÓN et al., 2014). Nesse contexto moléculas presente em peçonhas que causam desordens hemostáticas, podem estar atuando por diversos mecanismos de ação (KHAN et al., 2018).

Figura 18. Esquema da cascata da coagulação, proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias.



Fonte: FRANCO, 2001.

CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína.

Algumas peçonhas de escorpiões, como *Buthotus judaicus*, *Heterometrus spinnifer*, *Parabuthus transvaalicus*, *Androctonus australis*, *Scorpio maurus palmatus*, *Leiurus quinquestriatus habraeus* e *Pandinus imperator* não exibiram atividades anticoagulante, coagulante ou hemorrágicas significativas (NGET-HONG; GNANAJOTHY, 1992).

Dipeptídeos isolados da peçonha do escorpião *Heterometrus laoticus* também não tem demonstrado atividade anticoagulante nas concentrações até 100 µM nos ensaios de TP e TTPa com plasma humano. Embora, tais moléculas tenham prolongado, intensamente, o tempo de sangramento da cauda do camundongo e o tempo de formação de coágulo *in vitro* (TRAN et al., 2017).

Com relação ao gênero *Tityus*, a Discreplasminina, peptídeo isolado da peçonha de *Tityus discrepans* apresentou atividade antifibrinolítica, uma vez que inibe a plasmina. (BRAZÓN et al., 2008, 2009).

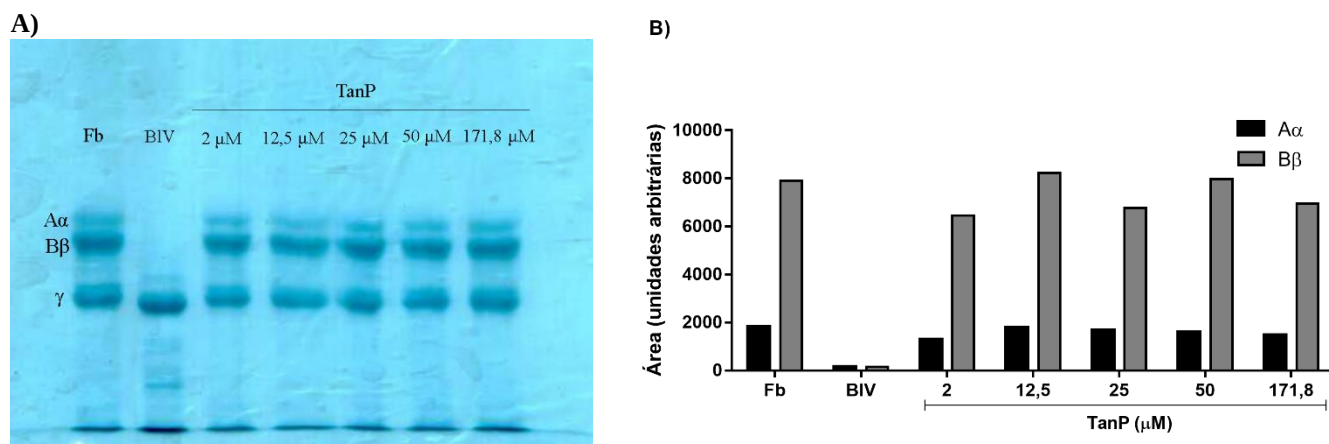
O hidrolisado da proteína BmK do escorpião *Buthus martensii Karsch* também exibiu alta atividade anticoagulante, quando avaliado pelo ensaio de inibição da atividade de

trombina (REN et al., 2014) e essa ação tem sido associada à presença de aminoácidos carregados negativamente e resíduos hidrofóbicos, demonstrando que os componentes presentes na peçonha de escorpiões podem induzir uma ampla variabilidade de efeitos hemostáticos.

Em adição a atividade anticoagulante, TanP também foi avaliado em relação a sua capacidade de hidrolizar o fibrinogênio, tendo em vista investigar sua potencialidade como agente trombolítico (Figura 19). Como pode ser observado pela análise densitométrica do perfil eletroforético do fibrinogênio, TanP não degradou as cadeias A α e B β nas concentrações avaliadas.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, foi identificado na peçonha de *T. discrepans* enzimas fibrinogenolíticas responsáveis pela degradação da cadeia A α e B β do fibrinogênio, estando esses mecanismos também relacionados ao prolongamento de TP e TTPa produzido por essa peçonha (BRAZÓN et al., 2014).

Figura 19. Atividade fibrinogenolítica de TanP. (A) Gel de SDS-PAGE 12%, corado por Coomassie Brilliant Blue G-250. (B) Análise densitométrica da degradação das cadeias A α e B β do fibrinogênio.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Fb: Fibrinogênio bovino. BIV: peçonha de *Bothrops leucurus* (controle positivo).

Os resultados verificados neste estudo sugerem que a atividade anticoagulante de TanP pode estar envolvida com a ação inibitória sobre os fatores de coagulação. Outra hipótese possível para a ação anticoagulante observada é que o possível alvo da intervenção

do peptídeo pode ser a agregação plaquetária, uma vez que peptídeos isolados do escorpião *Heterometrus laoticus*, diminuíram a taxa de agregação plaquetária induzida por colágeno (TRAN et al., 2017). Estudos com a peçonha de *T. discrepan* também sugerem que as plaquetas possam ser alvo de mecanismo de ação de moléculas presentes na peçonha (BRAZÓN et al., 2011).

Embora outros peptídeos da peçonha de escorpião com atividade anticoagulante sejam descritos na literatura, este é o primeiro relato que demonstra que peptídeos aniônicos presentes na peçonha de escorpião possuem potencial capacidade de alterar a hemostasia. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação anticoagulante do TanP.

5.5 Avaliação do potencial imunomodulador de TanP

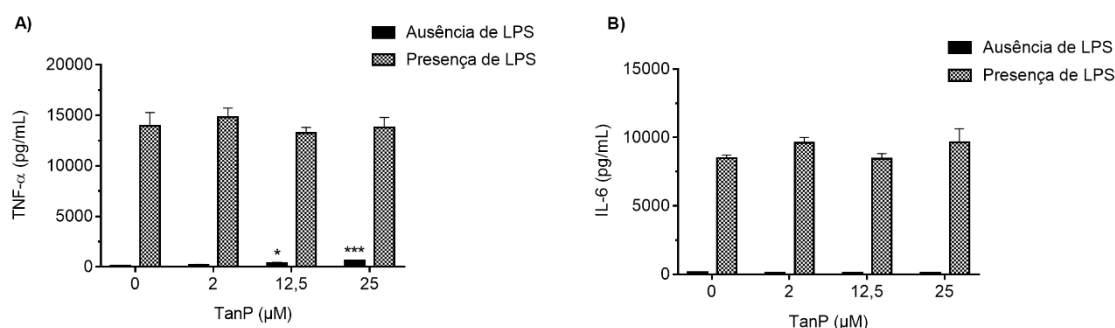
As citocinas pró-inflamatórias, secretadas por macrófagos ativados, são uma classe de polipeptídeos solúveis de baixa massa molecular que têm diferentes efeitos sobre a ação do sistema imunológico nativo e adquirido. Os efeitos das linfocinas e endotoxinas nos macrófagos são mediados pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), que é um modulador de doenças imunológicas (YU et al., 2020).

Atraves da imunomodulação, o sistema imunológico busca conter várias doenças potencialmente fatais, como câncer, vírus da imunodeficiência humana, esclerose múltipla e envelhecimento. Nesse contexto, destaca-se os macrófagos, que são leucócitos mononucleares responsáveis pela regulação imunológica através da produção de citocinas como interferon (IFN- γ), TNF- α , interleucinas (IL) -1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 (KANG et al., 2019).

A modulação de macrófagos induzida por TanP também foi investigada. Inicialmente foi determinada a atividade citotóxica pelo ensaio de MTT. Nas concentrações avaliadas TanP (2 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M) não apresentou redução da viabilidade celular (dados não mostrados), indicando um potencial não tóxico sobre os macrófagos murinos. No entanto, TanP induziu um perfil de liberação distinto das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, na ausência de LPS. Um aumento na liberação de TNF- α de 316,26 pg/mL e 622,56 pg/mL foi detectado no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos na presença de TanP 12,5 μ M e 25 μ M, respectivamente, quando estimulados por 24 h (Figura 20A), enquanto nenhuma mudança significativa foi observada para os níveis de IL-6 (Figura 20B). Quando os

macrófagos foram pré-estimulados com LPS, TanP (2 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M) não induziu alterações no perfil de liberação das citocinas TNF- α e IL-6, quando comparado ao LPS na ausência do peptídeo, após a incubação por 24h (Figura 20).

Figura 20. Efeito de TanP nos níveis de citocinas em sobrenadante de macrófagos murinos. (A) Liberação de citocina TNF- α na presença ou ausência de LPS. (B) Liberação de citocina IL-6 na presença ou ausência de LPS.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Os níveis de secreção de citocinas por células RAW 264.7 foram mensurados 24 h após a incubação com LPS (2 μ g/mL) e / ou diferentes concentrações de TanP (0 a 25 μ M). A significância estatística foi realizada por meio de ANOVA seguida do teste de Tukey e expressa como média $\pm$ DP (n = 3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo de controle negativo (células sem TanP e LPS) ou grupo de controle positivo (células apenas com LPS).

Peçonhas e toxinas são responsáveis pela modulação da resposta imune (PETRICEVICH, 2002; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005). Tem sido reportado na literatura que o envenenamento por diferentes espécies de escorpião, até mesmo do gênero *Tityus*, resulta na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias e que o equilíbrio entre tais citocinas no envenenamento determina o grau e a extensão da inflamação, que pode levar a efeitos clínicos importantes, como disfunção cardíaca, edema pulmonar e choque (PETRICEVICH, 2010). Desse modo, torna-se relevante a identificação das moléculas responsáveis por ativarem os macrófagos.

Estudos anteriores com a peçonha do escorpião de *Tityus serrulatus* (TSV), demonstraram que a incubação de macrófagos com TSV proporcionou um aumento na produção de IL-6 e IFN- γ , porém não houve detecção de TNF- α no sobrenadante das células

(PETRICEVICH, 2002). Entretanto quando avaliou a atividade de frações isoladas dessa peçonha, verificou-se que a fração FII revelou ser um potente ativador da produção de TNF- α em macrófagos (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005).

É sabido que a presença de aminoácidos básicos na cadeia do peptídeo é um fator importante para a interação deste com macrófagos. Peptídeos catiônicos isolados da peçonha de *Tityus serrulatus* foram capazes de modular respostas de macrófagos, aumentando a liberação de IL-6. Foi sugerido que essa atividade poderia estar relacionada a uma ativação direta (interação dos peptídeos com receptor *Toll Like*) e/ou indireta (interação dos peptídeos com canais de sódio), não sendo avaliado a atividade dos peptídeos na presença do LPS (PUCCA et al., 2016).

O LPS, conhecido como endotoxina, é um importante componente da membrana de bactérias gram-negativas que pode induzir respostas do hospedeiro durante infecções bacterianas, como febre, hipotensão, anormalidades circulatórias, falência de múltiplos órgãos e, até a morte. Muitas dessas respostas podem ser atribuídas aos efeitos diretos do LPS ou produção de citocinas mediada por esta molécula (ZOCCAL et al., 2011). Sendo assim, procuramos investigar os efeitos do TanP também em combinação com LPS, não sendo observado qualquer alteração no perfil de liberação de citocinas, com relação aos macrófagos estimulados apenas por LPS (Figura 20).

Apesar de não possuir resíduos de aminoácidos básicos em sua composição e ser rico em resíduos ácidos e hidrofóbicos, TanP foi capaz de modular a liberação de citocinas pelos macrófagos na ausência de LPS. Além disso, considerando que a principal via de ativação de macrófagos por LPS é sua ligação a receptores *Toll Like 4* (TRL4), pode-se sugerir que TanP provavelmente interage com algum receptor toll-like (como TRL4), ativando o macrófago e induzindo a produção de TNF- α , mas essa interação é significativamente menor do que o poder do receptor de reconhecer o LPS, de modo que a presença do peptídeo não interfere na ativação causada pelo LPS. Também se faz necessário um estudo de eletrofisiologia para avaliar o potencial de interação de TanP com os canais iônicos dependentes de voltagem, para melhor poder elucidar o mecanismo pelo qual TanP promove a modulação de macrófagos, na ausência de LPS.

ToAP3 e ToAP4, peptídeos catiônicos obtidos da peçonha de *Tityus obscurus*, demonstraram potencial imunomodulador *in vitro* sobre macrófagos estimulados por LPS,

sendo capazes de reduzir a liberação de TNF- α . No entanto, nenhum aumento nos níveis de citocinas foi observado quando ambas as células foram tratadas com ToAP3 ou ToAP4 sozinhos, quando comparados com células não tratadas. Tais peptídeos podem estar se ligando ao próprio receptor de LPS, induzindo redução na liberação da citocina pró-inflamatória (VELOSO JÚNIOR et al., 2019).

São escassos os estudos de peptídeos aniônicos relacionados a imunomodulação. E até o presente momento é desconhecido qualquer estudo que tenha avaliado o potencial imunomodulador de um peptídeo aniônico de peçonha de escorpiões, sendo estes resultados pioneiros. Perfil semelhante ao TanP foi apresentado por peptídeos neutros da pele de sapo, frenatin-2D (CONLON; MECHKARSKA; PANTIC, 2013) e plasticin-L1 (SCORCIAPINO et al., 2013), em que ambos estimularam significativamente a produção de TNF- α por macrófagos, mas os peptídeos não potencializaram a estimulação produzida por LPS, ainda não sendo elucidado o mecanismo de ação pelo qual os peptídeos promovem a imunodulação.

Em estudo anterior, foi apresentado que TanP foi capaz de inibir a liberação de nitrito por macrófagos RAW na presença de LPS, indicando que o peptídeo neutraliza a produção de óxido nítrico induzida por LPS. O tratamento TanP sem estimulação com LPS atingiu o mesmo nível que o controle negativo (MELO et al., 2017).

No presente trabalho, TanP aumentou a liberação de TNF- α , quando os macrófagos não foram estimulados por LPS, não promovendo alterações na liberação de IL-6. Desse modo, sugere-se que TanP apresenta um potencial imunomodulador, pois em macrófagos não estimulados pode aumentar a liberação de um mediador inflamatório, o que pode estar relacionado a resposta inflamatória gerada pelo envenenamento por *T. stigmurus*, ao passo que na presença de LPS diminui a produção de óxido nítrico, e desse modo evita reações inflamatórias exarcebadas.

Este peptídeo pode ser um protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe imunomoduladora, sendo o presente trabalho a base para uma futura compreensão mais completa das relações estrutura-atividade.

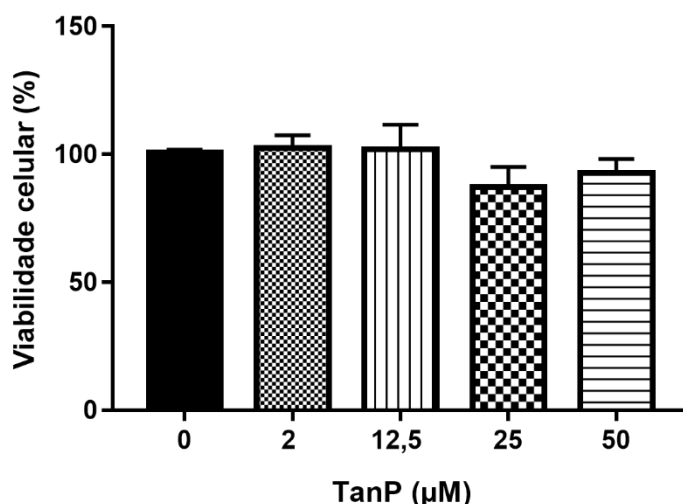
5.6 Viabilidade celular de 3T3

No cenário de lesão cutânea, a cicatrização da ferida após a hemostasia ocorre em três estágios sobrepostos: inflamação, proliferação e remodelação. Os fibroblastos são críticos

em todas as três fases, desempenhando um papel fundamental na deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), contração da ferida e remodelação de nova MEC (DESJARDINS-PARK; FOSTER; LONGAKER, 2018). Até o presente momento, são poucos os estudos relacionados ao mecanismo de cicatrização de feridas induzidos por peptídeos aniônicos.

Neste estudo, demonstrou-se que TanP (2 - 50 μ M) não possui potencial para promover a proliferação de células 3T3 (ATCC CCL-92), *in vitro*, quando incubadas por 24 h. Porém não houve redução da viabilidade celular, o que indica que TanP não é tóxico para essa linhagem celular (Figura 21).

Figura 21. Efeito de TanP na proliferação de células 3T3, *in vitro*



Fonte: Dados obtidos e analisados. A proliferação de células 3T3 (ATCC CCL-92) foi avaliada usando o método MTT, após 24 h de tratamento. A densidade óptica foi medida em 570 nm. Os valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparando com o grupo controle (100% de viabilidade celular).

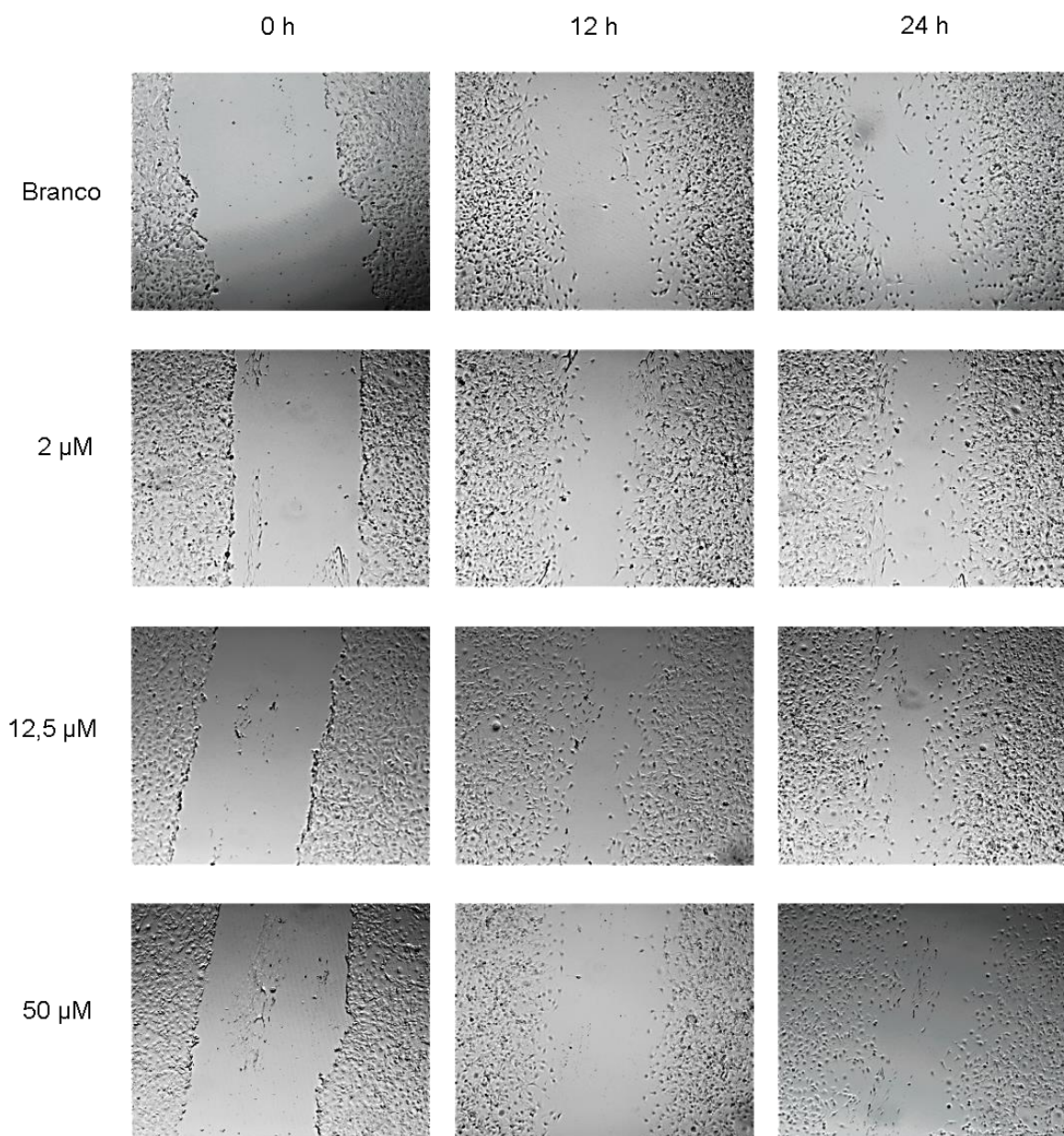
5.7 Avaliação do potencial cicatrizante de TanP utilizando ensaio de migração celular

A migração de fibroblastos pode acelerar o processo de repitalização da ferida e promover o seu fechamento durante a cicatrização (LIU et al., 2014a; YANG; JIN; TANG, 2019). Uma vez que TanP não apresentou toxicidade para as células 3T3 nas concentrações

testadas, foi avaliado se o mesmo atuaria no fechamento de feridas, *in vitro*, pela estimulação da migração de fibroblastos.

Na figura 22, verifica-se o efeito do tratamento com TanP em diferentes concentrações (2 - 50 μM) e do controle, nos tempos 0, 12 e 24 h, com relação a migração dos fibroblastos, utilizando o método de *scratch*.

Figura 22. Imagens representativas da migração de 3T3 tratados com TanP após o ensaio do *Scratch*.

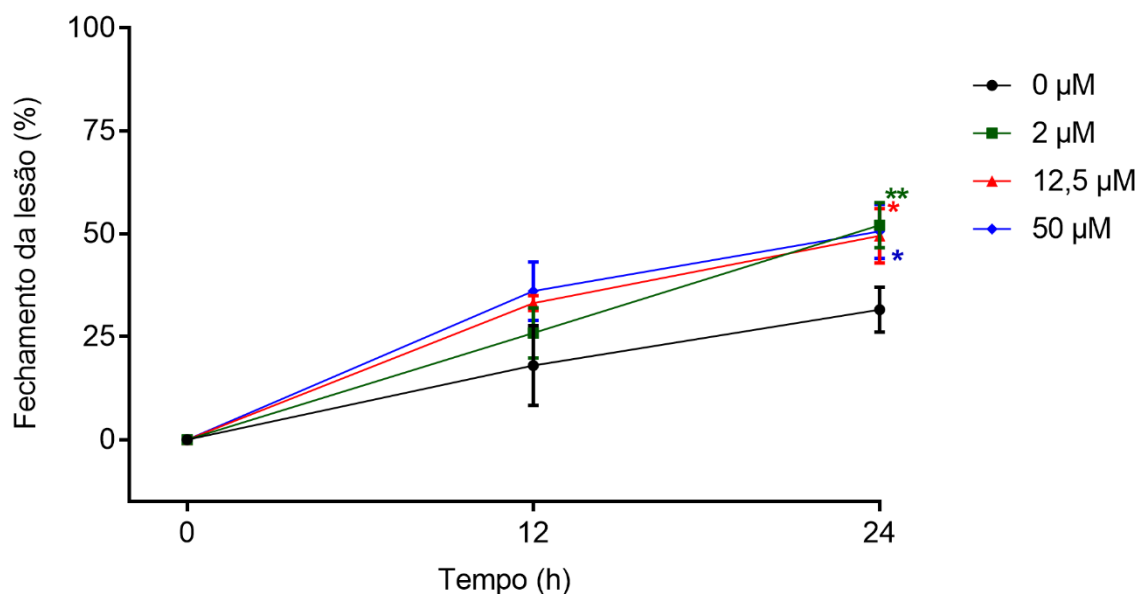


Fonte: Dados obtidos e analisados.

Efeito do tratamento com TanP (2 a 50 μM) e controle (meio DMEM suplementado com 10% de SFB) sob as atividades de migração e proliferação de fibroblastos nos tempos de 0, 12 e 24h.

Quando as mensurações das áreas do *scratch* foram comparadas, um aumento significativo na porcentagem de fechamento das lesões foi observado após 24 h de incubação com o peptídeo, para as concentrações de 2 μM ($p < 0,01$), 12,5 μM ($p < 0,05$) e 50 μM ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 23). Além disso, verifica-se que na presença de TanP houve o fechamento de, aproximadamente, 50% da ferida com 24 h de tratamento, enquanto para o grupo controle esse fechamento foi de apenas 30%. Desse modo sugere-se que TanP pode estar atuando como um fator de crescimento de fibroblastos exógeno, ou pode potencializar a atividade dos fatores de crescimento dos fibroblastos.

Figura 23. Migração celular de células 3T3 tratadas com TanP após ensaio de Scratch



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Confluência de fibroblastos após a realização do *scratch* e tratados com diferentes concentrações de TanP (2 a 50 μM), sendo analisados em 0, 12 e 24 h. As áreas foram medidas com o auxílio do *NIS-Elements AR*. O ensaio foi realizado em triplicata. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (células na ausência do peptídeo TanP).

O processo normal de cicatrização de feridas cutâneas é um processo temporal envolvendo uma série complexa de eventos sobrepostos, incluindo: hemorragia e formação de coágulo de fibrina, resposta inflamatória, reepitelização, formação de tecido de granulação, resposta angiogênica, contração do tecido conjuntivo e remodelação (WRIGHT; RICHARDS; SRAI, 2014). Esses processos dependem de fatores de crescimento e citocinas que executam e regulam uma rede de sinalização complexa que altera o crescimento, a diferenciação e o metabolismo das células-alvo (BARRIENTOS et al., 2014).

Feridas crônicas contêm níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A superprodução de radicais livres, juntamente com o acúmulo de íons de ferro, perpetua a fase inflamatória, resultando em danos graves aos tecidos. Portanto, a introdução de antioxidantes consiste em uma estratégia promissora para promover a cicatrização normal de feridas (ELSCHNER et al., 2019). Além disso, feridas com difícil processo de cicatrização podem ter como possibilidade terapêutica o uso de fatores de crescimento exógenos e citocinas. Estudos *in vitro* demonstraram que o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) regula a síntese e a deposição de vários componentes MEC e promove a migração de fibroblastos, contribuindo para o processo de cicatrização (BARRIENTOS et al., 2014).

Estudo anterior utilizando peptídeos extraídos da pele de *Nibeia japonica* sugere que o processo de proliferação e migração de fibroblastos pode estar relacionado a composição de aminoácidos dos peptídeos, os quais fornecem um ambiente adequado às células (YANG; JIN; TANG, 2019).

O fato do TanP ser um quelante de ferro também pode contribuir diretamente para seu potencial cicatrizante, uma vez que já está descrito na literatura que moléculas quelantes de ferro, como a deferoxamina, possui alto potencial cicatrizante de feridas, inclusive quando se trata de pacientes diabéticos, sugerindo que a depleção de ferro é benéfica na disfunção endotelial na diabetes (DUSCHER et al., 2018).

No processo de inflamação, etapa inicial da cicatrização, mediadores inflamatórios excessivos, como radicais livres, são liberados no local da ferida, estando frequentemente associados a estresse oxidativo e subsequente inflamação prolongada, resultando no retardo do processo de cicatrização da ferida (ZHAO et al., 2019). Desse modo, como o TanP também apresentou resultados significativos no que diz respeito à capacidade quelante, antioxidante e antiinflamatória, este peptídeo apresenta alto potencial para ser aplicado como

protótipo na obtenção de novos agentes cicatrizantes. Este é o primeiro estudo a abordar o papel de peptídeos aniônicos de escorpião no processo de cicatrização de feridas.

6. CONCLUSÕES

- TanP pode ser usado como um biosensor para identificação e quantificação de íons Fe^{2+} ;
- TanP não parece ter sensibilidade para o Zn^{2+} e Ca^{2+} (nas concentrações avaliadas e na faixa espectral considerada);
- Os complexos de TanP com os íons Fe^{2+} e Zn^{2+} formaram conformações sugestivas de geometria octaédrica e tetraédrica, respectivamente;
- TanP não apresentou potencial hemolítico, *in vitro*, nas concentrações testadas, sugerindo que o peptídeo é promissor (não tóxico para hemácias) para ser avaliado *in vivo*, bem como para ser utilizado como um potencial fármaco;
- TanP apresentou atividade antioxidante, *in vitro*, relacionada as três etapas de formação de espécies reativas de oxigênio: iniciação (sequestro do radical DPPH), propagação (quelção de íons ferro) e terminação (sequestro do radical hidroxila);
- TanP apresentou atividade anticoagulante quando avaliado pelos ensaios de TP e TTPA. Entretanto não apresentou atividade fibrinogenolítica nas concentrações testadas;
- TanP estimula a produção de $\text{TNF-}\alpha$, pelos macrófagos, na ausência de estímulo por LPS (2 $\mu\text{g/mL}$). Não houve alteração na liberação de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 quando os macrófagos foram estimulados por LPS (2 $\mu\text{g/mL}$), na presença de TanP;
- TanP apresentou potencial para estimular a migração de células 3T3, e assim acelerar o processo de cicatrização de feridas, *in vitro*, podendo atuar como um fator de crescimento de fibroblastos;
- Este trabalho apresenta resultados preliminares, entretanto promissores, com relação à potencial aplicação biotecnológica e farmacoterapêutica de TanP.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P. D. et al. Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 9278–9286, 2002.

ALMAAYTAH, A. 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, p. 281–293, 2013.

ALMAAYTAH, A. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, p. 397–408, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10989-014-9405-0>>.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>>.

ALMEIDA, D. D. et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 362, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/362>>.

ALMEIDA, D. D. et al. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: CDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 113–118, 2013.

ALMEIDA, R. B. De. Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. v. 1836, 2010.

ALVARENGA, E. R. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. December, p. 210–220, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ojgen.2012.24027>>.

ALVARENGA, É. R. et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. 04, p. 210–220, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=26313&#abstract%5Cnhttp://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ojgen.2012.24027%5Cnhttp://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=26313>>.

AMORIM-CARMO, B. et al. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–21, 2019.

ANDERSEN, O. Chemical and Biological Considerations in the Treatment of Metal Intoxications by Chelating Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 11–21, 2005.

- ANDERSEN, O.; AASETH, J. Molecular mechanisms of in vivo metal chelation: Implications for clinical treatment of metal intoxications. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 5, p. 887–890, 2002.
- ANTONIADES, V. et al. Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment? **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 6, p. 1159–1163, 2013.
- ANTONIETTI, V. et al. Synthesis, iron(III) complexation properties, molecular dynamics simulations and P. aeruginosa siderophore-like activity of two pyoverdine analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 137, p. 338–350, 2017.
- ARASTEH, S.; BAGHERI, M. Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1548, p. 103–118, 2017.
- BAL, W. et al. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 12, p. 5444–5455, 2013.
- BANNWARTH, C. et al. Extended tight-binding quantum chemistry methods. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 11, n. 2, p. 1–49, 2021.
- BARADARAN, M. et al. First Transcriptome Analysis of Iranian Scorpion, Mesobuthus eupeus Venom Gland. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 1488–1502, 2018a.
- BARADARAN, M. et al. First transcriptome analysis of iranian scorpion, mesobuthus eupeus venom gland. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 1488–1502, 2018b.
- BARRIENTOS, S. et al. Clinical Application of Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. **Wound Repair Regen.**, v. 22, n. 1, p. 1–18, 2014.
- BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion Tityus stigmurus: Biochemical and physiological comparison with other Tityus species. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 147–157, 2007.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, p. 3098–3100, 1988.
- BEKHEET, S. H. M. et al. Prevention of hepatic and renal toxicity with bradykinin potentiating factor (BPF) isolated from Egyptian scorpion venom (Buthus occitanus) in gentamicin treated rats. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 2, p. 89–94, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.09.006>>.
- BERTANI, R. et al. Alien scorpions in the Municipality of São Paulo, Brazil - evidence of successful establishment of Tityus stigmurus (Thorell, 1876) and first records of Broteochactas parvulus Pocock, 1897, and Jaguajir rochae (Borelli, 1910). **BioInvasions Records**, v. 7, n. 1, p. 89–94, 2018.

BRAZÓN, J. et al. Effect of Tityus discrepans scorpion venom on global coagulation test. Preliminary studies. **Invest Clin.**, v. 48, n. 1, p. 49–58, 2008.

BRAZÓN, J. et al. Discreplasin, a plasmin inhibitor isolated from Tityus discrepans scorpion venom. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 7, p. 669–678, 2009.

BRAZÓN, J. et al. Tityus discrepans scorpion venom activates platelets through GPVI and a novel Src-dependent signaling pathway. **Platelets**, v. 22, n. 3, p. 165–172, 2011.

BRAZÓN, J. et al. Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Fibrin (ogen)olytic enzymes in scorpion (Tityus discrepans) venom. v. 168, p. 62–69, 2014.

CAETANO-SILVA, M. E. et al. Synthesis of whey peptide-iron complexes: Influence of using different iron precursor compounds. **Food Research International**, v. 101, n. September, p. 73–81, 2017.

CAETANO-SILVA, M. E.; CILLA, A.; BERTOLDO-PACHECO, M. T. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide- iron complexes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, n. October 2016, p. 0–1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.010>>.

CARLTON, D. D.; SCHUG, K. A. A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 686, n. 1–2, p. 19–39, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.050>>.

CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1789–1795, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.016>>.

CESA-LUNA, C. et al. Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–19, 2019.

CHATTERJEE, B. Animal Venoms have Potential to Treat Cancer. **Curr Top Med Chem.**, v. 18, n. 30, p. 2555–2566, 2018.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.

CHOI, Y. A. et al. A novel copper-chelating strategy for fluorescent proteins to image dynamic copper fluctuations on live cell surfaces. **Chemical Science**, v. 6, n. 2, p. 1301–1307, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4SC03027C>>.

CONDE, R. et al. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS Letters**, v. 471, n. 2–3, p. 165–168, 2000.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; PANTIC, J. M. An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog Discoglossus sardus (Alytidae). **Peptides**, v. 40, p. 65–71, 2013.

CORZO, G. et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. **Biochemical Journal**, v. 359, n. 1, p. 35–45, 2001.

CRUZ-HUERTA, E. et al. Short communication: Identification of iron-binding peptides from whey protein hydrolysates using iron (III)-immobilized metal ion affinity chromatography and reversed phase-HPLC-tandem mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 77–82, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9839>>.

CUI, Y. et al. Site-directed mutagenesis of the toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmKAS): Insight into sites related to analgesic activity. **Archives of Pharmacological Research**, v. 33, n. 10, p. 1633–1639, 2010.

D'SUZE, G. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. **Biochimie**, v. 91, p. 1010–1019, 2009.

D'SUZE, G. et al. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1497–1505, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.008>>.

DAI, C. et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3967–3972, 2008.

DAI, L. et al. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 4, p. 820–825, 2001.

DANIELE-SILVA, A. et al. Stigmurin and TsAP-2 from *Tityus stigmurus* scorpion venom: Assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. **Toxicon**, v. 121, p. 10–21, 2016.

DANIELE-SILVA, A. et al. NMR three-dimensional structure of the cationic peptide Stigmurin from *Tityus stigmurus* scorpion venom: In vitro antioxidant and in vivo antibacterial and healing activity. **Peptides**, v. 137, n. October 2020, 2021.

DATASUS. ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - BRASIL. Notificações por Tipo de Acidente segundo Região/UF de notificação Período: 2019. 2020. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>.

DE MELO, E. T. 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: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.003>>.

DE MENEZES, Y. A. S. et al. Protein-rich fraction of *Cnidioscolus urens* (L.) leaves: Enzymatic characterization and procoagulant and fibrinolytic activities. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3552–3569, 2014.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon**, v. 95, p. 52–61, 2015.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–23, 2018.

DESJARDINS-PARK, H. E.; FOSTER, D. S.; LONGAKER, M. T. Fibroblasts and wound healing: an update. **Regenerative medicine**, v. 13, p. 491–495, 2018. Disponível em: <www.futuremedicine.com>.

DI BELLA, L. M. et al. Copper chelation and interleukin-6 proinflammatory cytokine effects on expression of different proteins involved in iron metabolism in HepG2 cell line. **BMC Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12858-017-0076-2>.

DIAS, N. B. et al. Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus*. **Journal of Proteomics**, v. 170, n. September, p. 70–79, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.09.006>.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 273–283, 2005.

DU, Q. 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.

DUDEV, T.; LIM, C. Competition among metal ions for protein binding sites: Determinants of metal ion selectivity in proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 538–556, 2014.

DUEÑAS-CUELLAR, R. A. et al. Scorpion toxins and ion channels: Potential applications in cancer therapy. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2020.

DUSCHER, D. et al. Comparison of the Hydroxylase Inhibitor DMOG and the Iron Chelator Deferoxamine in Diabetic and Aged Wound Healing. **HHS Public Access**, v. 139, n. 3, p. 1–18, 2018.

ECKERT, E. et al. Biophysical and in vitro absorption studies of iron chelating peptide from barley proteins. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 291–301, 2016.

ELSCHNER, T. et al. Chemical Structure – Antioxidant Activity Relationship of Water – Based Enzymatic Polymerized Rutin and Its Wound Healing Potential. p. 1–21, 2019.

FÉLIX-SILVA, J. et al. In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 405, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4210492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2745–2788, 2010.

FOSTER, J. P.; WEINHOLD, F. Natural Hybrid Orbitals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 24, p. 7211–7218, 1980.

FRANCHINI, M. et al. Iron and thrombosis. **Annals of Hematology**, v. 87, n. 3, p. 167–173, 2008.

FREIRE, M. C. L. C. et al. Molecular basis of Tityus stigmurus alpha toxin and potassium channel kV1.2 interactions. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 87, p. 197–203, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2018.11.012>>.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 16, Revision B.01**, 2016. .

FURTADO, A. A.; DANIELE-SILVA, A. Toxicon Biology , venom composition , and scorpionism induced by brazilian scorpion Tityus stigmurus (Thorell , 1876) (Scorpiones : Buthidae): A. **Toxicon**, v. 185, n. April, p. 36–45, 2020a.

FURTADO, A. A.; DANIELE-SILVA, A. Toxicon Biology , venom composition , and scorpionism induced by brazilian scorpion Tityus stigmurus (Thorell , 1876) (Scorpiones : Buthidae): A. v. 185, n. April, p. 36–45, 2020b.

GALVEZ, A. et al. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion Buthus tamulus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11083–11090, 1990.

GAO, B. et al. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion Mesobuthus eupeus. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 350–359, 2010.

GARCIA, F. et al. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 1, p. 3–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2012.87>>.

GRASHOF, D. G. B. et al. Transcriptome annotation and characterization of novel toxins in six scorpion species. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2019.

GRIMME, S. Exploration of Chemical Compound, Conformer, and Reaction Space with Meta-Dynamics Simulations Based on Tight-Binding Quantum Chemical Calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 5, p. 2847–2862, 2019.

GUILHELMELLI, F. et al. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of Candida spp. and Cryptococcus neoformans and Candida albicans biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–14, 2016.

GUO, X. 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, 2013.

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a

target for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 1, p. 32–46, 2009.

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009. Disponível em:

<http://www.researchgate.net/publication/26809239_Anionic_antimicrobial_peptides_from_eukaryotic_organisms>.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115–137, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.006>>.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115–137, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.006>>.

HE, Y. et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 1–14, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.007>>.

HE, Y. et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 1–14, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.007>>.

HORTA, C. C. R. et al. Molecular, Immunological, and Biological Characterization of Tityus serrulatus Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.

JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; STOKOWA-SOŁTYS, K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 997–1009, 2018.

JOLODAR, A. Molecular characterization of a three-disulfide bridges beta-like neurotoxin from androctonus crassicauda scorpion venom. **Archives of Razi Institute**, v. 74, n. 2, p. 135–142, 2019.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

KANG, H. K. et al. Antimicrobial and immunomodulatory properties and applications of marine-derived proteins and peptides. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, 2019.

KAZEMI, S. M.; SABATIER, J. M. Venoms of Iranian scorpions (Arachnida, scorpiones) and their potential for drug discovery. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 1–20, 2019.

KHAMESSI, O. et al. RK, the first scorpion peptide with dual disintegrin activity on $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ integrins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1777–1788, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.180>>.

KHAMESSI, O. et al. RK1, the first very short peptide from Buthus occitanus tunetanus

inhibits tumor cell migration, proliferation and angiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 499, n. 1, p. 1–7, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.133>>.

KHAN, S. et al. Potential Applications of Venom Peptides as Anti-Thrombotic Agents for Management of Arterial and Deep-Vein Thrombosis. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 7, p. 677–687, 2018.

KOZMINSKY-ATIAS, A. et al. Assembling an arsenal, the scorpion way. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, 2008.

KREŽEL, A.; MARET, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 3–19, 2016.

LAI, R. et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 796–799, 2002.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2 ed ed. [s.l: s.n.]

LEE, S. H. Isolation of a Calcium-binding Peptide from Enzymatic Hydrolysates of Porcine Blood Plasma Protein. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 290–294, 2009.

LEITCH, H. A.; GATTERMANN, N. Hematologic improvement with iron chelation therapy in myelodysplastic syndromes: Clinical data, potential mechanisms, and outstanding questions. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 141, n. November 2018, p. 54–72, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.06.002>>.

LI, Z. et al. Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

LI, Z. et al. Peptides with therapeutic potential in the venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, v. 115, n. February, p. 43–50, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.009>>.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MONTEIRO DE AMORIM, A.; KOBLER BRAZIL, T. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones ; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil; Envenomation by *Tityus stigmurus* (Scorpiones ; Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 239–245, 2000.

LIU, H. et al. A potential wound healing-promoting peptide from frog skin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 49, p. 32–41, 2014a.

LIU, H. et al. A potential wound healing-promoting peptide from frog skin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 49, n. 1, p. 32–41, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.010>>.

LIU, X. et al. Zinc-chelating mechanism of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)-derived synthetic peptides. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, p. 1–14, 2019.

- LIU, Y. F. et al. Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 317–327, 2002.
- LV, Y. et al. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4593–4597, 2009.
- MA, Y. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. **BMC genomics**, v. 10, p. 290, 2009.
- MACHADO, R. J. A. et al. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 101, p. 11–18, 2015.
- MACHADO, R. J. A. et al. Characterization of TistH, a multifunctional peptide from the scorpion *Tityus stigmurus*: Structure, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 119, p. 362–370, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.002>>.
- MARTIN, R. L. Natural transition orbitals. **Journal of Chemical Physics**, v. 118, n. 11, p. 4775–4777, 2003.
- MELO-SILVEIRA, R. F. et al. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. November 2011, p. 409–426, 2012.
- MELO-SILVEIRA, R. F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: Corn cobs. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5360–5378, 2014.
- MELO, K. R. T. et al. Evaluation of sulfated polysaccharides from the brown seaweed *dictyopteris justii* as antioxidant agents and as inhibitors of the formation of calcium oxalate crystals. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14543–14563, 2013.
- MELO, M. M. A. et al. Structure and in vitro activities of a Copper II-chelating anionic peptide from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus*. **Peptides**, v. 94, n. May, p. 91–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.05.009>>.
- MOERMAN, L. et al. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 19, p. 4799–4810, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NASCIMENTO, A. K. L. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). **Evidence-based Complementary and**

Alternative Medicine, v. 2013, 2013.

NENCIONI, A. L. A. et al. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2018.

NGET-HONG, T.; GNANAJOTHY, P. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative**, v. 103, n. 2, p. 299–302, 1992.

NIE, Y. et al. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 389–394, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.012>>.

OJEDA, P. G.; WANG, C. K.; CRAIK, D. J. Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy. **Biopolymers**, v. 106, n. 1, p. 25–36, 2016.

OLIVEIRA, U. C. de et al. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 95, p. 52–61, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553591>>.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–135, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>>.

PAPP, F. et al. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 379–389, 2009.

PARENTE, A. M. S. et al. Analogs of the scorpion venom peptide Stigmurin: Structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, 2018.

PERDEW, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, v. 33, n. June, p. 8822–8824, 1986.

PETRICEVICH, V. L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 23–31, 2002.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 10, 2010.

PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 39–49, 2005.

PONTECCHIANI, F. et al. The unusual binding mechanism of Cu(ii) ions to the poly-histidyl domain of a peptide found in the venom of an African viper. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 44, p. 16680–16689, 2014.

POULOS, T. L. Heme enzyme structure and function. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p.

3919–3962, 2014.

PRACHT, P.; BOHLE, F.; GRIMME, S. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 14, p. 7169–7192, 2020.

PRETORIUS, E. et al. Profound morphological changes in the erythrocytes and fibrin networks of patients with hemochromatosis or with hyperferritinemia, and their normalization by iron chelators and other agents. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

PRIMON-BARROS, M.; MACEDO, A. J. **Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents**. [s.l: s.n.]v. 17

PUCCA, M. B. et al. Non-disulfide-bridged peptides from Tityus serrulatus venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. **Peptides**, v. 82, p. 44–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2016.05.008>>.

RAMÍREZ-CARRETO, S. et al. Peptides from the scorpion Vaejovis punctatus with broad antimicrobial activity. **Peptides**, v. 73, p. 51–59, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.08.014>>.

RASHID, M. H. et al. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. **Scientific Reports**, v. 4, p. 8–10, 2014.

REED, A. E.; WEINHOLD, F. Natural bond orbital analysis of near-Hartree-Fock water dimer. **The Journal of Chemical Physics**, v. 78, n. 6, p. 4066–4073, 1983.

REMELLI, M. et al. Zn(II) and Ni(II) complexes with poly-histidyl peptides derived from a snake venom. **Inorganica Chimica Acta**, v. 472, p. 149–156, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.070>>.

REN, Y. et al. Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (Buthus martensii Karsch) protein. **Food Research International**, v. 64, p. 931–938, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.031>>.

RUIMING, Z. et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion Lychas mucronatus reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 452, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/452>>.

SALES, T. A. et al. Recent developments in metal-based drugs and chelating agents for neurodegenerative diseases treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 2019.

SCALMANI, G.; FRISCH, M. J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. **Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 11, 2010.

SCHWAB, A. et al. K⁺ channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 126–132, 1999.

SCORCIAPINO, M. A. et al. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages.

Biochemistry, v. 52, n. 41, p. 7231–7241, 2013.

SEGURA-RAMÍREZ, P. J.; SILVA JÚNIOR, P. I. Loxosceles gaucho spider venom: An untapped source of antimicrobial agents. **Toxins**, v. 10, n. 12, 2018.

SHI, W. et al. Inhibitory effect of an acidic peptide on the activity of an antimicrobial peptide from the scorpion *Mesobuthus martensii* karsch. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 24–28, 2018.

SILVA, F. D. et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34735–34746, 2009.

SILVA, N. A. et al. Effects of tityus stigmurus (thorell 1876) (scorpiones: Buthidae) venom in isolated perfused rat kidneys. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, p. 665–675, 2016.

SINGH, S.; SINGH, R. P. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. **Food Reviews International**, v. 24, n. 4, p. 392–415, 2008.

SMITH, S. W. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings. **Journal of Medical Toxicology**, v. 9, n. 4, p. 355–369, 2013.

SULTAN, S. et al. Chelation therapy in cardiovascular disease: an update. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 843–854, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17512433.2017.1339601>>.

THIEN, T. V. et al. Low-molecular-weight compounds with anticoagulant activity from the scorpion *Heterometrus laoticus* venom. **Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 1, p. 316–319, 2017.

TORRES-LARIOS, A. et al. Hadrurin, A new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 5023–5031, 2000.

TORRES-RÊGO, M. et al. Biodegradable cross-linked chitosan nanoparticles improve anti-*Candida* and anti-biofilm activity of TistH, a peptide identified in the venom gland of the *Tityus stigmurus* scorpion. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. April, p. 109830, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109830>>.

TRAN, T. V. et al. Anticoagulant activity of low-molecular weight compounds from *heterometrus laoticus* scorpion venom. **Toxins**, v. 9, n. 11, 2017.

UDECHUKWU, M. C.; DOWNEY, B.; UDENIGWE, C. C. Influence of structural and surface properties of whey-derived peptides on zinc-chelating capacity, and in vitro gastric stability and bioaccessibility of the zinc-peptide complexes. **Food Chemistry**, v. 240, n. August 2017, p. 1227–1232, 2018.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of Chromatography A**, v. 988, n. 1, p. 1–23, 2003.

UZAIR, B. et al. Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 7, p. 702–708, 2018.

VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *centruroides tecomanus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66486, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066486>>.

VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the venom and venom glands of *Centruroides hirsutipalpus*, a dangerous scorpion from Mexico. **Toxicon**, v. 179, n. January, p. 21–32, 2020.

VASCONCELOS, F. et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85–92, 2005.

VELOSO JÚNIOR, P. H. de H. et al. Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 118, n. June, 2019.

VENANCIO, E. J. et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, v. 69, n. December 2011, p. 180–190, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>>.

WALI, A. et al. Separation and Purification of Antioxidant Peptides from Enzymatically Prepared Scorpion (*Buthus martensii* Karsch) Protein Hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, n. March 2020, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10989-019-09976-3>>.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127–132, 2008.

WANG, Q.; FRANZ, K. J. Stimulus-Responsive Prochelators for Manipulating Cellular Metals. **Acc Chem Res**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

WANG, X.; WANG, G. Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2016.

WARD, R. J.; DEXTER, D. T.; CRICHTON, R. R. Chelating agents for neurodegenerative diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2760–72, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22489724>>.

WEI, L. et al. The first anionic defensin from amphibians. **Amino Acids**, p. 1301–1308, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-015-1963-8>>.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy Electronic supplementary information (ESI) available:[DETAILS]. See [http://dx. doi. org/10.1039/b508541a](http://dx.doi.org/10.1039/b508541a). **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, p. 3297–3305, 2005.

WRIGHT, J. A.; RICHARDS, T.; SRAI, S. K. S. The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 JUL, n. July, p. 1–8, 2014.

WU, W. et al. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 418–427, 2017.

YACOUB, T. et al. Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. **Molecules**, p. 1–19, 2020.

YAN, R. et al. A new natural α -helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 11–19, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.008>>.

YANAI, T.; TEW, D. P.; HANDY, N. C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). **Chemical Physics Letters**, v. 393, n. 1–3, p. 51–57, 2004.

YANG, F.; JIN, S.; TANG, Y. Marine collagen peptides promote cell proliferation of NIH-3T3 fibroblasts via NF- κ B signaling pathway. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 1–11, 2019.

YOUSR, M.; HOWELL, N. Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29161–29178, 2015.

YU, F. et al. Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibea japonica* skin in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 68, 2020.

YU, Y. et al. Iron Chelators for the Treatment of Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2689–2702, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223135440_Iron_Chelators_for_the_Treatment_of_Cancer>.

ZENG, X.-C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB life**, v. 57, n. 1, p. 13–21, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16036557>>.

ZENG, X. C. et al. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, v. 25, p. 143–150, 2004.

ZENG, X. C. et al. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: Gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 44–51, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.012>>.

ZENG, X. C.; LUO, F.; LI, W. X. Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: Identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides. **Peptides**, v. 27, n. 7, p. 1745–1754, 2006.

ZHANG, L. et al. Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by transcriptomic and proteomic analysis. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 231–250, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.030>>.

ZHANG, L.; LIN, Y.; WANG, S. Purification of algal calcium-chelating peptide and its physical chemical properties. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 4, p. 518–530, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2018.1449153>>.

ZHAO, L. et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 46–53, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.013>>.

ZHAO, R. et al. Anticonvulsant activity of BmK AS, a sodium channel site 4-specific modulator. **Epilepsy and Behavior**, v. 20, n. 2, p. 267–276, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.12.006>>.

ZHAO, Y. et al. A novel curcumin-loaded composite dressing facilitates wound healing due to its natural antioxidant effect. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 13, p. 3269–3280, 2019.

ZHAO, Z. et al. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3472–3477, 2009.

ZHDANOVA, G. N.; SHIRSHIN, A. E.; MAKSIMOV, G. E. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin. **The Royal Society of Chemistry**, 2012. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1612.08814>>.

ZHONG, J. et al. Transcriptomic analysis of the venom glands from the scorpion *Hadogenes troglodytes* revealed unique and extremely high diversity of the venom peptides. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 40–62, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.004>>.

ZOCCAL, K. F. et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1101–1108, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.017>>.