



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ALLANNY ALVES FURTADO

**ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DA STIGMURINA**

NATAL/RN

2021

ALLANNY ALVES FURTADO

**ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DA STIGMURINA**

Exame de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de doutora em bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

NATAL/RN

2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Furtado, Allanny Alves.

Análise estrutural e avaliação das atividades biológicas de peptídeos análogos de stigmurina / Allanny Alves Furtado. - Natal, 2021.

120 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

1. Escorpião - Tese. 2. Tityus stigmurus - Tese. 3. Peptídeos Antimicrobianos - Tese. 4. Peptídeos Multifuncionais - Tese. 5. Peptídeos Catiônicos - Tese. I. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III.



Emitido em 29/01/2021

ATA DE DEFESA DE TESE Nº 22/2021 - BIOQ (17.32)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 12/02/2021 16:48)
MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFARM/CCS (15.13)
Matricula: 1544647

(Assinado digitalmente em 12/02/2021 07:48)
SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBG/CB (17.09)
Matricula: 2085604

(Assinado digitalmente em 15/02/2021 13:57)
VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO
CHEFE DE DEPARTAMENTO - TITULAR
DMP/CB (17.13)
Matricula: 2213126

(Assinado digitalmente em 12/02/2021 12:04)
FERNANDA CALHETA VIEIRA PORTARO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 137.889.748-00

(Assinado digitalmente em 12/02/2021 14:11)
RAFAEL MATOS XIMENES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 046.795.254-01

(Assinado digitalmente em 12/02/2021 08:35)
ALLANNY ALVES FURTADO
DISCENTE
Matricula: 20161031895

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número:
22, ano: 2021, tipo: ATA DE DEFESA DE TESE, data de emissão: 12/02/2021 e o código de verificação:
4c0143ec28

AGRADECIMENTOS

*Ao meu Orientador Prof. Dr. **Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa**, pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional ao longo desses dez anos entre a iniciação e o doutorado. Agradeço pelos vários momentos de orientação, palavras de incentivo e desafios a mim impostos, tudo isso foi importante para que chegássemos até aqui.*

*Á minha amiga e parceira de experimentos Dra. **Alessandra Daniele da Silva**, a quem eu tenho a imensa honra e gratidão de ter tido a oportunidade de aprender, trabalhar e crescer... Crescer como profissional e como pessoa, pois, além de pesquisadora extraordinária, é, antes de tudo, um ser humano extraordinário em quem podemos nos inspirar.*

*Á amiga e também parceira Prof^a. Dra. **Elizabeth Cristina Gomes dos Santos**, a quem eu tenho profunda gratidão por tanto tempo a mim dedicado. Mesmo com as inúmeras atividades entre aulas na faculdade e expedientes no “Caps”, sempre encontrava tempo para auxiliar no desenvolvimento e adaptação de metodologias, protocolos, correção de documentos... Além de ser a pessoa que levava uma palavra de carinho e conforto nos momentos de aflição. Afeto, amizade e simplicidade são palavras que me fazem lembrar dela.*

*Ao Prof. Dr. **Rafael Ximenes** por ter aberto as portas de seu laboratório (Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada) para a realização dos ensaios microbiológicos e pelas oportunidades de aprendizado nas discussões dos resultados. Estendo meus agradecimentos aos seus alunos, em especial, o doutorando **Raudiney Mendes**, por tanta dedicação em me ensinar e me acompanhar durante a realização dos experimentos e também a doutoranda **Camila Alves**, que me acolheu com muita alegria e amizade em sua casa, me dando a oportunidade de aproveitar ao máximo o tempo que eu tinha para o desenvolvimento dos experimentos na Universidade Federal do Pernambuco (UFPE).*

*Ao querido e generoso Dr. **Enéas Carvalho** do Instituto Butantan, pela condução da realização dos experimentos de difração circular; á doutoranda **Adriana Parente**, pelo auxílio nos experimentos de análise estrutural, a Prof^a. Dra. **Yamara Menezes** pelo auxílio no ensaio de hemólise; ao Prof. Dr. **Hugo Alexandre O. Rocha** e Dr. **Moacir Queiroz** pelos ensaios de cultura de células; e ao Prof. Dr. **Marcelo Silva** e Dra. **Claudia Moreno**, pelos ensaios de atividade antiparasitária.*

*Á todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica (TecBioFar), pelo carinho a mim dispensado. Em especial, agradeço ao Prof. **Arnóbio da Silva Júnior**, pelos diversos momentos de incentivo na minha caminhada ao longo desses anos que passei no TecBioFar; à **Manoela Torres**, pelos ensinamentos, conselhos e principalmente amizade e irmandade; a Dra. **Fabiana Yamashita**, por quem tenho eterna gratidão, a ela, devo boa parte da minha continuidade na pós-graduação; às amigas e*

companheiras de trabalho, Dra. Karla Samara, Menilla Alves, Fiamma Gláucia, Sarah Ferreira, Diana Pontes, Júlia Passos, Dra. Nathália Araújo e Nayara Sousa, que sempre estiveram presentes no dia-a-dia do laboratório e também nos momentos de fraternidade.

*Á minha família, especialmente a minha irmã **Alynny Furtado**, que acompanhou minha trajetória e partilhou os momentos de alegrias e dificuldades; ao meu pai **Albamar Furtado** (in memorian), por ter sido o PAI mais amável e dedicado que alguém poderia ter e que me deu o exemplo de como me portar diante da vida e com o nosso próximo. Agradeço também a minha mãe **Neci Alves** que sempre acreditou na minha capacidade.*

*Aos **amigos queridos**, pelas partilhas, orações, incentivo e momentos de alegria! A caminhada se torna muito melhor ao lado deles.*

*Aos **funcionários da UFRN**, especialmente a Samara Oliveira, pelos serviços prestados junto à Coordenação da Pós-graduação de Bioquímica. Agradeço também aos **servidores e funcionários da Faculdade de Farmácia**, pela solicitude e atenção a mim destinados, sempre que precisei.*

*À todos os **professores** da graduação que fizeram parte da construção da minha caminhada profissional.*

*Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-**CAPES** (Toxinology/2010), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte-**FAPERN** (PRONEM 2011) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – **FAPDF** (número de concessão 193.0001.202/2016) pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.*

*Á **Mãe Santíssima**, a quem sempre peço intercessão e proteção. Agradeço também por sempre me dar a serenidade quando preciso.*

*E por último e mais importante, agradeço a **Deus**, o meu maior e melhor amigo! Agradeço por ser o arrimo da minha vida e por me dar força e coragem para enfrentar as adversidades. Agradeço por todas as bênçãos e vitórias, sem Ele, jamais conseguiria coisa alguma...*

*“Se quiser ir rápido, vá sozinho.
Se quiser ir longe, vá acompanhado. ”*

(Provérbio africano)

ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DA STIGMURINA

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos e aos antineoplásicos é considerada um problema de saúde pública mundial sendo necessária a busca por novas moléculas que sejam mais eficazes ou que suplementem as terapias já existentes. Neste contexto, a Stigmurina, um peptídeo nativo da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*, apresentou atividade antibacteriana sobre bactérias gram-positivas, com efeito antiproliferativo em diferentes células cancerígenas, baixa toxicidade em eritrócitos humanos e atividade tripanocida sobre *Trypanosoma cruzi*. Com o intuito de ampliar o potencial do peptídeo nativo, peptídeos análogos a Stigmurina, foram planejados e analisados quanto a estrutura e diferentes atividades biológicas. A análise estrutural dos peptídeos análogos, denominados de StigA8 e StigA18, foi obtida por predição estrutural, modelagem molecular e dicróismo circular (DC), sendo a biocompatibilidade *in vitro* avaliada em hemácias humanas, fibroblastos murinos e *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*. A atividade antibacteriana contra cepas gram-positivas e gram-negativas foi realizada por microdiluição em caldo e a ação antibiofilme em placa de cultura de células e por Microscopia Eletrônica de Varredura, bem como, o efeito antibacteriano *in vivo* sobre as larvas de *G. mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus*. A ação antiparasitária dos peptídeos análogos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foi avaliada por contagem das células viáveis e o efeito antiproliferativo em linhagens de células cancerígenas foi avaliado pelo método de redução do sal brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Experimentos *in silico* mostraram que StigA8 e StigA18 apresentaram maiores índices de cationicidade (+4 e +5, respectivamente) e momento hidrofóbico (0,652 e 0,708, respectivamente) em relação à molécula protótipo (+2 e 0,571, respectivamente), enquanto que experimentos de DC revelaram uma conformação majoritariamente em α -hélice em ambientes que mimetizam membranas biológicas. Além disso, revelaram atividade hemolítica de 11,5-22% em uma faixa de concentração de 9,37-150 μ M, com índice de citotoxicidade de 50% nos fibroblastos em 20 μ M e 12,3 μ M para StigA8 e StigA18, respectivamente. Adicionalmente, não foram observados sinais de toxicidade sobre as larvas na dose de 120 mg/kg. Ambos os peptídeos análogos apresentaram uma expressiva atividade antibacteriana em bactérias gram-positivas e gram-negativas em concentrações que variaram de 0,93-9,37 μ M, com ação antibiofilme contra *S. aureus* em concentrações de 7,5-12,5 μ M, causando danos como destruição de matriz, invaginações na membrana celular, rugosidades e redução do diâmetro celular em 12,5 μ M. StigA8 e StigA18 revelaram efeito antibacteriano *in vivo*, aumentando a sobrevivência das larvas na dose de 120 mg/kg em 75% e 60%, respectivamente, no pico da infecção. Atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foi observada em 6,25 μ M para ambos os peptídeos e potencial antiproliferativo a partir da concentração de 2 μ M para StigA8 e 4 μ M para StigA18. Diante disso, StigA8 e StigA18 constituem moléculas com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos e anticâncer.

Palavras-chave: *Tityus stigmurus*, Escorpião, Peptídeos Antimicrobianos, Peptídeos Multifuncionais, Peptídeos Catiônicos.

STRUCTURAL ANALYSIS AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF STIGMURINA ANALOGS PEPTIDES

ABSTRACT

Resistance to antimicrobials and antineoplastic agents is considered a worldwide public health problem and the search for new molecules that are more effective or that supplement existing therapies is necessary. In this context, Stigmurin, a peptide native to the venom of the yellow scorpion *Tityus stigmurus*, showed antibacterial activity on gram-positive bacteria, with antiproliferative effect on different cancer cells, low toxicity in human erythrocytes, and trypanocidal activity on *Trypanosoma cruzi*. In order to expand the potential of the native peptide, analogs to Stigmurin were designed and analyzed for structure and different biological activities. The structural analysis of the analog peptides, named StigA8 and StigA18, was obtained by structural prediction, molecular modeling, and circular dichroism. *In vitro* biocompatibility was evaluated in human red blood cells, murine fibroblasts, and *in vivo* on *Galleria mellonella* larvae. The antibacterial activity against gram-positive and gram-negative strains was performed by microdilution in broth, the antibiofilm activity in cell culture plate and analyzed by scanning electron microscopy, as well as the antibacterial effect *in vivo* on *G. mellonella* larvae infected with *Staphylococcus aureus*. The antiparasitic action of analog peptides on the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* was evaluated by counting viable cells and the antiproliferative effect in cancer cell lines was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT) salt reduction method. StigA8 and StigA18 showed higher rates of cationicity (+4 and +5, respectively) and hydrophobic moment (0.652 and 0.708, respectively) in relation to the lead molecule (+2 and 0.571, respectively) and a conformation mostly in α -helix in environments that mimic biological membranes. In addition, the peptides showed hemolytic activity of 11.5-22% in a concentration range of 9.37-150 μ M, with a cytotoxicity index of 50% in murine fibroblasts at a concentration of 20 μ M and 12.3 μ M for StigA8 and StigA18, respectively. In addition, no signs of toxicity were observed on *G. mellonella* larvae at a dose of 120 mg/kg. Both analog peptides showed significant antibacterial activity in strains of gram-positive and gram-negative bacteria in concentrations ranging from 0.93-9.37 μ M, with antibiofilm action against *S. aureus* in concentrations of 7.5-12.5 μ M, causing damage such as matrix destruction, cell membrane invaginations, roughness, and reduction of the cell diameter by 12.5 μ M. StigA8 and StigA18 showed antibacterial effect *in vivo*, increasing larval survival at 120 mg/kg by 75% and 60%, respectively, at the peak of infection. Trypanocidal activity on the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* was observed at 6.25 μ M for both peptides and antiproliferative potential from the concentration of 2 μ M for StigA8 and 4 μ M for StigA18. Therefore, StigA8 and StigA18 are molecules with the potential for the development of new antimicrobial and anticancer drugs.

Keywords: *Tityus stigmurus*, Scorpion, Antimicrobial Peptides, Multifunctional Peptides, Cationic Peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação de peptídeos antimicrobianos quanto a estrutura secundária.	21
Figura 2 - Principais modelos de mecanismos de ação em membranas celulares propostos para peptídeos antimicrobianos α -helicoidais.	23
Figura 3 - Morfologia do escorpião <i>Tityus stigmurus</i> (Thorell, 1876) (Scopiones: Buthidae).	28
Figura 4 - Estrutura tridimensional de Stigmurina.	33
Figura 5 - Estrutura tridimensional teórica dos peptídeos análogos StigA8 e StigA18.	54
Figura 6 - Estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliadas por difração circular. ...	56
Figura 7 - Influência da variação de pH sobre as estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliadas por difração circular.	58
Figura 8 - Influência da variação de temperatura sobre as estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliada por difração circular.	60
Figura 9 – Biocompatibilidade de StigA8 e StigA18.	64
Figura 10 – Topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 sobre o biofilme formado por <i>S. aureus</i>	79
Figura 11 – Análise da ultraestrutura do biofilme formado pela bactéria <i>S. aureus</i> e tratados com StigA8 e StigA18 por MEV.	81
Figura 12 – Atividade antibacteriana <i>in vivo</i> de StigA8 e StigA18.	85
Figura 13 – Atividade tripanocida de StigA8 e StigA18 para as formas epimastigotas e tripomastigotas.	87
Figura 14 – Atividade antiproliferativa de StigA8 e StigA18.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de moléculas presentes no veneno do escorpião <i>T. stigmurus</i>	32
Tabela 2 - Lista de peptídeos caracterizados quanto a estrutura e ação biológica a partir do transcriptoma do veneno do escorpião <i>T. stigmurus</i>	32
Tabela 3 - Esquema de tratamento das larvas <i>G. mellonella</i> para avaliação da toxicidade de StigA8 e StigA18.....	42
Tabela 4 - Descrição de obtenção e parâmetros biológicos de cepas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	43
Tabela 5 - Esquema de tratamento das larvas <i>Galleria mellonella</i> para avaliação da atividade antibacteriana de StigA8 e StigA18.....	49
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas e estruturais de Stigmurina, StigA8 e StigA18.	52
Tabela 7 - Validação dos modelos de estrutura secundária de StigA8 e StigA18.....	53
Tabela 8 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes meios. .	57
Tabela 9 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes pH.	59
Tabela 10 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes temperaturas.....	61
Tabela 11 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em comprimento de onda fixo.	61
Tabela 12- Determinação da CIM e CBM dos peptídeos Stigmurina, StigA8 e StigA18 frente a cepas gram-positivas e gram-negativas de referência.....	67
Tabela 13- Determinação da CIM e CBM dos peptídeos Stigmurina, StigA8 e StigA18 em cepas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	71
Tabela 14- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação precoce e tardia de biofilme de <i>S. aureus</i>	75
Tabela 15- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação precoce de biofilme de cepas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	77
Tabela 16- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação tardia de biofilme de cepas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	78
Tabela 17 – Área de cobertura do biofilme após tratamento com os peptídeos StigA8 e StigA18.	80
Tabela 18 – Média do diâmetro celular de <i>S. aureus</i> após tratamento com os peptídeos análogos da Stigmurina, StigA8 e StigA18.	82
Tabela 19 – Determinação da porcentagem de inibição de crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Concentração de álcool etílico e tempo de incubação utilizados na etapa de lavagem do biofilme.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
B16-F10	Linhagem celular de melanoma murino
CBM	Concentração bactericida mínima
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDO	Cetodesoxioctonato
CH ₅₀	Concentração hemolítica capaz de lisar 50% de hemácias
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLP	Sepse por ligadura e perfuração cecal
cm	centímetros
DC	Dicroísmo circular
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FACS	Citometria de fluxo ativado por fluorescência
Fc	Fração cristalizada
h	horas
HEK	Linhagem celular embrionária de rim humano
HeLA	Linhagem celular de adenocarcinoma cervical
HEPG ₂	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
IC ₅₀	Índice de citotoxicidade de 50%
IS	Índice de seletividade
IT	Índice de toxicidade

KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
kg	quilograma
LIT	Triptose de infusão de fígado
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MCF-7	Células cancerígenas de Mama
M.M	Massa molecular
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligramas
Mg ²⁺	Cátion bivalente de magnésio
MH	<i>Muller Hinton</i>
min	minutos
mM	Milimolar
mL	mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio
Na ₂ B ₄ O ₇	Borato de sódio
NIH/3T3	Linhagem celular de fibroblastos murinos
nm	nanômetros
Panc 10.05	Linhagem celular de adenocarcinoma de pâncreas
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico

PPD	Peptídeo com ligação dissulfeto
PSPD	Peptídeo sem ligação dissulfeto
PVL	Leucocidina Panton-Valentin
Raw	Linhagem celular de macrófagos murino
RAM	Resistência aos antimicrobianos
RNA	Ácido ribonucléico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SARM	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SiHa	Linhagem celular de adenocarcinoma cervical
SINAN	Sistema de Informação de Doenças por Notificação
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
TSA	Ágar triptona soja
UFC	Unidade formadora de colônias
V	volt
v/v	volume por volume
Z	Carga Superficial Líquida
786-0	Linhagem celular de adenocarcinoma renal
α	alfa
β	beta
μL	microlitros
μM	micromolar
γ	gama

°C Grau celsius

% porcento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Resistência medicamentosa no tratamento de infecções bacterianas, parasitárias e no Câncer.....	18
1.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	20
1.2.1 Características estruturais, físico-químicas e mecanismo de ação de PAMs.....	20
1.2.2 PAMs com Atividade Antimicrobiana e Antiproliferativa.....	24
1.3 Escorpião <i>Tityus stigmurus</i> como fonte de biomoléculas.....	26
1.3.1 Composição da peçonha do <i>T. stigmurus</i>	28
1.3.2 Peptídeos análogos do <i>T. stigmurus</i>	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo Geral.....	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Predição dos Parâmetros Físico-Químicos e Estruturais dos Peptídeos Análogos.....	38
3.2 Modelagem Molecular.....	38
3.3 Obtenção dos Peptídeos Análogos.....	38
3.4 Dicroísmo Circular.....	39
3.4.1 Influência do Meio na Estrutura Secundária.....	39
3.4.2 Influência do pH na Estrutura Secundária.....	39
3.4.3 Influência da Temperatura na Estrutura Secundária.....	40
3.5 Biocompatibilidade.....	40
3.5.1 Atividade Hemolítica.....	40
3.5.2 Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	41
3.5.3 Toxicidade <i>in vivo</i>	42
3.6 Atividade Antibacteriana.....	42
3.6.1 Microrganismos.....	42
3.6.2 Obtenção do Inóculo.....	44
3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima.....	44
3.6.4 Atividade Antibiofilme.....	45
3.6.4.1 Formação de Biofilme.....	45
3.6.4.2 Determinação da Atividade Antibiofilme.....	46
3.6.5 Avaliação Topográfica da Atividade Antibiofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47

3.6.6 Atividade Antibacteriana <i>in vivo</i>	48
3.7 Atividade Antiparasitária contra <i>Trypanossoma cruzi</i>	49
3.7.1 Cultivo do Parasita	49
3.7.2 Atividade Tripanocida.....	50
3.8 Atividade Antiproliferativa.....	50
3.9 Análises Estatísticas.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Características Físico-Químicas de StigA8 e StigA18	52
4.2 Modelagem Molecular de StigA8 e StigA18.....	53
4.3 Conformação Estrutural e Estabilidade de StigA8 e StigA18	55
4.3.1 Influência do Meio sobre StigA8 e StigA18	55
4.3.2 Influência do pH sobre StigA8 e StigA18.....	57
4.3.3 Influência da Temperatura sobre StigA8 e StigA18	59
4.4 Biocompatibilidade de StigA8 e StigA18.....	62
4.5 Atividade Antibacteriana de StigA8 e StigA18	67
4.5.1 Espectro de Ação de StigA8 e StigA18	67
4.5.2 Ação de StigA8 e StigA18 em Cepas Multirresistentes de <i>S. aureus</i>	70
4.5.3 Atividade Antibiofilme de StigA8 e StigA18	74
4.5.4 Topografia da Atividade Antibiofilme de StigA8 e StigA18.....	79
4.5.5 Atividade Antibacteriana <i>in vivo</i> de StigA8 e StigA18.....	84
4.6 Atividade Tripanocida de StigA8 e StigA18	87
4.7 Atividade Antiproliferativa de StigA8 e StigA18.....	90
5 CONCLUSÕES	94
6 PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXOS	114
APÊNDICES.....	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência medicamentosa no tratamento de infecções bacterianas, parasitárias e no câncer

O uso indiscriminado dos medicamentos antimicrobianos ao longo dos anos, levou a seleção de microrganismos resistentes, desencadeando infecções de difícil tratamento no âmbito hospitalar e na comunidade. Além disso, a produção de novos antibióticos não acompanha a evolução do desenvolvimento da resistência aos fármacos usuais, tornando a resistência microbiana um problema de saúde pública mundial (BARRIERE, 2015; BOUCHER et al., 2013; FERRI et al., 2017). Um grupo específico de bactérias do âmbito hospitalar, desenvolveram resistência a múltiplos medicamentos, até mesmo aos de última escolha. São conhecidas como bactérias ESKAPE, nome que representa as iniciais das espécies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp (MULANI et al., 2019). Essas bactérias estão entre as que causam maior impacto clínico e econômico, pois estão associadas com altas taxas de mortalidade e aumento dos custos com tratamento em hospitais públicos e privados (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017).

A resistência bacteriana aos diferentes antibióticos pode ser constitutiva, ou seja, presente no microrganismo sem a exposição ao antimicrobiano, ou induzível, quando ocorre pela exposição ao agente antimicrobiano (YEAMAN; YOUNT, 2003). Algumas cepas de bactérias gram-negativas como do gênero *Serratia*, *Proteus* e *Providencia*, apresentaram de forma constitutiva, resistência ao peptídeo catiônico polimixina B, medicamento que assim como a colistina, são peptídeos sintéticos utilizados na prática clínica como última escolha para o tratamento de infecções multirresistentes causadas por bactérias gram-negativas (CAI; LEE; KWA, 2015), enquanto que cepas de *P. aeruginosa* ao entrar em contato com esse medicamento, induziram a ativação de enzimas que modificaram a composição do lipídeo A dos lipopolissacarídeos (LPS) de membrana, impedindo a interação eficaz do antibiótico com as superfícies bacterianas (MOSKOWITZ; ERNST; MILLER, 2004; VILJANEN; VAARA, 1984). Foi observado também, a indução da transcrição de genes que codificam proteases capazes de degradar o antibiótico lactoferrina B em cepas de *E. coli* e *S. aureus* (ULVATNE, 2002); modificação da membrana e de parede celular em bactérias gram-positivas como *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*, pela adição de resíduos de D-alanina aos ácidos teicoicos, reduzindo a carga superficial aniônica do

microrganismo e conseqüentemente, a sensibilidade aos antibióticos (ABACHIN et al., 2002; MCBRIDE; SONENSHEIN, 2011; POYART et al., 2003); além do desenvolvimento de sistemas de bomba de efluxo (YEAMAN; YOUNT, 2003) e produção de cápsulas polissacarídicas protetoras para evitar o contato do antibiótico com a superfície do microrganismo (CAMPOS et al., 2004).

Além das infecções bacterianas, as doenças tropicais negligenciadas causadas por infecções parasitárias, também são consideradas um problema de saúde pública global. Dentre elas, pode se destacar a doença de Chagas, que atinge diversos países da América do Sul, América Central e parte da América do Norte. Essa doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, quando ocorre o repasto sanguíneo pelo vetor triatomíneo no hospedeiro, infectando seres humanos e outros mamíferos (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012), podendo desencadear comorbidades no paciente, tanto na fase aguda (aumento de órgãos como fígado e baço) como na fase crônica da doença (processos inflamatórios recorrentes e cardiomiopatias). Atualmente, e há mais de 50 anos no Brasil, o tratamento de escolha para a doença de Chagas é o benznidazol. Contudo, o perfil de segurança desse medicamento é controverso, apresentando efeitos adversos importantes nos pacientes, como a perda de peso excessiva, erupções cutâneas, astenia e dores de cabeça. Ademais, apresenta algumas limitações no que diz respeito a baixa solubilidade em meio aquoso e dificuldade de atravessar as barreiras biológicas, limitando o sucesso da terapia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Outra doença que está intimamente relacionada a resistência medicamentosa é o câncer, sendo uma das principais causas de morte no mundo, com projeções de aumento de mortalidade, à medida que a população envelhece ou é submetida a diferentes fatores de risco como estresse, tabagismo, sedentarismo e obesidade (TORRE et al., 2016). No tratamento anticâncer, as principais terapias aplicadas são a remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e quimioterapia citotóxica, sendo nas últimas décadas empregados também, tratamentos alternativos, como a hormonioterapia (utilizando moduladores dos hormônios relacionados a proliferação e diferenciação celular) e a imunoterapia (utilizando anticorpos monoclonais) (GRANIER et al., 2016; NICOLINI et al., 2020; TAN; WOLFF, 2007).

No entanto, o desenvolvimento da resistência aos diferentes tratamentos surge principalmente por aqueles pacientes que fazem uso por tempo prolongado. O principal mecanismo de resistência aos medicamentos anticâncer é a superexpressão dos transportadores ABC (bombas de efluxo), apresentando também outros mecanismos, como a capacidade de reduzir a absorção dos medicamentos pelo receptor de influxo, ativação de sistemas enzimáticos

para aumentar a metabolização (glutathiona-S-transferase e famílias do CYP-450), bloqueio das vias apoptóticas e regulação epigenética, além de mutações nos diferentes alvos dos medicamentos, podendo esses mecanismos ocorrerem de forma isolada ou em conjunto, desencadeando uma múltipla resistência aos medicamentos (ASSARAF et al., 2019; LI et al., 2017).

Nesse sentido, a busca por moléculas com propriedades antimicrobianas e antiproliferativas que sejam mais eficazes ou que suplementem as terapias já existentes, se faz cada vez mais necessária.

1.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

1.2.1 Características estruturais, físico-químicas e mecanismo de ação de PAMs

Dentre as moléculas que podem exercer diferentes atividades biológicas, é possível destacar os peptídeos antimicrobianos (PAMs), moléculas pequenas (aproximadamente até 100 aminoácidos), produzidas como primeira linha de defesa nos diferentes seres vivos, como microrganismos, aracnídeos, plantas, anfíbios, aves, peixes e mamíferos, sendo fontes promissoras na busca por essas biomoléculas (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020; WANG; WANG, 2016; ZHANG; GALLO, 2016).

Os PAMs podem ser classificados de acordo com a sua estrutura secundária em: α -hélice, β -folha, estrutura mista (α -hélice e β -folha) e estrutura randômica, ilustradas na Figura 1 (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; KOEHBACH; CRAIK, 2019), sendo os peptídeos em α -hélice um dos mais caracterizados (HARRISON et al., 2014; MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2012; SANI; SEPAROVIC, 2016).

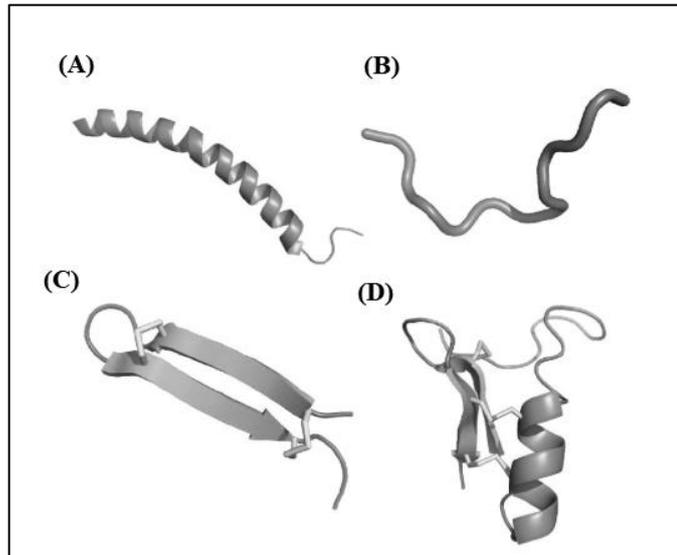


Figura 1 – Classificação de peptídeos antimicrobianos quanto a estrutura secundária. Estrutura em α -hélice de LL-37 (A); randômica de Indolicidina (B); β -folha de Gomesina; e mista de Formicidina (D). Fonte: adaptado de Koehbach; Craik, (2019).

Nos peptídeos α -helicoidais, a presença de aminoácidos de caráter polar e apolar distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica nos PAMs, são enovelados em torno de um eixo imaginário a formar uma hélice estabilizada por interações de hidrogênio intramoleculares, apresentando as cadeias laterais voltadas para o exterior da hélice, permitindo a interação com diferentes membranas celulares para exercer suas atividades biológicas (DATHE; WIEPRECHT, 1999; HUANG et al., 2012, 2014). Nos peptídeos estruturados em β -folha, a cadeia de aminoácidos forma uma fita distendida em que as cadeias laterais se organizam de maneira a estarem de forma alternada, acima e abaixo do plano da fita. Quando ocorre a interação entre uma fita e outra adjacente no mesmo sentido, formam-se as β -folha paralelas, quando a interação entre as fitas ocorre no sentido contrário, formam-se as β -folha antiparalelas, ambas estabilizadas por interações de hidrogênio (D’SOUZA et al., 2017; LAXIO ARENAS; KAFFY; ONGERI, 2019).

A capacidade de interação dos PAMs com diversos tipos de membranas celulares, decorre de certas características físico-químicas e estruturais intrínsecas à molécula, massa molecular reduzida, carga superficial positiva (favorecendo as interações eletrostáticas com componentes aniônicos de membranas) e anfipaticidade (favorecendo as interações entre essas moléculas e os fosfolipídeos de membrana), ocasionando danos ou a morte celular, especialmente em microrganismos (EPAND; EPAND, 2009; ORTIZ et al., 2015; WANG; WANG, 2016). Além disso, estudos demonstram que o aumento da conformação em α -hélice,

do momento hidrofóbico e da cationicidade dessas moléculas, propiciam a ampliação da atividade antimicrobiana (LUNA-RAMÍREZ et al., 2014; SANI; SEPAROVIC, 2016).

Ao interagirem com a membrana celular, os PAMs helicoidais podem se agrupar de forma organizada para poder exercer seu mecanismo de ação de ruptura e esta interação depende da composição de aminoácidos, da concentração da molécula no ambiente e da interação do peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana. Assim, essas moléculas tendem a exercer uma maior ação antimicrobiana quando associadas, do que individualmente (LEE; HALL; AGUILAR, 2016; SANI; SEPAROVIC, 2016).

O principal mecanismo de atuação dos PAMs α -helicoidais sobre as superfícies celulares se dá pela formação de poros na membrana, os quais podem ser organizados de acordo com os modelos a seguir (Figura 2): **barril**, o qual as unidades dos peptídeos se adsorvem no envoltório celular e quando em uma concentração ideal, oligomerizam-se, formando um poro na membrana com a porção hidrofóbica voltada para a bicamada lipídica e a porção hidrofílica voltada para o lúmen do poro; no **poro toroidal** as unidades dos peptídeos se inserem na membrana, ocasionando a torção das monocamadas fosfolipídicas de modo que as porções hidrofílicas dos fosfolipídeos fiquem voltadas para o lúmen do poro e intercaladas pelos monômeros de peptídeos. Esse modelo possui menor estabilidade quando comparado com o poro em barril, e ao se desintegrarem, podem permitir a passagem de monômeros de peptídeos para o interior celular, promovendo a interação dessas moléculas com alvos intracelulares, podendo desencadear inibição de atividade enzimática, de síntese proteica ou de ácidos nucleicos; no modelo em **carpete**, unidades peptídicas se adsorvem na membrana celular de maneira inespecífica e quando em uma concentração ótima, exercem uma ação “detergente”, induzindo a formação de micelas compostas pelos fosfolipídeos de membrana e peptídeos, provocando rupturas que causam lise celular. A interação inicial que ocorre nesse modelo também é considerada como uma das etapas para a formação do poro toroidal (LEE; N. HALL; AGUILAR, 2016; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; YEAMAN; YOUNT, 2003).

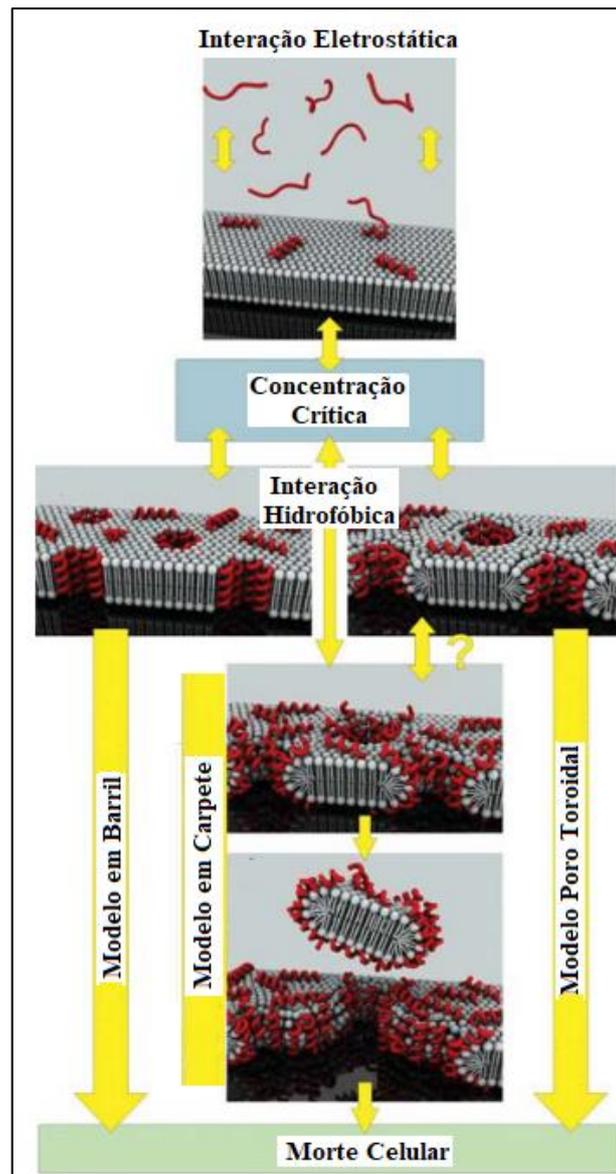


Figura 2 - Principais modelos de mecanismos de ação em membranas celulares propostos para peptídeos antimicrobianos α -helicoidais. Fonte: adaptado de Lee e colaboradores (2016).

As características físico-químicas e estruturais dos PAMs, bem como, a diferente composição da membrana de células procarióticas e eucarióticas modulam a toxicidade destes componentes bioativos.

Nas bactérias, devido à presença de componentes carregados negativamente como o ácido lipoteicoico associados à parede de peptidoglicanos (bactérias gram-positivas) e os lipopolissacarídeos (LPS) associados à membrana externa (bactérias gram-negativas), ocorre uma interação eletrostática inicial dos PAMs catiônicos, promovendo a adsorção dessas moléculas e uma perturbação na camada superficial do microrganismo. Posteriormente, ocorrem interações do peptídeo anfipático nas camadas mais profundas da membrana da bactéria, seja por interações eletrostáticas devido à presença de componentes aniônicos na

membrana, como fosfatidilglicerol e cardiolipina, seja por interações hidrofóbicas devido a bicamada fosfolipídica presentes nesses seres unicelulares. Por fim, a forma helicoidal propicia a molécula otimizar a exposição das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas para as interações químicas com as membranas das bactérias, levando a distúrbios eletrolíticos e lise celular (EPAND; EPAND, 2009; HARRISON et al., 2016; SCHMIDT; YONGHONG; HOFFMANN, 2018; SWOBODA et al., 2010).

Nas superfícies das membranas de células eucarióticas, diferentemente das células bacterianas, são encontradas moléculas de caráter neutro como a fosfatidilcolina e esteróis como o colesterol, enquanto que as moléculas de caráter aniônico, como o ácido fosfático, estão mais concentradas na face interna da membrana, limitando a capacidade de interação dos PAMs sobre essas células (EPAND; EPAND, 2009; MURA et al., 2016; ODDO; HANSEN, 2017). Contudo, células que apresentam anormalidade de multiplicação, como as células cancerígenas, apresentam a estrutura da membrana celular modificada, expressando componentes de caráter aniônico como a fosfatidilserina, ácido siálico, heparan sulfato e mucinas *O*-glicosiladas, bem como possuem características fisiológicas peculiares com a presença de microvilosidades e a capacidade de projeção celular formando pseudópodes, que acarreta numa maior superfície de contato para os PAMs interagirem, e conseqüentemente, maior ação citotóxica sobre as células neoplásicas (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013; ZHANG; YANG; ERICSSON, 2019).

Além da atuação em membrana, os PAMs podem exercer atividade sem promover lise celular, atravessando a membrana e interagindo com componentes intracelulares como proteínas e ácidos nucleicos, interferindo nos diversos processos celulares (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Sendo assim, peptídeos antimicrobianos se apresentam como moléculas promissoras no tratamento de infecções microbianas, bem como, no tratamento de doenças neoplásicas.

1.2.2 PAMs com Atividade Antimicrobiana e Antiproliferativa

Devido ao fato dos PAMs serem encontrados em diversos organismos vivos, como plantas, bactérias, mamíferos anfíbios, aracnídeos, dentre outros, esses são considerados fontes promissoras para obtenção dessas moléculas (KOEHBACH; CRAIK, 2019). Muitos desses PAMs foram identificados e avaliados quanto às suas atividades biológicas, como será visto a seguir.

Como exemplos de PAMs catiônicos com atividade antibacteriana, pode-se destacar o peptídeo Magainin 2, identificado no epitélio do sapo *Xenopus laevis*, que apresentou efeito sinérgico com antibióticos utilizados na terapêutica, potencializando a atividade desses fármacos (DARVEAU et al., 1991); o LL-37, encontrado nos grânulos de neutrófilos humanos, que mostrou atividade contra as bactérias *Bacillus megaterium* e *E. coli* (JOHANSSON et al., 1998); o peptídeo Bactenecina, encontrado em grânulos de neutrófilos de tecidos de bovinos, apresentou atividade bactericida contra *E. coli* e *S. aureus* (ROMEIO et al., 1988); o DmAMP1, defensina identificada na planta da espécie *Dahlia merckii* que apresentou atividade contra diferentes cepas de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (THEVISSSEN et al., 2000); o TsAP-2 do escorpião *Tityus serrulatus* que mostrou ação antimicrobiana contra bactérias da espécie *S. aureus* e leveduras da espécie *Candida albicans* (GUO et al., 2013), entre outros.

Além disso, foram identificados peptídeos que atuaram em alvos intracelulares para exercer sua atividade antibacteriana, como o peptídeo Buforin-II do sapo *Bufo bufo garagriozensis*, que foi capaz de atravessar a membrana de *E. coli* e interagir com as moléculas de DNA dessa bactéria (PARK; KIM; KIM, 1998) e seus análogos sintéticos, BF2-A e BF2-C, que aumentaram essa capacidade de interação com consequente aumento da atividade bactericida sem causar lise de membrana (HAO et al., 2013). Para o PAM Pyrrhocoricin do inseto *Pyrrhocoris apterus*, foi observado a capacidade de se ligar a chaperona DnaK e inibir sua ação ATPase e de realização do dobramento correto de proteínas assistidas por essa chaperona em cepas de *E. coli* (KRAGOL et al., 2001). Recentemente, foi observado por microscopia de depleção de emissão estimulada (STED) que o peptídeo LL-37 é internalizado por macrófagos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis*, estando localizado nos endossomas e lisossomas dessas células, e posteriormente lisando a parede intra e extracelular do microrganismo (DESHPANDE et al., 2020).

Apesar dos peptídeos antimicrobianos serem vastamente estudados em relação a atividade antibacteriana, também podem exercer atividade sobre outros microrganismos. PAMs obtidos de uma fração purificada (SaFr1) da secreção de anfíbio da espécie *Siphonops annulatus* apresentaram atividade sobre as formas evolutivas promastigotas de *Leishmania infantum* e tripomastigotas de *T. cruzi* (PINTO et al., 2014); o VmCT1 do escorpião *Vaejovis mexicanus*, apresentou atividade sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (formas intracelulares) de *T. cruzi* (PEDRON et al., 2020).

No estudo realizado por McGwiree e colaboradores (2003), peptídeos sintéticos (Novispirin, Ovispirin, SMAP-29 e Protegrin-1) baseados na classe das catelicidinas derivados de PAMs de mamíferos, apresentaram atividade leishmanicida *in vitro* sobre cepas das formas

procíclicas (inseto) e circulantes no sangue de *Leishmania brucei*, protozoário causador da doença do sono. As catelicidinas também apresentaram atividade *in vivo* quando pré-incubadas com as formas circulantes de *L. brucei*, diminuindo o crescimento desse parasita quando administrado em camundongos, bem como, diminuindo a mortalidade dos animais.

Adicionalmente, PAMs de diferentes fontes de seres vivos também podem apresentar potencial antiproliferativo sobre diferentes linhagens de células cancerígenas. Gomesin, um peptídeo isolado dos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, quando incorporado a uma formulação em creme, apresentou atividade contra tumor sólido de melanoma murino (B16-F10-Nex2), retardando o crescimento do tumor com o tratamento tópico dos camundongos (RODRIGUES et al., 2008); o Tv1 isolado do veneno do caramujo *Terebra variegata*, demonstrou atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células de câncer de fígado (BNL 1ME A.7R.1) de forma seletiva (não apresentou citotoxicidade para células de fígado não-tumorigênicas) e por via apoptótica (ANAND et al., 2019); outro exemplo são os peptídeos AaeAP1 e AaeAP2, derivados da peçonha do escorpião *Androctonus aeneas*, que apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* sobre diferentes linhagens de células cancerígenas humanas como câncer de mama (MCF-7), próstata (PC-3), melanoma de glândula mamária (MB435s) e carcinoma pulmonar (H460) (DU et al., 2015), entre outros.

Diante disso, os PAMs se mostram como moléculas com alto potencial para o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos e antineoplásicos, sendo a busca por estas moléculas nos diferentes seres vivos uma fonte promissora de obtenção, como por exemplo os escorpiões, como será discutido a seguir.

1.3 Escorpião *Tityus stigmurus* como fonte de biomoléculas

Os escorpiões são animais que habitam a terra há mais de 400 milhões de anos, estando amplamente distribuídos nos mais diversos biomas (savanas, florestas tropicais, subtropicais e desertos), ausentes somente nas regiões da Antártica. Apesar da elevada plasticidade ecológica, sua morfologia se manteve quase que inalterada ao longo do tempo (ABDEL-RAHMAN et al., 2009; ABDEL-RAHMAN; HARRISON; STRONG, 2015; ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; PRENDINI; WHEELER, 2005). Eles estão inseridos na classe Arachnida e agrupados na ordem Scorpiones, contando com cerca de 14 famílias, 183 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies catalogadas (REIN, 2020).

Na América do Sul, os maiores causadores de acidentes escorpiônicos pertencem a família Buthidae, na qual existem mais de 1180 espécies descritas (OJANGUREN-AFFILASTRO et al., 2017; REIN, 2020). Especificamente no Brasil, o gênero *Tityus* é o mais

abundante, com 22 espécies catalogadas (ESPOSITO et al., 2017; NENCIONI et al., 2018; WARD; ELLSWORTH; NYSTROM, 2018), sendo *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus obscurus* e *Tityus stigmurus* consideradas as espécies de maior importância médica, devido ao número de acidentes, bem como pela gravidade que causam nas vítimas (BUCARETCHI et al., 1995, 2014; WARD; ELLSWORTH; NYSTROM, 2018). De acordo com Furtado e colaboradores (2020), no Sistema de Informação de Doenças por Notificação (SINAN) entre os anos de 2014-2018, ocorreram mais de 547.000 casos de acidentes envolvendo escorpiões, que resultaram em 466 casos fatais.

Quanto à morfologia, de forma geral, os escorpiões possuem seu corpo dividido em duas regiões: o prossoma, também chamado de carapaça (não segmentada), que partem um par de quelíceras (para trituração de alimentos), um par de pedipalpos (para imobilização da presa) e quatro pares de pernas; e o opstossoma, o qual é subdividido em mesossoma (corpo) e segmento metassomal (cauda), sendo este último penta segmentado com o télson (órgão inoculador da peçonha, o qual é constituído da glândula, acúleo e dente subacular) na sua porção final (Figura 3) (BERGERON; BINGHAM, 2012; BRAZIL; PORTO, 2010).

De forma específica, o *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae), é uma espécie nativa de escorpião que predomina no nordeste do Brasil, especialmente na região da Caatinga, sendo responsável pela maioria dos acidentes envolvendo escorpiões nessa região, podendo resultar em casos fatais, sobretudo em crianças (ALBUQUERQUE et al., 2013; ARAÚJO et al., 2017; FURTADO et al., 2020).

Popularmente, *T. stigmurus* (6-6,5 cm de comprimento) é conhecido como escorpião amarelo por apresentar uma coloração amarelo-palha predominante (Figura 3), contudo, possui algumas características as quais lhe são particulares como: extremidades dos pedipalpos e acúleo avermelhados; em seu prossoma é possível encontrar três pares de olhos laterais e um par de olhos oculares medianos, além de uma mancha preta em forma de triângulo invertido (base na região anterior). Além disso, possui três faixas dorsais longitudinais ao longo do mesossoma, duas posicionadas mais lateralmente e uma ao centro. As principais diferenças morfológicas entre escorpiões masculinos e femininos são evidentes na região do metassoma, que parecem mais volumosas nas fêmeas. O télson tem um acúleo longo, com curvatura acentuada e um dente subaculear espinóide, com orifícios que expõem o veneno produzido pelas glândulas (LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 1988; SANTOS et al., 2014; SOUZA et al., 2009; VON EICKSTEDT, 1984).

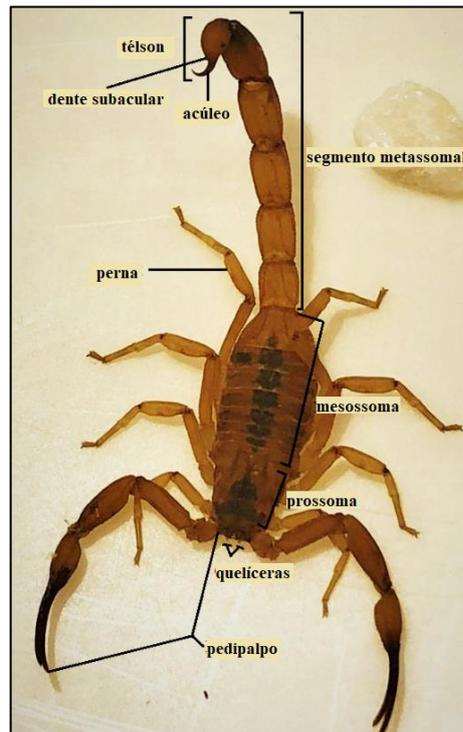


Figura 3 - Morfologia do escorpião *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scopiones: Buthidae). Fonte: adaptado de Furtado e colaboradores (2020).

1.3.1 Composição da peçonha do *T. stigmurus*

A peçonha dos escorpiões é resultante de uma mistura complexa de moléculas biológicas produzidas ao longo de um processo evolutivo, para captura de presas e sua defesa contra predadores (JERAM, 1998), causando quadros de toxicidade tanto para animais vertebrados como para invertebrados (CUPO, 2015a, 2015b; SILVA et al., 2016).

Dentre esse arsenal de moléculas encontradas na peçonha dos escorpiões, podemos destacar a presença de proteínas e peptídeos, que contribuem para a evolução do quadro de envenenamento, como por exemplo, as neurotoxinas, fosfolipases, mucoproteínas e hialuronidases, além de outros componentes como nucleotídeos e aminas biogênicas (ALMEIDA et al., 2012; BORDON et al., 2015; FUZITA et al., 2015; MILLE et al., 2015; PESSINI et al., 2001). Com relação aos peptídeos, eles normalmente são divididos em dois grupos: peptídeos com ligação dissulfeto (PPDs) e peptídeos sem ligação dissulfeto (PSPDs) (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005; ZHIJIAN et al., 2006).

Os PPDs de escorpião estão mais associados às ações neurotóxicas do envenenamento, pois atuam alterando a permeabilidade dos canais iônicos nas células excitáveis e não excitáveis, seja bloqueando ou diminuindo a atividade desses canais. Podem ser classificados como toxinas os peptídeos que atuam em canais iônicos de sódio, potássio,

cálcio ou cloro (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; BHAVYA et al., 2016; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; ZHIJIAN et al., 2006).

Os peptídeos que atuam em canais de sódio possuem de 58 a 76 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro ligações dissulfeto, sendo classificados em α -toxinas (prolongam o tempo de despolarização do canal iônico) e β -toxinas (alteram o limiar de ativação do canal iônico), sendo as principais toxinas relacionadas aos sintomas desenvolvidos no envenenamento por escorpião (BHAVYA et al., 2016; COLOGNA et al., 2009; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; ZHIJIAN et al., 2006; ZHU et al., 2013). Os peptídeos que atuam em canais de potássio, possuem uma maior variabilidade em sua sequência primária, com 20-70 resíduos de aminoácidos em sua composição, estabilizadas por três ou quatro pontes dissulfeto (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016; ZHIJIAN et al., 2006). Essas toxinas ainda podem ser classificadas como toxinas α -KTx, β -KTx, γ -KTx e κ -KTx, de acordo com a similaridade da sequência primária, massa molecular e padrão de ligações dissulfeto que apresentam (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016; NIRTHANAN et al., 2005; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015; TYTGAT et al., 1999).

Com relação aos peptídeos de escorpião que atuam em canais de cloro e cálcio, os estudos ainda são escassos, sendo pouco identificados e caracterizados na literatura (BOURINET; ZAMPONI, 2016). Os PPDs que atuam em canais de cloro variam de 30-40 resíduos de aminoácidos em sua estrutura, as quais são estabilizadas por quatro ligações dissulfeto. Entretanto, os PPDs que atuam em canais de cálcio, devido a sua maior variação da sequência primária e massa molecular, podem assumir diversas conformações e com número variável de ligações dissulfeto (BHAVYA et al., 2016; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015; ZHIJIAN et al., 2006).

Os PSPDs de escorpiões, possuem uma grande diversidade genética e funcional, revelando diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana (contra bactérias, fungos, vírus e parasitas), inseticida, hipotensora, antiproliferativa, hemolítica, imunomoduladora, entre outras, embora a atividade antimicrobiana seja comumente a mais relatada (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; SCHWARTZ; POSSANI, 2010).

Esses peptídeos geralmente apresentam de 13-56 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, com um caráter anfipático, hidrofobicidade variando de 30-50% e uma carga superficial positiva que pode variar de 2-9 (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; HANCOCK, 2001; HARRISON et al., 2014). Tais características são observadas devido à presença de resíduos básicos (que se ionizam positivamente em pH fisiológico) e resíduos hidrofóbicos na

sequência primária dessas moléculas, o que permite a formação de uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica da molécula (HANCOCK, 2001, 1997; WANG; WANG, 2016).

Ademais, outra característica bem marcante nessas moléculas é a presença da amidação C-terminal conservada em peptídeos antimicrobianos naturais, demonstrando a importância dessa modificação pós-traducional nos PAMs (BULET et al., 1999; DAI et al., 2008; ZENG et al., 2013). Estudos têm demonstrado que a amidação C-terminal está intimamente relacionada com a estabilidade dessas moléculas frente a ação de proteases e a capacidade de manter a sua estrutura secundária, e conseqüentemente de suas atividades biológicas (BRINCKERHOFF et al., 1999; LEE; TUNG; LIN, 2014). No entanto, no estudo realizado por Dennison e colaboradores (2009), em que avaliou a atividade antibacteriana e antiproliferativa de uma série de PAMs amidados na porção C-terminal e suas respectivas isoformas não amidadas, foi demonstrado que a ausência desse grupamento pode acarretar no aumento, perda ou não causar nenhum tipo de alteração nessas atividades. Sendo assim, apesar da variável influência da amidação na região C-terminal, esta deve ser levada em consideração na avaliação das atividades biológicas de peptídeos antimicrobianos.

Os PAMs com maiores valores de momento hidrofóbico (μH) em comparação com a hidrofobicidade (H), estão normalmente relacionados com melhores atividades biológicas em células com membranas aniônicas, isso porque o momento hidrofóbico reflete diretamente a anfipaticidade do peptídeo (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1984). Ao contrário, peptídeos muito hidrofóbicos tendem a perder a capacidade de interação inicial com membranas aniônicas, além de tenderem a interação entre os seus monômeros, acarretando agregação peptídica e menor atividade. Esse fato foi observado para os peptídeos catiônicos e α -helicoidais AcrAP1 ($\mu H = 0,437$; $H = 0,902$) e AcrAP2 ($\mu H = 0,474$; $H = 0,856$) do escorpião *Androctonus crassicauda*, em que seus análogos AcrAP1a e AcrAP2a apresentaram maiores valores de μH (0,640 e 0,639, respectivamente) e menores valores de hidrofobicidade (0,681 e 0,676) em relação aos peptídeos nativos, refletindo diretamente em uma maior atividade antimicrobiana e menor atividade hemolítica desses peptídeos análogos (DU et al., 2014). Semelhante fato foi observado entre o peptídeo nativo AamAP1 ($\mu H = 0,435$; $H = 0,904$) do escorpião *Androctonus amoeruxi* e o seu análogo A3 ($\mu H = 0,517$; $H = 0,746$) (ALMAAYTAH et al., 2018).

Vários são os exemplos de PAMs de escorpiões com potencial aplicação para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. O Hadrurin do escorpião mexicano *Hadrurus aztecus*, apresentou atividade contra cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, revelando uma alta atividade hemolítica (TORRES-LARIOS et al., 2000); Panidin 1 e 2 do escorpião africano *Pandinus imperator* apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas

e gram-negativas, com ação sobre as leveduras da espécie *Candida albicans* para o Panidin 2. Contudo, Panidin 2 demonstrou alta atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro, diferentemente de Panidin 1 (CORZO et al., 2001). Alguns PAMs, como o caso do Ctriporin do escorpião *Chaerilus tricostatus*, têm apresentado atividade contra cepas resistentes a antibióticos, revelando atividade contra cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina e penicilina (FAN et al., 2011). O Vejovine, peptídeo do escorpião mexicano *V. mexicanus* possui ação antibacteriana contra as cepas multirresistentes de bactérias gram-negativas, tais como, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter baumannii* (HERNÁNDEZ-APONTE et al., 2011).

Adicionalmente, Meucin-24 e 25 do escorpião *Mesobuthus eupeus* apresentaram ação contra protozoários, em que inibiram o crescimento das formas trofozoíticas do *Plasmodium falciparum* (GAO et al., 2010); o Mauriporin do escorpião marroquino *Androctonus mauritanicus* apresentou ação citotóxica para células do câncer de próstata e baixa atividade hemolítica em eritrócitos de mamíferos (ALMAAYTAH et al., 2013) e o Hp1090 do escorpião *Heterometrus petersii* que revelou atividade virucida contra o vírus da hepatite C, bem como inibiu a infecção *in vitro* (YAN et al., 2011).

A seguir, dados compilados com as informações sobre as moléculas identificadas e caracterizadas na peçonha do escorpião *T. stigmurus*, do artigo de revisão intitulado “*Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion Tityus stigmurus (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review*” de Furtado e colaboradores (2020), serão relatados.

Empregando a abordagem de análise transcriptômica, Almeida e colaboradores (2012), apresentaram o perfil de expressão gênica da glândula produtora de peçonha não estimulada do escorpião *T. stigmurus*. A biblioteca de cDNA possibilitou a identificação dos grupos de moléculas e suas respectivas porcentagens de abundância no total de transcritos, como podemos visualizar, resumidamente, na Tabela 1:

Tabela 1 - Grupos de moléculas presentes no veneno do escorpião *T. stigmurus*

<i>Grupo de moléculas</i>	<i>Abundância no total de transcritos (%)</i>
Peptídeos aniônicos	27,22
Peptídeos antimicrobianos	25,19
Peptídeos que atuam em canais de potássio	13,52
Peptídeos hipoteticamente secretados	3,70
Peptídeos com função desconhecida	1,48
Arginina quinase	1,48
Metaloproteases	1,30
Peptídeos hipotensores	1,11
Peptídeos que atuam em canais de sódio	1,30
Peptídeos ricos em cisteína	0,37

Fonte: compilado de dados apresentados por Almeida et al. (2012).

Embora a importância das neurotoxinas nos quadros de envenenamento por escorpiões seja evidente (BOURINET; ZAMPONI, 2016; NORTON; CHANDY, 2017; XU et al., 2018), assim como acontece com acidentes envolvendo o *T. stigmurus* (ALBUQUERQUE et al., 2013), o perfil proteico apresentado por essa espécie, evidenciou uma maior abundância de peptídeos aniônicos e antimicrobianos, com 27,22% e 25,19% do total de transcritos, respectivamente.

A partir deste transcriptoma realizado por Almeida e colaboradores (2012), moléculas do veneno do escorpião *T. stigmurus* foram caracterizadas quanto a estrutura e ações biológicas avaliadas *in vitro* e *in vivo*, demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de peptídeos caracterizados quanto a estrutura e ação biológica a partir do transcriptoma do veneno do escorpião *T. stigmurus*.

<i>Peptídeo</i>	<i>Ações biológicas</i>	<i>Referência</i>
TstβKTx	Bloqueador de canais de potássio	(ALMEIDA et al., 2013)
Stigmurina	Antimicrobiano com potencial benéfico na sepse polimicrobiana, antiproliferativo e antiparasitário	(AMORIM-CARMO et al., 2019; DANIELE-SILVA et al., 2016; MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018)
TsAP-2	Antimicrobiano com potencial benéfico na sepse polimicrobiana	(DANIELE-SILVA et al., 2016)
TistH	Hipotensor e antifúngico	(MACHADO et al., 2016, 2015; TORRES-RÊGO et al., 2019)
TanP	Quelante de metal (cobre bivalente)	(MELO et al., 2017)
Peptídeo α-KTx	Bloqueador de canais de sódio	(FREIRE et al., 2019)

Fonte: compilado de dados obtidos de Furtado e colaboradores (2020).

A multifuncionalidade da Stigmurina, um PAM identificado na peçonha do *T. stigmurus*, foi observada pela primeira vez por Melo e colaboradores (2015). Stigmurina (FFSLIPSLVGGLISAFK-NH₂) consiste em um PSPD com 17 resíduos de aminoácidos, carga

superficial positiva (+2) em pH fisiológico, e que tem a capacidade de modificar sua estrutura dependendo do meio em que estiver inserido, além de apresentar alta estabilidade sob variações de temperatura e pH quando avaliado por dicroísmo circular (AMORIM-CARMO et al., 2019; DANIELE-SILVA et al., 2016; MELO et al., 2015). Pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foi possível observar que Stigmurina em solução de trifluoroetanol: água, apresentou conformação randômica na sua porção N-terminal (Phe-1 a Pro-6) e estrutura helicoidal dos resíduos Ser-7 a Phe-16 (DANIELE-SILVA et al., 2021) (Figura 4).

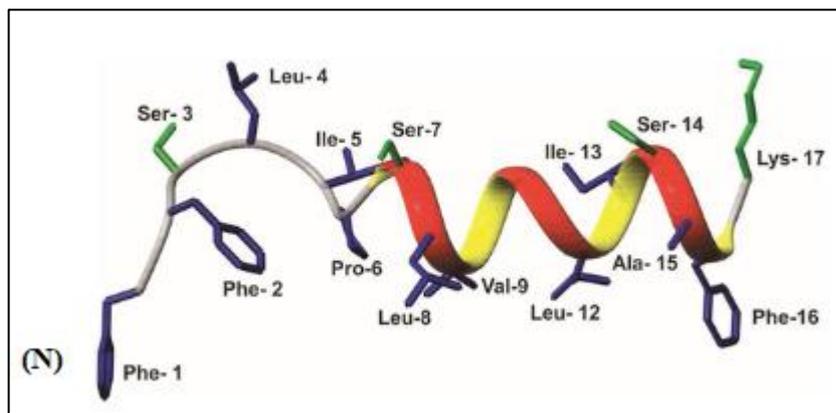


Figura 4 - Estrutura tridimensional de Stigmurina. (N), representa a região N-terminal do peptídeo. As cadeias laterais dos resíduos hidrofílicos estão representadas em verde e dos resíduos hidrofóbicos em azul. Estrutura obtida por ressonância magnética nuclear. Fonte: adaptado de Daniele-Silva e colaboradores (2021).

Em relação a sua atividade biológica, Stigmurina apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas de bactérias gram-positivas de *S. aureus* (ATCC 29213) em 8,68 μM e *S. aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591) em 17,37 μM , bem como contra cepas de leveduras do gênero *Candida* (*Candida albicans* - ATCC 90028, *C. krusei* - ATCC 6258 e *C. glabrata* - ATCC 90030) em 34,75-69,5 μM . No entanto, essa molécula não apresentou atividade contra bactérias gram-negativas até a concentração de 139 μM (DANIELE-SILVA et al., 2016; MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018). Adicionalmente, esse peptídeo revelou um potencial antiproliferativo *in vitro* em diversas linhagens celulares como as do carcinoma cervical humano (SiHa), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma cervical humano (HeLa), adenocarcinoma renal (786-0), melanoma murino (B16-F10) e adenocarcinoma de pâncreas (Panc 10.05), além de efeito antiparasitário *in vitro* sobre as formas epimastigota e tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (DANIELE-SILVA et al., 2016; MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018). A análise da citotoxicidade da Stigmurina, revelou baixa ação hemolítica em hemácias humanas, contudo, apresentou ação tóxica em linhagem de fibroblastos murinos (NIH/3T3, ATCC CRL-1658), com índice de citotoxicidade de 50% (IC_{50}) de 7,98 μM (MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018).

Associado a atividade antibacteriana *in vitro*, Stigmurina apresentou potencial ação benéfica na sepse polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos, diminuindo a carga bacteriana, a migração leucocitária e as citocinas pró-inflamatórias peritoneais, bem como, reduziu a inflamação em órgãos como pulmão e ceco (DANIELE-SILVA et al., 2016). Foi observado também, a capacidade antioxidante *in vitro* de Stigmurina pela eliminação de radicais hidroxila (acima de 70% em 10 μ M), além diminuir em 67,2%, na concentração de 1 μ g/mL, o número de microrganismos viáveis nas feridas infectadas com *S. aureus* em murinos, aumentando a taxa de retração das feridas, demonstrando além da atividade antibacteriana, a ação cicatrizante deste peptídeo (DANIELE-SILVA et al., 2021).

Com um perfil semelhante a Stigmurina, o TsAP-2 (FLGMIPGLIGGLISAFK-NH₂), um peptídeo antimicrobiano encontrado no veneno do *T. stigmurus* e com sequência aminoacídica idêntica a um peptídeo encontrado no veneno *T. serrulatus* (GUO et al., 2013), também revelou atividade antibacteriana em diferentes cepas de bactérias gram-positivas (*S. aureus* resistente a meticilina-ATCC 33591, *S. aureus*-S015 e *E. faecalis*-ATCC 29212), além de potencial antiproliferativo em células HepG2 e baixa citotoxicidade para linhagens de células epiteliais do rim canino quando comparada a Stigmurina, embora tenha apresentado expressiva atividade hemolítica em concentrações acima de 15 μ M (DANIELE-SILVA et al., 2016; GUO et al., 2013).

Outro PSPD identificado no veneno do *T. stigmurus*, denominado TistH, classificado como um peptídeo hipotensor devido a atividade hipotensora em ratos normotensos por potencializar a ação da bradicinina (MACHADO et al., 2016, 2015), apresentou potencial antimicrobiano. O TistH (ADMDFTGIAESIKKIKETNAKPPA-NH₂) possui 25 resíduos de aminoácidos com capacidade de modificar sua estrutura secundária dependendo do meio em que esteja presente, além de manter-se estável em faixas extremas de pH e temperatura (analisado por DC) (MACHADO et al., 2016, 2015). Este peptídeo também apresentou baixa toxicidade em linhagens de células normais, como fibroblastos (BALB/3T12-3 ATCC CCL-164), macrófagos (RAW 264.7 ATCC TIB-71) e epiteliais de rim (HEK-293 ATCC CRL-1573), além de hemácias e células cancerígenas. Quanto a atividade antimicrobiana, TistH revelou potencial ação contra cepas de leveduras como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Aspergillus flavus*, responsáveis por importantes infecções orais/vaginais, candidíase e alergias respiratórias, respectivamente. Essa ação contra leveduras foi potencializada pela incorporação do TistH em nanopartículas de quitosana sobre as formas planctônicas e sésseis do microrganismos (TORRES-RÊGO et al., 2019).

Dessa forma, o repertório molecular do *T. stigmurus* se torna uma fonte promissora para a caracterização estrutural e biológica de um grande número de moléculas com potencial farmacológico e biotecnológico, especialmente para os peptídeos antimicrobianos (FURTADO et al., 2020).

1.3.2 Peptídeos análogos do *T. stigmurus*

Segundo Nguyen e colaboradores (2011), pequenas substituições de aminoácidos na cadeia curta de peptídeos podem ocasionar grandes mudanças na conformação e atividade dessas moléculas. A produção de análogos de moléculas nativas vem ganhando cada vez mais interesse na pesquisa, pela necessidade da descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças (ALMAAYTAH et al., 2012; BEA; PETRAGLIA; JOHNSON, 2015; LUNA-RAMÍREZ et al., 2014), em que a terapia por algum motivo encontra-se limitada, como no caso antimicrobianos e antineoplásicos (ASSARAF et al., 2019; BARRIERE, 2015; BOUCHER et al., 2013; PIDDOCK, 2012).

Como relatado anteriormente, a cationicidade, anfipaticidade e estrutura helicoidal são fatores importantes para a interação dessas moléculas com a superfície de células microbianas e células cancerígenas (EPAND; EPAND, 2009; ORTIZ et al., 2015; WANG; WANG, 2016). Sendo assim, a substituição de resíduos na sequência primária de peptídeos protótipos que favoreçam o aumento desses parâmetros físico-químicos e estruturais, podem levar a uma maior atividade por parte dos peptídeos análogos em comparação ao peptídeo nativo.

Nesse sentido, modificações pela substituição de resíduos hidrofóbicos como leucina e resíduos polares não-carregados como a serina, por resíduos básicos que apresentam carga positiva em pH fisiológico, como lisina e arginina, promovem o aumento da carga superficial positiva dessas moléculas, tendo em vista que as cadeias laterais desses aminoácidos se projetam para a face externa da hélice, favorecendo a interação com as superfícies microbianas. Em contrapartida, modificações por substituição com resíduos hidrofóbicos em peptídeos essencialmente catiônicos, como leucina, irão favorecer o aumento da anfipaticidade da α -hélice em protótipos em que a hidrofobicidade é reduzida (HANCOCK, 1997; WANG; WANG, 2016).

Sob estes aspectos, substituições pontuais de resíduos de leucina e serina por resíduos de lisina foram realizadas no peptídeo nativo Stigmurina por nosso grupo de pesquisa, resultando em um pedido de depósito de patente (código de registro BR102015029044-6) com 31 sequências análogas à Stigmurina, objetivando analisar a estrutura secundária dessas

moléculas, avaliando também o potencial antimicrobiano e antiproliferativo, toxicidade, bem como, os possíveis mecanismos de ação envolvidos nessas atividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar estruturalmente e avaliar as atividades antibacteriana, antiparasitária e antiproliferativa de peptídeos análogos do peptídeo nativo Stigmurina.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar as predições *in silico* da estrutura secundária, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e carga superficial dos peptídeos análogos da Stigmurina;;
- Analisar a estrutura secundária *in silico* dos peptídeos análogos por modelagem molecular;
- Avaliar *in vitro*, a estrutura secundária e estabilidade dos peptídeos análogos em diferentes meios, pH e temperatura;
- Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* dos peptídeos análogos em hemácias e em linhagem de células normais e *in vivo*;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos peptídeos análogos pela determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima;
- Avaliar a atividade antibiofilme *in vitro* e sobre a topografia do biofilme;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vivo* dos peptídeos análogos;
- Analisar a atividade antiparasitária dos peptídeos análogos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanossoma cruzi*;
- Avaliar o potencial antiproliferativo dos peptídeos análogos em linhagens de células cancerígenas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Predição dos Parâmetros Físico-Químicos e Estruturais dos Peptídeos Análogos

A partir dos 31 análogos registrados em pedido de depósito de patente, dois foram selecionados (denominados de StigA8 e StigA18) de acordo com as predições *in silico* dos parâmetros físico-químicos e estruturais. As propriedades físico-químicas teóricas de hidrofobicidade, carga superficial e o momento hidrofóbico dos peptídeos foram analisadas pelo uso da plataforma HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) e para predição da estrutura secundária a plataforma PORTER (<http://distillf.ucd.ie/porterpaleale/quickhelp.html>).

3.2 Modelagem Molecular

A predição *in silico* da estrutura molecular dos peptídeos análogos foi realizada pela plataforma *Ab Initio Domain Assembly Server* (AIDA) (<https://aida.godziklab.org/>) (XU et al., 2014) e após a obtenção dos modelos teóricos foi realizada a validação destes, utilizando a plataforma Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>) (CHEN et al., 2010). Para a obtenção e visualização da estrutura tridimensional teórica foi utilizado o *software* UCSF Chimera 1.8.1.

3.3 Obtenção dos Peptídeos Análogos

Stigmurina (FFSLIPSLVGGLISAFK-NH₂) e os peptídeos análogos StigA8 (FFSLIPKLVGKLIKAFK-NH₂) e StigA18 (FFSLIPKLVGKLIKAFK-NH₂) foram obtidos comercialmente na forma liofilizada e amidada na posição C-terminal pela empresa *AminoTech* Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil) e armazenados sob refrigeração a -20°C até o momento do uso, como recomendado pelo fabricante. Os peptídeos sintéticos foram purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (pureza > 95%) e suas respectivas massas moleculares foram confirmadas pelo fabricante por Espectrometria de Massas (Anexo A). O uso dos peptídeos está permitido pelo SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o código de atestado de regularização AAF17D9 de 24/04/2018.

3.4 Dicroísmo Circular

3.4.1 Influência do Meio na Estrutura Secundária

A análise estrutural *in vitro* de StigA8 e StigA18 foram realizadas pela técnica de dicroísmo circular no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, São Paulo). Os peptídeos foram analisados por dicroísmo circular (DC), sendo realizadas leituras em espectropolarímetro JASCO-J 810 (Tokio, Japão) em uma cubeta de quartzo de 10 mm, acoplada a um sistema interno de controle de temperatura a 25°C. Os espectros foram analisados em diferentes soluções: água ultra-pura, dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM, tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4) e 2,2,2- Trifluoroetanol (TFE) nas concentrações de 20-70% (v/v), nos comprimentos de onda entre 190-260 nm, a uma velocidade de 50 nm.mim⁻¹. As soluções foram preparadas para uma concentração final de 0,15 mg/mL dos peptídeos. As leituras foram obtidas em miligraus (1/1000°) e convertidos em elipticidade molar utilizando a seguinte equação (JUBAN et al., 1997):

$$[\theta] = \frac{(E) * 100 * M}{C * I * Nr}$$

Onde $[\theta]$ corresponde a elipticidade molar em miligraus, (E) é a elipticidade em miligraus/1000), M é a massa molecular, I é o caminho óptico (cm), C corresponde a concentração da amostra (mg/mL), e Nr corresponde ao número de resíduos de aminoácidos-1. A deconvolução dos espectros de dicroísmo circular foi obtida utilizando o banco de dados Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>) (WHITMORE; WALLACE, 2007) e as estimativas foram analisadas utilizando o algoritmo CDSSTR (COMPTON; JOHNSON, 1986). Os espectros finais foram obtidos pela subtração dos espectros dos respectivos solventes nas mesmas condições.

3.4.2 Influência do pH na Estrutura Secundária

A determinação da influência do pH na estrutura dos peptídeos StigA8 e StigA18 (0,15 mg/mL) em SDS 20 mM foi realizada por DC, utilizando tampões de ácido cítrico (C₆H₈O₇) 0,1 M/Fosfato de sódio (Na₂HPO₄) 0,2 M para pH de 3,0-7,4 e ácido bórico (H₃BO₃) 0,2 M/ borato de sódio (Na₂B₄O₇) 0,05 M, para pH de 8,0-9,0 (RUSSELL et al., 2012; TRACY, 2006). As leituras e os espectros foram obtidos conforme descrito em 3.4.1.

3.4.3 Influência da Temperatura na Estrutura Secundária

A avaliação estrutural dos peptídeos StigA8 e StiA18 (0,15 mg/mL) em SDS 20 mM foi realizada por DC, sendo utilizado o espectropolarímetro JASCO-J 810 (Tokio, Japão), com célula termostaticada do tipo Peltier para controle de temperatura. A análise foi realizada em comprimento de 190-260nm e em comprimento de onda fixo a 222 nm, sendo realizado o aquecimento no intervalo de 2-98°C, seguido de arrefecimento de 98-2°C das amostras, com coleta de dados a cada 0,1°C (LEE; TUNG; LIN, 2014). As leituras e os espectros foram obtidos conforme descrito em 3.4.1.

3.5 Biocompatibilidade

3.5.1 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica dos peptídeos sintéticos foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Menezes et al. (2014) com modificações. As amostras sanguíneas foram obtidas de doadores saudáveis com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes-HUOL/UFRN, sob número de parecer 3127063. Elas foram coletadas em tubos de EDTA (Vaccuete[®] Tube, Greiner Bio-One, Brasil) e processadas por centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, a camada de plasma e leucócitos foi descartada e os eritrócitos lavados com PBS por 3 vezes, pelo processo de centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga (Eppendorf[®] 5804 R, Alemanha). A partir deste concentrado resultante, foi preparada uma solução a 20% (v/v) de eritrócitos, utilizando o mesmo tampão. Em seguida, preparou-se diluições seriadas dos peptídeos em PBS para uma concentração final de 150-1,17 µM dos peptídeos (Stigmurina, StigA8 e StigA18) em uma solução de eritrócitos 1% (v/v), a partir da suspensão de 20% (v/v). As amostras foram incubadas a 37°C em banho termostático, durante 1 h, e centrifugadas 1.500 rpm durante 10 min em centrífuga (Eppendorf[®] 5424 R, Alemanha). 200 µL do sobrenadante obtido foram utilizados para calcular a porcentagem de hemólise medindo a liberação de hemoglobina pela densidade óptica em 540 nm, usando o leitor de microplacas (Epoch-Biotek, Winooski, VT, EUA). Os resultados foram comparados com o grupo controle negativo de hemólise (PBS + suspensão de eritrócitos) e controle positivo de hemólise (água destilada + suspensão de eritrócitos). O resultado foi dado pelo teor de hemoglobina presente no sobrenadante aplicado a fórmula:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{(\text{AAT} - \text{ACN})}{(\text{ACP} - \text{ACN})} \times 100$$

Em que: **AAT** = Absorbância da amostra teste, **ACN** = Absorbância do controle negativo e **ACP** = Absorbância do controle positivo.

3.5.2 Atividade Citotóxica *in vitro*

A citotoxicidade dos peptídeos análogos StigA8 e StigA18 foi avaliada utilizando o método de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Linhagens de células não neoplásicas de fibroblasto murino (NIH/3T3, ATCC, CRL1658) foram cultivadas até a confluência em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo incubadas a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL da suspensão de células (5x10³ células/poço) nas condições citadas anteriormente durante 24 h. Após essa etapa, o meio foi substituído por 100 µL de DMEM e submetido à incubação por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído por 90 µL do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 µL dos peptídeos análogos para uma concentração final de 40-2 µM em água ultrapura, sendo incubados por 24 h a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Após a incubação, o meio foi retirado e substituído por 100 µL da solução de MTT (1 mg/mL) e incubado a 37°C/4 h em atmosfera a 5% de CO₂. A solução do MTT em cada poço foi substituída por 100 µL de álcool etílico a 96% e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos, sob agitação, para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada no leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) em 570 nm. As linhagens celulares incubadas com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, na ausência dos peptídeos, foram utilizadas para normalizar os resultados. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e o ensaio em duplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da equação abaixo (MELO-SILVEIRA et al., 2014):

$$\% \text{viabilidade celular} = \frac{(\text{A}_T - \text{M}_{BT})}{(\text{M}_{Cri})} \times 100$$

Em que: **A_T** = absorbância da amostra teste, **M_{Cri}** = Média da absorbância do controle positivo e **M_{BT}** = Média da absorbância do branco do teste.

3.5.3 Toxicidade *in vivo*

Para avaliação da toxicidade *in vivo* de StigA8 e StigA18, foi realizado o modelo experimental de acordo com Peleg e colaboradores (2009), com algumas modificações. Foram utilizadas larvas de mariposa da espécie *Galleria mellonella*. As larvas foram mantidas em ambiente escuro a 25°C em incubadora BOD digital (CienlaB, Brasil) até chegarem ao seu último estágio larval e com massa corporal de 250-350 mg para poderem ser utilizadas no experimento. Cada grupo experimental apresentava 20 larvas e foram divididos de acordo com a amostra recebida, como mostra a Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Esquema de tratamento das larvas *G. mellonella* para avaliação da toxicidade de StigA8 e StigA18

Grupos experimentais com larvas de <i>Galleria mellonella</i>			
	Controle negativo de toxicidade	StigA8	StigA18
Injeção de PBS (protopata esquerda)	X	X	X
Dose (protopata direita)	X	120 mg/kg	120 mg/kg

(X) - recebeu água. Cada grupo experimental continha 20 indivíduos ($n = 20$). Fonte: autoria própria.

Nos grupos experimentais, foram injetados com uma seringa Hamilton de 50 μ L, um volume de 10 μ L de PBS em todos os grupos testados, na última protopata esquerda da larva. Após 30 minutos, as larvas receberam 10 μ L na protopata direita dos respectivos peptídeos na dose de 120 mg/kg (30 μ g) ou PBS para o grupo controle negativo de toxicidade.

As larvas de *G. mellonella* após os tratamentos, foram mantidas em incubadora My TEMP mini (Benchmark Scientific, EUA) a 37°C por 7 dias, e o número de larvas mortas foi registrado a cada dia de observação. Foram consideradas mortas, as larvas que não apresentaram movimento em resposta ao toque, bem como, mudanças de coloração (de amarelo-milho para esbranquiçada ou amarronzada) e melanização do corpo (pontuais ou uniformes). Para maiores informações sobre ciclo larval e manutenção das larvas, bem como o local de injeção e processo de melanização, consultar o Apêndice B desse documento.

3.6 Atividade Antibacteriana

3.6.1 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes cepas provenientes do laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN): *Staphylococcus aureus*

(ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As bactérias foram mantidas em ágar nutriente (HIMEDIA®, India) em miçangas a -80°C e a 4°C.

As cepas provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Recife (UFPE) foram *S. aureus* UFPEDA 02 e *S. aureus* multirresistentes: UFPEDA 1040, UFPEDA 1041, UFPEDA 1042, UFPEDA 1044, UFPEDA 1045, UFPEDA 1046, UFPEDA 1048, UFPEDA 1049, UFPEDA 1051, UFPEDA 1053, UFPEDA 1055, UFPEDA 1057, UFPEDA 1058, UFPEDA 1063.

A tabela 4 demonstra a descrição de obtenção e parâmetros biológicos dessas cepas multirresistentes de *S. aureus* utilizadas no experimento:

Tabela 4 - Descrição de obtenção e parâmetros biológicos de cepas multirresistentes de *S. aureus*.

Código de registro	<i>Sítio de infecção</i>	<i>Localidade do paciente</i>	<i>Capacidade de formação de biofilme</i>	<i>Resistência a antibióticos</i>
UFPEDA 1040	Lesão de perna	Ambulatorial	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1041	Lesão de virilha	Ambulatorial	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1042	Lesão de escara	Hospitalar	++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1044	Lesão conjuntival direita	Ambulatorial	++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1045	Ponta de cateter	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1046	Secreção traqueal	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1048	Secreção de ferida	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1049	Fragmento de tendão	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1051	Aspirado traqueal	Hospitalar	++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1053	Aspirado traqueal	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1055	Secreção de furúnculo	Ambulatorial	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1057	Sangue	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1058	Líquido torácico	Hospitalar	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina
UFPEDA 1063	Abscesso periodontal	Ambulatorial	+++	ciprofloxacina, eritromicina, metilina e oxacilina

+ (fraca); ++ (moderada); +++ (forte), de acordo com os parâmetros estabelecidos por (Stepanović e colaboradores (2007)). Fonte: autoria própria.

3.6.2 Obtenção do Inóculo

A padronização do inóculo dos microrganismos foi executada seguindo a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Os microrganismos foram cultivados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, BD[®], EUA) durante 24 h. Posteriormente, uma suspensão microbiana foi obtida em solução salina estéril 0,9%, correspondente a 1×10^8 UFC/mL de acordo com escala 0,5 de McFarland. Em seguida, esta suspensão foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em caldo *Muller Hinton* (MH, BD[®], EUA), correspondente a 1×10^6 UFC/mL utilizada para avaliação da atividade antibacteriana.

Para as cepas multirresistentes de *S. aureus* a padronização do inóculo procedeu-se da mesma maneira, diferindo o meio de cultivo, o qual foi utilizado o ágar triptonsoja (TSA) suplementado com 10% de sangue.

3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) das cepas ATCC provenientes da UFRN foram determinadas de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2015), com modificações. Em uma placa de 96 poços, 50 μ L da suspensão de microrganismos a 1×10^6 UFC/mL em caldo MH, foram adicionados a 50 μ L de StigA8 e StigA18 diluídos em água ultra-pura para diferentes concentrações (150-0,585 μ M), com posterior incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, sob agitação a 200 rpm, sendo avaliada a densidade óptica a 595 nm em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, Estados Unidos da América). Os poços contendo caldo MH e solução salina estéril a 0,9% foram utilizados como controle de esterilidade do meio (controle negativo de crescimento). Os poços com a suspensão de microrganismo e caldo MH foram utilizados como controle positivo de crescimento. Como controle do perfil de sensibilidade dos microrganismos foi utilizado vancomicina (0,15 μ M) e gentamicina (0,62 μ M).

A CIM foi determinada como a mínima concentração dos peptídeos análogos que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano (em que a absorbância a 595 nm foi a mesma do controle negativo de crescimento). Cada amostra foi realizada em quadruplicata e cada experimento foi realizado em duplicata. Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 μ L do controle positivo, do controle negativo e de todas as concentrações das amostras que estavam límpidas, foram repicadas em placas de Petri contendo ágar MH e incubadas por 24 h. A CBM foi determinada como a mínima concentração dos peptídeos análogos que foi capaz de matar as bactérias.

Para as cepas multirresistentes provenientes da UFPE, a determinação da CIM foi realizada conforme descrito acima, exceto pela ausência de agitação após a incubação das placas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Decorrido esse tempo, foram adicionados aos poços, 10 μL de resazurina 0,01% e a microplaca incubada por mais 2 h para posterior leitura visual. A CIM foi determinada como a mínima concentração dos peptídeos análogos ou vancomicina que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano (em que não houve a conversão da resazurina de cor azul para resorufina de cor rosa). Para a determinação da CBM, alíquotas de 5 μL dos poços (controle positivo, controle negativo e amostras até na CIM) foram pipetadas em placas de Petri contendo ágar MH e incubadas por 24 h. A CBM foi determinada como sendo a menor concentração capaz de matar as bactérias. O controle de sensibilidade utilizado foi vancomicina a partir da concentração de 10 μM .

A capacidade bactericida ou bacteriostática dos peptídeos foi determinada a partir da razão entre CBM e CIM. Uma relação menor ou igual a 2 ($\text{CBM}/\text{CIM} \leq 2$), indica uma possível ação bactericida da amostra; $4 \leq \text{CBM}/\text{CIM} < 32$ indica uma possível ação bacteriostática e quando $\text{CBM}/\text{CIM} \geq 32$, indica que o microrganismo é tolerante a molécula a qual está sendo testada (LV et al., 2019).

3.6.4 Atividade Antibiofilme

A atividade antibiofilme dos peptídeos StigA8 e StigA18 foi avaliada sobre o biofilme precoce e tardio de *S. aureus*.

3.6.4.1 Formação de Biofilme

Para a formação do biofilme tardio a bactéria *S. aureus* (ATCC 29213) foi semeada em meio ágar BHI e incubada a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. A partir dessa cultura, foi preparada uma suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de *McFarland* em solução salina 0,9% correspondente a 1×10^8 UFC/mL. Deste inóculo, preparou-se uma diluição (1:10) (v/v) do microrganismo em caldo MH suplementado com glicose 1%, correspondente a 1×10^7 UFC/mL. Em uma microplaca de 96 poços (Kasvi, China), 100 μL da suspensão de microrganismo foram incubados a 37°C , sem agitação, por 24 h, exceto nos poços reservados para serem os controles negativos (apenas caldo MH suplementado com glicose 1%). No biofilme precoce, o tempo de incubação foi de 4 h. Em seguida, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente por inversão e lavou-se com 200 μL de PBS (pH 7,4) por duas vezes para remover as células não aderidas (DOSLER; KARAASLAN; ALEV GERCEKER, 2016).

Para avaliar a formação do biofilme dos isolados multirresistentes de *S. aureus* (UFPEDA 1041, UFPEDA 1044, UFPEDA 1045, UFPEDA 1046, UFPEDA 1048, UFPEDA 1049 e UFPEDA 1058) procedeu-se de forma semelhante à descrita acima, com algumas modificações. As cepas foram semeadas em ágar triptona soja (TSA), suplementado com 10% de sangue e a suspensão bacteriana preparada em água destilada autoclavada. Para a formação a placa foi incubada a 37°C por 18 h para o biofilme tardio e 6 h para o biofilme precoce, sem agitação. Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante cuidadosamente por inversão e os poços lavados por duas vezes com 100 µL de água destilada autoclavada.

3.6.4.2 Determinação da Atividade Antibiofilme

Para a cepa *S. aureus* (ATCC 29213), StigA8 e StigA18 foram diluídos em caldo MH suplementado com glicose a 1% de modo que as concentrações finais fossem de 25-3,12 µM. A vancomicina foi utilizada como controle do perfil de sensibilidade do microrganismo nas concentrações 50-12 µM (também diluída em caldo MH). Poços contendo o caldo MH sem peptídeos ou vancomicina foram utilizados como controle negativo. Como controle positivo, poços apenas com a suspensão de bactérias e caldo MH foram utilizados. Sequencialmente, 100 µL das amostras foram aplicadas nos poços da placa e posteriormente incubadas por 24 h. Após o período de incubação, descartou-se o sobrenadante por inversão de forma cuidadosa e os poços lavados uma vez com PBS (pH 7,4). Em seguida, foi realizado o processo de fixação por 15 minutos, com a adição de 100 µL/poço de metanol P.A 99,89% (Ciavikko®-Brazil) e posteriormente removido por inversão. A microplaca foi mantida a temperatura ambiente para secar espontaneamente, sendo em seguida aplicado 100 µL/poço do cristal violeta 0,2% para a revelação, por 30 minutos. Sequencialmente, descartou-se o excesso de cristal violeta por inversão e a placa foi lavada por três vezes com PBS para posterior adição de 200 µL/poço de etanol P.A 95% (Ciavikko®-Brazil). A placa foi mantida sob agitação (100 rpm) por 5 minutos e 100 µL de cada poço foi transferido para uma nova placa de 96 poços para leitura em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) em 595 nm. O protocolo foi realizado segundo Dosler e colaboradores (2016) com algumas modificações. Cada amostra foi aplicada em quadruplicata e cada experimento em duplicata. A porcentagem de crescimento de biofilme foi expressa de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de crescimento de biofilme} = \frac{(A_T - M_{BT}) \times 100}{(M_{Ctrl})}$$

Em que: A_T = absorvância da amostra teste, M_{Ctrl} = Média da absorvância do controle positivo e M_{BT} = Média da absorvância do branco do teste.

Para a determinação da atividade antibiofilme das cepas multirresistentes de *S. aureus*, a metodologia procedeu de forma semelhante à descrita acima, com algumas modificações. Em microplaca de 96 poços, 100 μ L de StigA8 e StigA18 (7,5-1,87 μ M) ou vancomicina (10-2,5 μ M) diluídos em caldo MH foram incubados nos biofilmes precoce e tardio até completar 24 h de incubação. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e lavou-se duas vezes os poços com água destilada autoclavada. A concentração do cristal violeta utilizado foi de 1% para a revelação, com incubação de 20 minutos. A placa foi lavada com água destilada para posterior adição de 100 μ L/poço de etanol P.A 95% com incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) em 570 nm.

3.6.5 Avaliação Topográfica da Atividade Antibiofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais da UFRN (Natal, Brasil) em biofilme de *S. aureus* (ATCC 29213), com formação precoce e tardia, tratados com StigA8 e StigA18 na concentração de 12,5 μ M.

Os biofilmes foram preparados de acordo com Wu e colaboradores (2003), com algumas modificações. Para tanto, inicialmente foram preparadas as superfícies as quais o biofilme seria formado. Em uma placa de cultura estéril de 6 poços (Kasvi, China), foram colocadas superfícies circulares de poliestireno (aproximadamente 2,1 cm de diâmetro e 1,5 mm de espessura) embebidas em álcool 70% e expostas a luz ultravioleta por 15 minutos. Sobre essas superfícies, foram colocados 4 mL da suspensão bacteriana (1×10^7 UFC/mL), preparado de acordo com o item 3.6.2 e incubadas a 37°C por 24 h ou 4 h, no caso do biofilme tardio e precoce, respectivamente. Após esse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, sem tocar as superfícies colocadas nos poços. Posteriormente, foi

realizada a etapa de lavagem por duas vezes, para a retirada das células não aderidas, adicionando 4 mL de PBS (pH 7,4), retirando o sobrenadante entre um procedimento e outro.

Após o preparo das superfícies, foi adicionado 4 mL das amostras (StigA8 ou StigA18 preparadas em caldo MH suplementado com 1% de glicose) em seus respectivos poços e em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a etapa de lavagem com PBS por duas vezes, como descrito anteriormente. O biofilme foi fixado com a adição de 4 mL de solução de glutaraldeído a 3,5% por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem com PBS uma vez, e iniciada a desidratação pela adição de 4 mL de cada solução de álcool etílico descrita no Quadro 1, por 10 min em cada etapa.

Quadro 1. Concentração de álcool etílico e tempo de incubação utilizados na etapa de lavagem do biofilme.

Concentração de álcool etílico	Tempo (minutos)
35%	10
50%	10
75%	10
≅100%	10

Fonte: autoria própria

A cada solução de álcool etílico adicionada, decorrido o tempo de incubação, era retirada com o auxílio de uma pipeta para adição da solução seguinte. Após a retirada do álcool a ≅100%, as placas foram secas a temperatura ambiente (em média por 30 minutos). Sequencialmente, a placa de cultura celular foi tampada e vedada com filme de parafina plástica, e enviada para a realização das etapas de secagem em ponto crítico e metalização com ouro e análise em MEV (SEM-FEG ZEISS AURIGA[®] 40) para obtenção das imagens.

Os dados de porcentagem de área de cobertura do biofilme formado e da média do diâmetro das células foram calculados pelo *Software imageJ* e pela média aritmética do diâmetro de dez células para cada grupo experimental, sendo os diâmetros fornecidos pelo equipamento SEM-FEG ZEISS AURIGA[®] 40.

3.6.6 Atividade Antibacteriana *in vivo*

Para avaliação da atividade antibacteriana *in vivo* de StigA8 e StigA18, foi realizado o modelo experimental descrito no item 3.5.3, com algumas modificações. Foram utilizadas larvas de *Galleria mellonella* e como bactéria infectante, o isolado de *S. aureus* multirresistente UFPEDA 1058. Cada grupo experimental apresentava 20 larvas e foram divididos de acordo com o tratamento recebido como mostra a tabela 5 a seguir:

Tabela 5 - Esquema de tratamento das larvas *Galleria mellonella* para avaliação da atividade antibacteriana de StigA8 e StigA18

Grupos experimentais com larvas de <i>Galleria mellonella</i>							
	Controle positivo de infecção	Controle negativo de infecção	StigA8	StigA18	StigA8	StigA18	Vancomicina
<i>S. aureus</i> (1058)	3,0 x 10 ⁸ UFC/mL	PBS	3,0 x 10 ⁸ UFC/mL				
Tratamento	PBS	PBS	40 mg/kg	40 mg/kg	120 mg/kg	120 mg/kg	12 mg/kg

Grupo experimental com 20 indivíduos (n=20). Fonte: autoria própria.

A suspensão bacteriana foi preparada de acordo com a escala 1,0 de *McFarland* em água ultrapura autoclavada, correspondente a 3,0x10⁸ UFC/mL. Em seguida, uma alíquota do inóculo foi retirada para leitura em espectrofotômetro a 625 nm, a qual deveria estar a 0,280. Os grupos experimentais a serem infectados, receberam 10 µL deste inóculo, injetado com uma seringa Hamilton de 50 µL na última protopata esquerda da larva. Após 30 minutos da aplicação, as larvas receberam 10 µL dos respectivos tratamentos, StigA8 e StigA18 (40 mg/kg ou 120 mg/kg) ou vancomicina (12 mg/kg), injetados na última protopata direita. As larvas que não receberam inóculo bacteriano (controle negativo de infecção), foram injetadas com 10 µL de PBS na última protopata esquerda e mesmo volume na protopata direita.

As larvas após os tratamentos, foram mantidas em estufa a 37°C por 7 dias, e o número de larvas mortas foi registrado a cada dia de observação. Foram consideradas mortas, as larvas que não apresentaram movimento em resposta ao toque, bem como, observadas mudanças de coloração (de amarelo-milho para esbranquiçada ou amarronzada) e melanização do corpo (pontuais ou uniformes).

3.7 Atividade Antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*

3.7.1 Cultivo do Parasita

Os protozoários *Trypanosoma cruzi* Y foram obtidos através do Laboratório de Imunoparasitologia da UFRN. As formas epimastigotas foram obtidas incubando os parasitas durante 11 dias a 27 ± 2 °C em meio de Triptose de infusão de fígado (LIT), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10%. Para obtenção das formas tripomastigotas, os parasitas foram incubados no meio LIT (sem a presença do SBF a 10%) a 27 ± 2°C.

3.7.2 Atividade Tripanocida

A atividade tripanocida das formas epimastigotas e tripomastigotas foram avaliadas pelo método descrito por Ciccareli e colaboradores (2012) com modificações. 200 µL das formas epimastigotas (1×10^7 parasitas/mL) e tripomastigotas (1×10^6 parasitas/mL) em meio LIT, foram incubadas em placas de 96 poços com 20 µL de StigA8 e StigA18 para concentrações finais de 25-1,56 µM a $27^\circ\text{C} \pm 2$ por 24 h. Após esse período, uma alíquota de 10 µL de cada poço foi retirada para a contagem de parasitas em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico no aumento de 40 x (Nikon ECLIPSE E200®). Os resultados foram expressos em número de parasitas $\times 10^4$ /mL. Foi considerado como controle positivo de crescimento parasitário (100% de viabilidade), os parasitas incubados apenas com meio LIT. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e o ensaio em duplicata. A porcentagem de inibição de crescimento celular foi determinada a partir da equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição de crescimento celular} = \frac{(\text{NP}_T) \times 100 - 100}{(\text{MNP}_{\text{Ctrl}})}$$

Em que: NP_T = Número de parasitas vivos do teste, MNP_{Ctrl} = Média do número de parasitas vivos do controle positivo.

3.8 Atividade Antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos peptídeos análogos StiA8 e StigA18 foram avaliadas utilizando o método de redução do MTT (MOSMANN, 1983) como descrito no item 3.6.2, com algumas modificações. Linhagens de células de melanoma murino (B16-F10, ATCC CRL6475) em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e células de adenocarcinoma renal humano (786-0, ATCC, CRL-1932), em meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%, foram cultivadas até a confluência, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Em uma placa de 96 poços, 100 µL da suspensão de células (5×10^3 células/mL) nas condições citadas anteriormente foi incubada por 24 h. Após essa etapa, o meio foi substituído por 100 µL de DMEM ou RPMI 1640 na ausência de SBF e as células incubadas por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído por 90 µL do meio DMEM ou RPMI 1640 suplementado com SBF 10% e 10 µL dos peptídeos análogos em diferentes concentrações em água ultra-pura (40-2 µM), sendo as células incubadas por 24 h a 37°C e atmosfera a 5% de CO_2 . Após a incubação, o meio foi substituído por 100 µL da solução de MTT (1 mg/mL) e a placa incubada novamente a 37°C por 4 h em

atmosfera a 5% de CO₂. Decorrido o tempo, a solução do MTT em cada poço foi substituída por 100 µL de álcool etílico a 96% e a placa mantida a temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação, para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada no leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) em 570 nm. As linhagens celulares incubadas com DMEM ou RPMI 1640 suplementado com SBF a 10% na ausência dos peptídeos, foram utilizadas como controle positivo de viabilidade celular. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e o ensaio em duplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada como descrito no item 3.5.2 deste documento.

3.9 Análises Estatísticas

Os ensaios foram realizados em no mínimo duplicata e as análises no mínimo em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o ANOVA *one way*, seguido do teste de *Turkey* para comparações múltiplas, utilizando o *software GraphPad Prism* versão 7.0 (San Diego, EUA). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para os ensaios de toxicidade e atividade antibacteriana *in vivo*, os experimentos foram realizados em duplicata e para as análises estatísticas foi utilizado o método de Survival Curve, seguido do teste de *Log-rank* (Mantel-Cox), pelo *software GraphPad Prism* versão 7.0 (San Diego, EUA). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características Físico-Químicas de StigA8 e StigA18

A partir do depósito de patente dos peptídeos análogos da Stigmurina, StigA8 e StigA18 foram selecionados de acordo com a predição da estrutura secundária, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e carga superficial líquida, obtidos através dos servidores HeliQuest e PORTER (Tabela 6). Foram realizadas substituições pontuais na sequência primária da Stigmurina, por resíduos de lisina (K). Em StigA8 foram realizadas duas substituições (posições 7 e 11 da sequência primária) e em StigA18 três substituições (posições 7, 11 e 14 da sequência primária).

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas e estruturais de Stigmurina, StigA8 e StigA18.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Estrutura Secundária	μ H	HID	Z	M.M
Stig	FFSLIPSLVGGLISAFK-NH ₂	CCCCCHHHHHHHHHHHHC	0,57	0,89	+2	1795.20
StigA8	FFSLIPKLVGKLIKISAFK-NH ₂	CCCHHHHHHHHHHHHCC	0,65	0,78	+4	1907.42
StigA18	FFSLIPKLVGKLIKAFK-NH ₂	CCCHHHHHHHHHHHHHHC	0,70	0,72	+5	1948.51

Stig (Stigmurina); μ H (momento hidrofóbico); HID (hidrofobicidade); Z (carga superficial líquida); M.M (massa molecular em Daltons confirmada por laudo de espectrometria de massas fornecida pela empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento; C (estrutura randômica) e H (estrutura helicoidal). *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Como resultado da predição físico-química e estrutural de StigA8 e StigA18, foi observado que as modificações pela substituição por resíduos de lisina (K) na sequência primária da Stigmurina, promoveram um aumento da conformação em α -hélice (representada pela letra H) e diminuição da formação de estrutura randômica (representada pela letra C), bem como, o aumento da carga superficial líquida positiva e momento hidrofóbico em relação a Stigmurina. No entanto, a hidrofobicidade foi reduzida em decorrência da substituição dos resíduos de lisina. Segundo a literatura, o aumento dessas propriedades físico-químicas e estruturais em peptídeos antimicrobianos, favorece uma melhor ação em diferentes microrganismos como bactérias, vírus e protozoários (LUNA-RAMÍREZ et al., 2014; PINTO et al., 2014; YAN et al., 2011) e células de cancerígenas (ZHANG; YANG; ERICSSON, 2019).

No estudo realizado por Pedron e colaboradores (2019), foram realizadas substituições pontuais de diferentes aminoácidos por lisina, no peptídeo antimicrobiano VmCT1 (FLGALWNVAKSVF-NH₂) do escorpião *V. mexicanus*. A carga superficial de +2 e momento hidrofóbico de 0,58 desse peptídeo passaram para +3 a +5 e 0,68-0,72, respectivamente, para os diferentes análogos obtidos, resultando em atividade antibacteriana

mais efetiva em bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como, em células cancerígenas de mama (MCF-7), quando comparado a molécula protótipo.

Embora a hidrofobicidade tenha diminuído entre os análogos quando comparada a Stigmurina, este fator pode não ser um limitante da ação da atividade antimicrobiana. Pelo contrário, quando em maiores quantidades, pode favorecer as interações hidrofóbicas e eletrostáticas intermoleculares, e gerar agregação entre as moléculas de peptídeo e consequentemente, menor interação com as membranas e menor atividade (ZOU et al., 2018). No estudo realizado por Amorim-Carmo e colaboradores (2019), foi observado que peptídeos análogos da Stigmurina, StigA25 (FFSLIPSLVKKLIKAFK-NH₂) e StigA31 (FFKLIPKLVKKLIKAFK-NH₂), apesar de apresentarem menor hidrofobicidade (0,73, 0,61, respectivamente) em relação a molécula protótipo, apresentaram um espectro de ação maior frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, indicando que o aumento das cargas positivas e momento hidrofóbico estão mais relacionados com a maior atividade desses peptídeos.

4.2 Modelagem Molecular de StigA8 e StigA18

Na modelagem *in silico* dos peptídeos análogos, os modelos gerados pelo AIDA foram validados pela plataforma *Molprobit*, para avaliação dos resíduos que encontram-se nas regiões energeticamente mais favoráveis ou desfavoráveis para formação da estrutura secundária (CHEN et al., 2010). Os dados obtidos estão dispostos na tabela 7:

Tabela 7 - Validação dos modelos de estrutura secundária de StigA8 e StigA18.

Peptídeos	Ramachandran permitido	Ramachandran favorável	Ângulos impróprios	MolProbity Score
StigA8	15/15	14/15	3/185	0,93
StigA18	15/15	15/15	3/188	0,5

Validação gerada pelo software Molprobity. Fonte: autoria própria.

Os valores de Ramachandran permitido e favorável, indicam o número de aminoácidos dos peptídeos que estão em regiões permitidas e favoráveis, respectivamente, para a conformação estrutural dos modelos gerados de StigA8 e StigA18. Os valores de ângulos impróprios, indicam o número de aminoácidos que não conseguem adquirir os ângulos de torção mais favoráveis para formar a estrutura secundária (CHEN et al., 2010). Nesse último caso, provavelmente é pela presença do resíduo de prolina na sequência primária, em que sua cadeia lateral cíclica é covalentemente ligada ao átomo de nitrogênio da estrutura do aminoácido, dificultando a liberdade de torção da molécula (SONG; KANG, 2005). As

pontuações de MolProbity *score* representam a qualidade química geral dos modelos gerados, em que números mais baixos indicam melhores modelos (CHEN et al., 2010).

As estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 obtidas, evidenciam conformação majoritariamente em α -hélice (Figura 5A-I e 5B-I), com uma maior área de região hidrofóbica (escala de cor laranja) e menor região hidrofílica (escala de cor azul) para StigA8 em relação a StigA18 (Figura 5A-II e 5B-II).

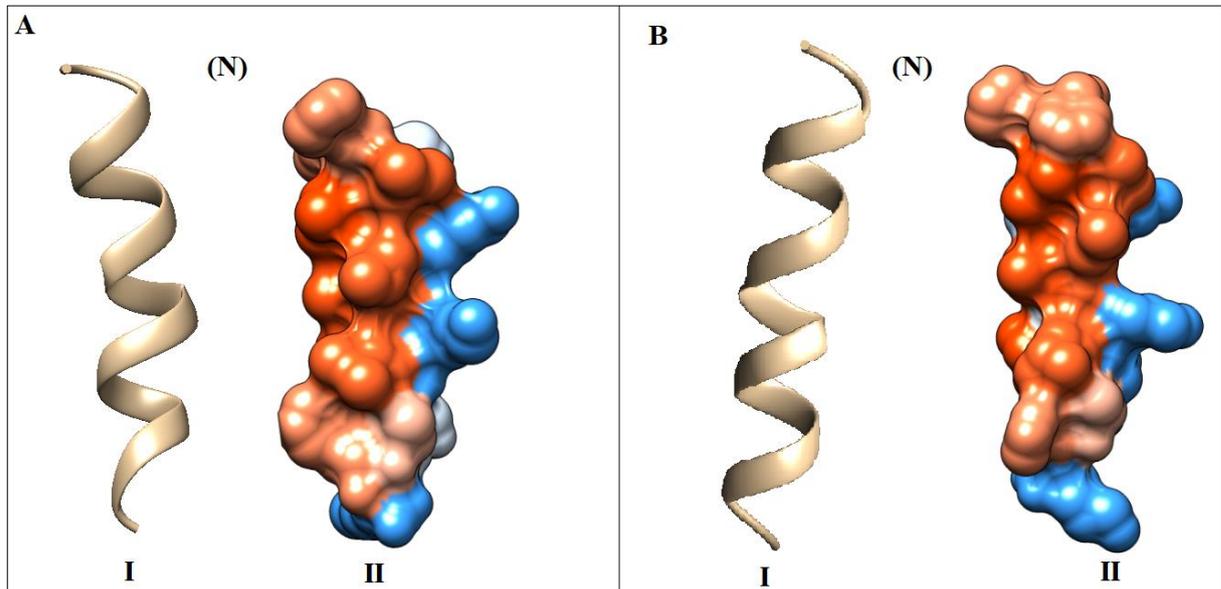


Figura 5 - Estrutura tridimensional teórica dos peptídeos análogos StigA8 e StigA18. Foi utilizado para visualizar a estrutura tridimensional teórica o *software* UCSF Chimera 1.8.1 para StigA8 (A) e StigA18 (B). (N) - região N-terminal do peptídeo. A escala de cores representa as regiões hidrofóbicas (laranja) e hidrofílica (azul) dos peptídeos. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Portanto, diante desses resultados obtidos, StigA8 e StigA18 se apresentam como peptídeos α -helicoidais e que devido a sua anfipaticidade podem ser avaliados em solventes que sejam parcialmente apolares como solventes orgânicos e micelas anfipáticas (SANI; SEPAROVIC, 2016; SANTO; IRUDAYAM; BERKOWITZ, 2013).

Assim, apesar dessa correlação entre maior cationicidade, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, bem como, as possibilidades de formação de determinada estrutura secundária serem levados em consideração para prever determinada atividade biológica e conformação estrutural de uma molécula, é fundamental a confirmação experimental dessas previsões. Para tanto, estudos *in vitro* mais refinados de caracterização estrutural, bem como, avaliação das atividades biológicas devem ser realizados.

Por exemplo, o dicroísmo circular, que consiste em uma técnica espectroscópica muito utilizada para a avaliação da estrutura secundária e estabilidade de proteínas de forma experimental em diferentes composições de solução e sob uma ampla faixa de temperatura e pH. Utiliza-se da diferença de absorção da luz polarizada no sentido horário e anti-horário que

passa pela molécula, em diferentes comprimentos de onda, sendo a faixa de 180-260 nm a mais utilizada para análise com proteínas (KELLY; JESS; PRICE, 2005; ZHONG; JOHNSON, 1992).

Sendo assim, esta técnica foi utilizada para avaliação da estrutura secundária e estabilidade de StigA8 e StigA18 obtidas comercialmente pela empresa *AminoTech* Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil).

4.3 Conformação Estrutural e Estabilidade de StigA8 e StigA18

4.3.1 Influência do Meio sobre StigA8 e StigA18

Ao serem analisados, foi observado que os espectros obtidos por Dicroísmo Circular (DC) de StigA8 e StigA18 apresentaram uma modificação da estrutura secundária quando presentes em soluções aquosas, como água e PBS, e em solventes orgânicos que simulam ambientes de membrana celular, como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e o álcool 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) (SIKORSKA et al., 2009; ZHU et al., 2015).

Em água e em PBS (Figura 6A e 6B) os peptídeos apresentaram-se com características estruturais desordenadas, devido à presença no espectro de um vale perpendicular ao eixo x, em aproximadamente 200 nm. Porém, na presença de SDS 20 mM e TFE em concentrações crescentes (20-70%), StigA8 e StigA18 apresentaram-se com espectros característicos de estrutura helicoidal, devido à presença de um pico perpendicular ao eixo x em 190 nm e um vale, paralelo ao eixo x, entre 208 e 222 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

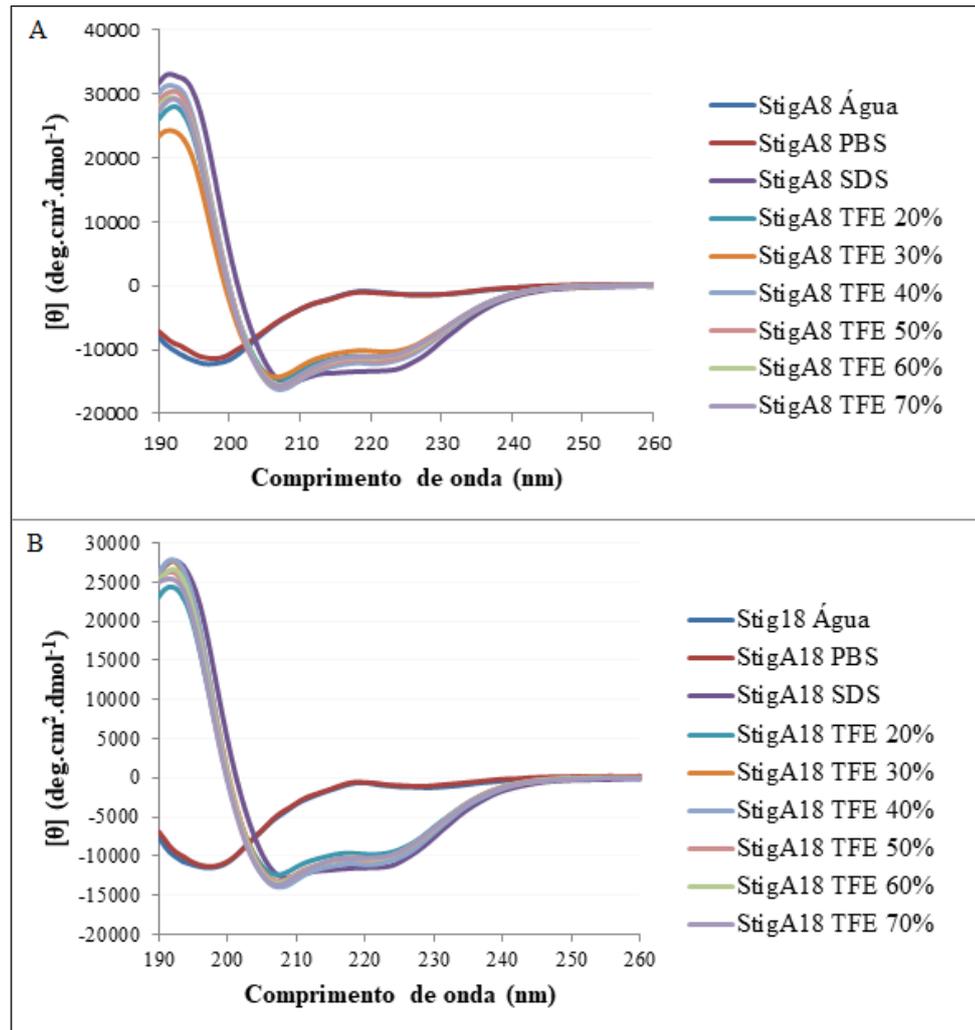


Figura 6 - Estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliadas por dicroísmo circular. Espectros de StigA8 (A) e StigA18 (B) em água, PBS, SDS 20 mM e TFE (20-70%). As análises foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-810 a 25° C. Os dados foram registrados em comprimentos de onda de 190-260 nm a uma velocidade de 50 nm. min⁻¹. As cores das linhas das legendas acompanham respectivamente, as cores das linhas da área de plotagem do gráfico. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Através da deconvolução dos dados de elipticidade molar, a partir dos espectros gerados por DC, foi obtido o percentual de estrutura secundária nas diferentes soluções em que StigA8 e StigA18 foram analisados (Tabela 8). Nos meios aquosos, os peptídeos apresentaram estruturas randômicas em mais de 70%, enquanto que nas soluções de SDS e TFE (20-70%), ambos os peptídeos apresentaram porcentagem de α -hélice maior que 42%, sendo o meio SDS mais propício a formação dessa estrutura, apresentando 52% e 45% de α -hélice (diferente da predição estrutural em que StigA18 apresentou mais conformação helicoidal para StigA8 e StigA18, respectivamente. Não houve diferença significativa de aumento de conformação helicoidal entre as diferentes concentrações de TFE.

Essa maior estruturação dos peptídeos em SDS, pode ter acontecido devido a capacidade desse detergente aniônico em tender a formar micelas acima da sua concentração micelar crítica (4 mM), simulando um ambiente anfífilo semelhante a membranas biológicas

(a porção hidrofóbica voltada para o interior da micela e a porção hidrofílica negativa voltada para a superfície da micela) (SIKORSKA et al., 2009; ZHU et al., 2015). Dessa forma, é possível que as cargas positivas dos peptídeos ao realizarem as interações eletrostáticas com as cargas negativas do SDS e as interações hidrofóbicas com a região mais hidrofóbica das micelas, tenham se conformado melhor em α -hélice.

Tabela 8 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes meios.

Solvente	StigA8			StigA18		
	% α -hélice	% β -folha	% Randômica	% α -hélice	% β -folha	% Randômica
Água	2	23	75	3	22	75
PBS	2	23	75	3	27	70
SDS	52	12	36	45	16	39
TFE 20%	47	14	39	42	15	43
TFE 30%	45	16	39	43	15	42
TFE 40%	50	12	38	45	14	41
TFE 50%	48	13	39	43	15	42
TFE 60%	48	16	36	43	15	42
TFE 70%	48	17	35	43	15	42

Percentual da estrutura secundária de StigA8 e StigA18 obtida a partir da deconvolução dos espectros de dicroísmo circular. Os dados são expressos como percentual de estrutura secundária obtidos pelo algoritmo CDSSTR. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Como o maior percentual de estrutura secundária foi em SDS 20 mM, este foi utilizado para os experimentos de estabilidade de StigA8 e StigA18 frente a variações de temperatura e pH.

4.3.2 Influência do pH sobre StigA8 e StigA18

Os espectros de DC de StigA8 e StigA18 foram obtidos em diferentes condições de pH, sendo observados perfis semelhantes na ampla faixa de pH (3,0-9,0) avaliada para ambos os peptídeos. Comparativamente, StigA8 e StigA18, nos diferentes pH testados, continuaram a apresentar estrutura helicoidal (Figura 7), devido à presença de um pico perpendicular ao eixo x em 190 nm e um vale, paralelo ao eixo x entre 208 e 222 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

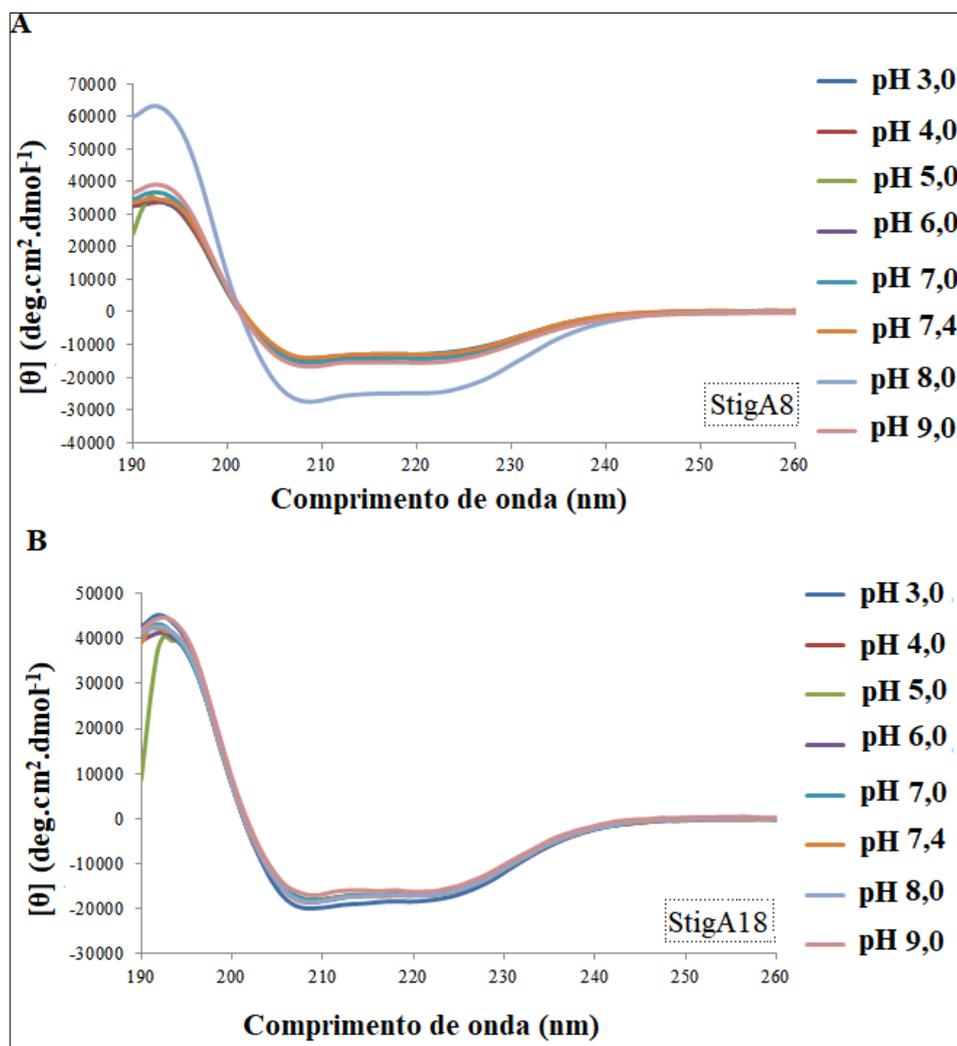


Figura 7 - Influência da variação de pH sobre as estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliadas por dicroísmo circular. Espectros de StigA8 (A) e StigA18 (B) em SDS 20 mM, submetidos a pH de 3-9. As análises foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-810 e os dados foram registrados em comprimentos de onda de 190-260 nm a uma velocidade de 50 nm. min⁻¹. As cores das linhas das legendas acompanham respectivamente, as cores das linhas da área de plotagem do gráfico. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Pela deconvolução dos dados de elipticidade molar de StigA8 e StigA18, obtiveram-se os percentuais de estrutura secundária dessas moléculas (Tabela 9) que mantiveram a estrutura helicoidal em torno de 50-60% em todos os pH testados, exceto no pH 8, em que os percentuais aumentaram consideravelmente para StigA8, o qual estruturou-se em mais de 90% em α -hélice. Sendo assim, tanto StigA8 quanto StigA18 apresentaram estabilidade frente a uma ampla faixa de pH, mantendo sua conformação helicoidal.

Tabela 9 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes pH.

pH	StigA8			StigA18		
	% α -hélice	% β -folha	% Randômica	% α -hélice	% β -folha	% Randômica
3,0	50	12	38	58	8	33
4,0	51	12	38	52	12	35
5,0	56	14	30	61	21	18
6,0	53	11	36	54	9	34
7,0	54	12	33	53	12	35
8,0	91	2	7	54	7	38
9,0	58	9	32	56	11	32

Percentual da estrutura secundária de StigA8 e StigA18 obtida a partir da deconvolução dos espectros de dicroísmo circular. Os dados são expressos como percentual de estrutura secundária obtido no algoritmo CDSSTR. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

De fato, a mudança de pH do meio pode ser um dos fatores determinantes para modificar a estrutura secundária de peptídeos, por alterar as interações entre os resíduos de aminoácidos e os ângulos de ligações dos mesmos, o que afeta diretamente a interação com o meio que o peptídeo está inserido e conformação estrutural (MIHAILESCU et al., 2019). Desse ponto de vista, StigA8 e StigA18 tornam-se moléculas bastante convenientes no desenvolvimento de um futuro medicamento antimicrobiano, podendo ser empregados em diferentes sítios de infecções (estomacais, intestinais, dermatológicas, dentre outras) (VAHDATPOUR et al., 2016).

4.3.3 Influência da Temperatura sobre StigA8 e StigA18

A estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em SDS ainda foram avaliadas em condições extremas de temperatura. Inicialmente, os peptídeos foram aquecidos gradualmente de 2 até 98°C e posteriormente arrefecidos de 98 a 2°C. Os espectros indicam uma pequena perda estrutural de StigA8 e StigA18 quando aquecidos, uma vez que ocorre uma aproximação com o “eixo 0” (paralelo ao eixo x), que indicam perda da estrutura. No entanto, essa perda não interferiu na conformação helicoidal geral apresentada por estas moléculas (Figura 8A e 8B). Este efeito é melhor observado quando analisado os dados da porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 nas diferentes temperaturas (Tabela 10), os quais percebe-se a perda discreta de estrutura de α -hélice em condições extremas de temperatura (a partir de 75°C).

Ao analisarmos a elipticidade molar de forma pontual (222 nm), percebemos que esta deslocou-se gradualmente em direção a zero quando os peptídeos eram aquecidos, indicando uma perda da estrutura, porém ao serem submetidos ao processo de resfriamento, a

elipticidade voltou quase ao seu estado anterior ao aquecimento (Figura 8C, 8D e Tabela 11), indicando que StigA8 e StigA18 apresentam capacidade de renaturação mesmo quando submetidos a uma ampla faixa de temperatura.

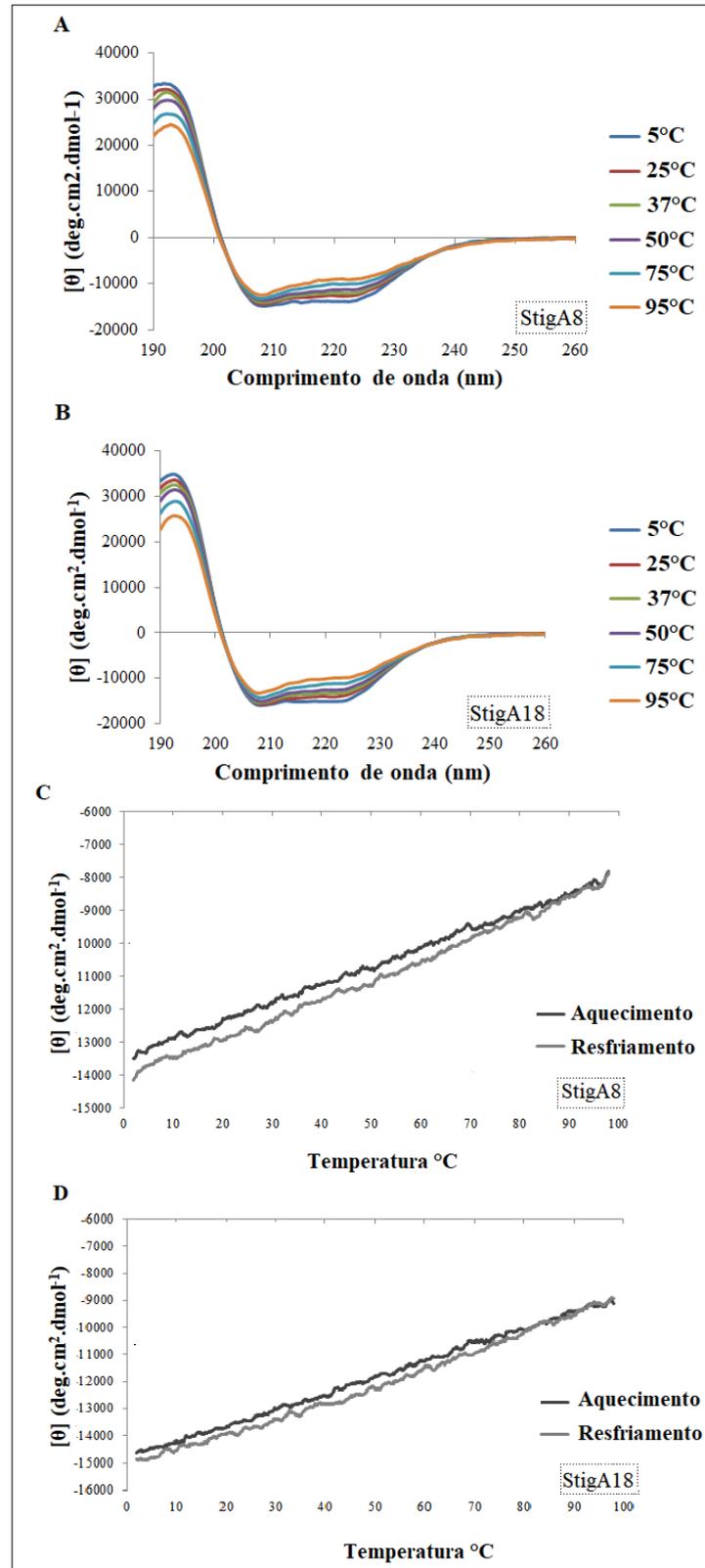


Figura 8 - Influência da variação de temperatura sobre as estruturas secundárias de StigA8 e StigA18 avaliada por dicroísmo circular. Espectros de estrutura secundária de StigA8 (A) e StigA18 (B) em SDS 20 mM em 5, 25, 37, 50, 75 e 95°C em comprimento de onda de 190-260 nm. Espectros de StigA8 (C) e StigA18 (D) em

SDS 20 mM, submetidos a aquecimento de 2-98°C (linha cinza escuro) e arrefecimento de 98-2°C (linha cinza claro) a 222 nm. As análises foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-810. Os dados foram registrados em comprimentos de onda de 190-260 nm a uma velocidade de 50 nm. min⁻¹. As cores das linhas das legendas acompanham respectivamente, as cores das linhas da área de plotagem do gráfico. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Tabela 10 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes temperaturas.

Temperatura °C	StigA8			StigA18		
	% α -hélice	% β -folha	% Randômica	% α -hélice	% β -folha	% Randômica
5	52	9	39	56	9	35
25	51	13	36	54	7	39
37	52	13	35	54	11	35
50	51	14	35	53	11	36
75	48	12	40	50	13	37
95	39	19	42	47	14	39

Percentual da estrutura secundária de StigA8 e StigA18 obtida a partir da deconvolução dos espectros de dicroísmo circular em comprimento de onda variável (190-260nm). Os dados são expressos como percentual de estrutura secundária obtido no algoritmo CDSSTR. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Tabela 11 – Porcentagem de estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em comprimento de onda fixo.

Temperatura (°C)	StigA8			StigA18		
	α -hélice (%)	β -folha (%)	Randômica (%)	α -hélice (%)	β -folha (%)	Randômica (%)
Antes de aquecer	51	9	39	55	8	36
Depois de aquecer	50	11	38	54	9	35

Percentual da estrutura secundária de StigA8 e StigA18 obtida a partir da deconvolução dos espectros de dicroísmo circular em comprimento de onda fixo (222 nm), antes do aquecimento e pós aquecimento dos peptídeos. Os dados são expressos como percentual de estrutura secundária obtido no algoritmo CDSSTR. *Fonte: dados obtidos e analisados.*

Ao analisar o conjunto dos dados apresentados pela técnica de dicroísmo circular, StigA8 e StigA18 apresentaram flexibilidade conformacional a depender do meio em que estava presente, com tendência a formação de estrutura helicoidal em ambientes apolares (TFE) e anfipáticos (SDS), bem como, estabilidade em condições extremas de pH e temperatura com capacidade de renaturação após aquecimento e arrefecimento. Tais características foram observadas em outros peptídeos do escorpião *T. stigmurus*, como a Stigmurina (e seus análogos StigA6, StigA16, StigA25 e StigA31) (AMORIM-CARMO et al., 2019) e o TsAP-2, peptídeo antimicrobiano com sequência similar a Stigmurina (DANIELE-SILVA et al., 2016).

Peptídeos com flexibilidade conformacional em diferentes meios também foram observados em outras espécies de escorpiões como a Meucin 13 e Meucin-18 do escorpião

Mesobuthus eupeus (GAO et al., 2009), Pandinin-1 e Pandinin-2, do escorpião *Pandinus Imperator* (CORZO et al., 2001), UyCT1, UyCT2, UyCT3 e UyCT5 do *Urodacus yaschenkoi* (LUNA-RAMÍREZ et al., 2014).

De acordo com Daniele-Silva e colaboradores (2016), a sequência idêntica na posição C-terminal de Stigmurina e TsAP-2 (GLISAFK-NH₂) parece estar envolvida na estabilidade dessas moléculas frente a uma ampla faixa de temperatura e pH por dicroísmo circular, devido a um balanço entre o número de resíduos polares e apolares nessa região. No entanto, ao ser realizadas modificações nessa mesma região em StigA8 e StigA18 (substituindo aminoácidos glicina e serina, por lisina), não acarretou em mudanças expressivas de conformação da estrutura secundária dessas moléculas.

4.4 Biocompatibilidade de StigA8 e StigA18

Para avaliação da biocompatibilidade *in vitro* dos peptídeos análogos, foram realizados os ensaios de hemólise em eritrócitos humanos e viabilidade celular em células de fibroblastos murinos. Para avaliação preliminar de toxicidade *in vivo*, foram utilizadas larvas de mariposa de *G. mellonella*.

As hemácias foram incubadas com concentrações crescentes de StigA8 e StigA18 (1,17-150 µM). Stigmurina, além do PBS, também foi utilizada como parâmetro negativo de hemólise, haja vista que este peptídeo apresenta porcentagens de hemólise muito próximas a 0% até na maior concentração testada (150 µM) (AMORIM-CARMO et al., 2019; PARENTE et al., 2018).

Após 1 hora de incubação, os peptídeos análogos começaram a apresentar atividade hemolítica a partir da concentração de 9,17 µM, com 11,5% e 14% de hemólise para StigA8 e StigA18, respectivamente, até 15,17% e 22% na maior concentração testada (150 µM), para StigA8 e StigA18, respectivamente (Figura 9A). No entanto, essa atividade foi estatisticamente menor em relação ao controle positivo de hemólise (hemácia+água) e estatisticamente semelhante ao grupo de hemácias incubadas com PBS e Stigmurina nas diferentes concentrações ($p > 0,05$), exceto para a concentração de 150 µM de StigA18. Nas concentrações abaixo de 9,17 µM a porcentagem de hemólise foi quase nula tanto para StigA8 como para StigA18.

Dentre os peptídeos análogos da Stigmurina anteriormente estudados, StigA6 (FFSLIPKLVKGLISAFK-NH₂) e StigA16 (FFKLIPKLVKGLISAFK-NH₂) revelaram porcentagem de hemólise de 30% em 75 µM, para ambos os peptídeos, enquanto que StigA25 (FFSLIPSLVKKLIKAFK-NH₂) e StigA31 (FFKLIPKLVKKLIKAFK-NH₂), apresentaram

90% e 75% de hemólise, respectivamente, em 150 μ M (AMORIM-CARMO et al., 2019; PARENTE et al., 2018). Fazendo uma análise comparativa entre as modificações nas sequências primárias desses análogos, a substituição das glicinas da posição 10 e/ou 11 por lisina (K), parece estar intimamente relacionado com o aumento da hemólise dessas moléculas. Enquanto que a Stigmurina (FFSLIPSLVGGLISAFK-NH₂), apresenta baixíssimas porcentagens de hemólise e não tem nenhuma substituição nessas posições, o StigA25 e StigA31 que possuem a dupla substituição, revelaram maiores porcentagens de hemólise comparado aos outros análogos.

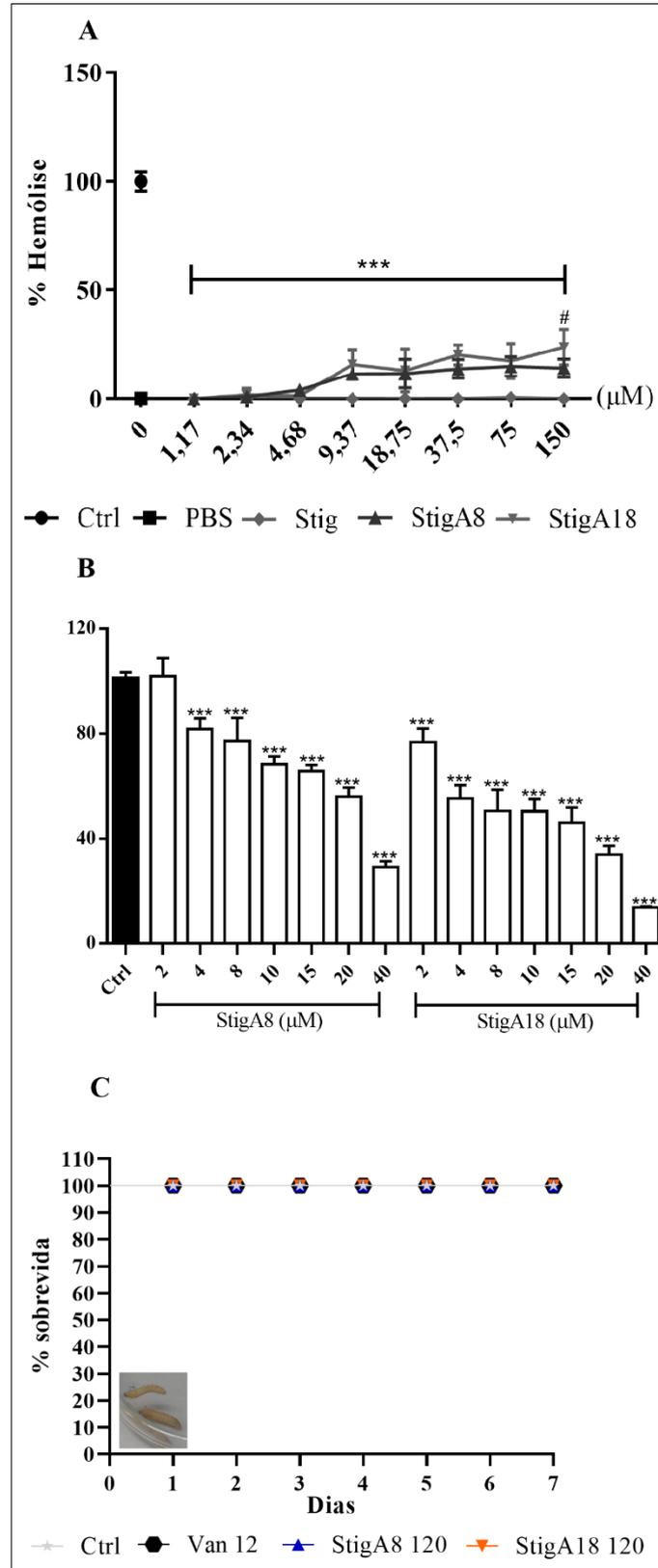


Figura 9 – Biocompatibilidade de StigA8 e StigA18. Citotoxicidade dos peptídeos em (A) hemácias, Ctrl (controle positivo considerado como 100% de hemólise); PBS (tampão fosfato salino considerado como 0% de hemólise); Stig (Stigmurina) e em (B) Linhagem de células não neoplásicas de fibroblasto murino (NIH/3T3), Ctrl (controle positivo de viabilidade celular). (C) Toxicidade *in vivo* de StigA8 e StigA18 em larvas da espécie *Galleria mellonella*, Ctrl (controle negativo de morte larval, considerado como 100% de sobrevivência); StigA8 120 e StigA18 120 (peptídeos análogos administrados na dose de 120 mg/kg); $n=20$. *** $p<0,001$, comparado ao grupo Ctrl; # $p<0,05$, comparado ao grupo PBS e Stigmurina. Fonte: dados obtidos e analisados.

Foi observado para os peptídeos TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK-NH₂) e TsAP-2 (FLGMIPGLIGGLISAFK-NH₂) identificados no escorpião *T. serrulatus*, ambos com carga +2, perfis diferentes de atividade hemolítica. TsAP-1 apresentou hemólise abaixo de 5% até na maior concentração testada (160 µM), enquanto que TsAP-2, apresentou essa baixa taxa de hemólise até a concentração de 15 µM, depois disso, a porcentagem de hemólise aumentou consideravelmente, chegando a 86% em 40 µM. Em contrapartida, os seus respectivos análogos TsAP-S1 (FLSLIPKLVKKIHKAFK-NH₂) e TsAP-S2 (FLGMIPKLIKLIKAFK-NH₂), ambos com carga +6, apresentaram alta atividade hemolítica a partir da concentração de 5 µM, com 28% de hemólise, chegando a 100% na concentração de 20 µM (GUO et al., 2013), demonstrando que a adição de lisina tem um papel importante no aumento da atividade hemolítica dos PAMs.

Apesar dos PAMs, apresentarem uma capacidade maior em perturbar a estabilidade ou lisar membranas de procaríotos, essa citotoxicidade em hemácias pode estar relacionada principalmente ao aumento da cationicidade desses análogos, tendo em vista que essas células apresentam componentes de caráter aniônico ligados ao glicocálix, como o ácido siálico (JANKOWSKI et al., 2019).

No estudo realizado por Bea e colaboradores (2015), foi considerado que o peptídeo análogo do BmKn1 (FIGAVAGLLSKIF-NH₂) do escorpião *Buthus martensii* Karsh, Bmkn1-6Lys (FIGAVKGLLSKIF-NH₂), que apresenta modificação por introdução da lisina em sua sequência, apresentou moderada atividade hemolítica (20%) até a concentração de 36 µM.

Na linhagem celular de fibroblastos murinos (NIH/3T3) (Figura 9B), ocorre uma resposta concentração-dependente dos peptídeos em relação a viabilidade celular. StigA8 reduziu a viabilidade celular para 81,6% na concentração de 4 µM, demonstrando baixa citotoxicidade nessa concentração, e 29,1% na concentração de 40 µM. Para StigA18, na concentração de 2 µM, a viabilidade foi de 76,8% e 33,2 % na maior concentração testada (40 µM), demonstrando um potencial citotóxico maior em relação a StigA8.

Estes dados de citotoxicidade, apontam as concentrações relativamente seguras para serem utilizadas nos diferentes ensaios posteriores do presente estudo, bem como a faixa de concentração de biocompatibilidade *in vitro* dessas moléculas.

Com relação a toxicidade *in vivo* de StigA8 e StigA18, foi realizada uma triagem em larvas de mariposa da espécie *G. mellonella* observando a sobrevivência dessas larvas ao longo de 7 dias (injeção única dos peptídeos no primeiro dia de teste), bem como, sinais de toxicidade pela mudança de coloração, melanização e capacidade de locomoção. Como se pode observar na Figura 9C, o grupo de larvas que recebeu apenas água (controle negativo de morte) não

houve morte de nenhum indivíduo em todo o período de observação. Semelhante efeito foi observado nos grupos que receberam os peptídeos StigA8 e StigA18 na dose de 120 mg/kg no mesmo período. Além disso, as larvas não apresentaram sinais de toxicidade, sendo ausentes mudanças de coloração (continuaram com coloração amarelada, semelhante a um grão de milho) e melanização (imagem inserida no gráfico da Figura 9C).

Devido as dificuldades apresentadas pelo uso de animais mamíferos para o estudo em modelos de toxicidade, patogênese e eficácia de moléculas para o tratamento de infecções, seja por implicações éticas, custos elevados dos experimentos e/ou manutenção dos animais, o uso de modelos em animais invertebrados vem tomando espaço na ciência, como por exemplo o uso de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, peixe *Danio rerio* e o nematoide *Caenorhabditis elegans* (CHIBEBE JUNIOR et al., 2013; DOUGLAS, 2019).

Nesse âmbito, pode-se destacar o uso das larvas da mariposa *Galleria mellonella*, as quais mostram ser uma alternativa positiva para fins de triagem, pois além de apresentarem baixo custo de manutenção, não necessitam de aprovação em comitê de ética para seu uso, bem como o estudo de toxicidade e interação patógeno-hospedeiro é favorecida e vem mostrando correlação positiva entre virulência microbiana em modelos utilizando mamíferos e as larvas dessa espécie (AL AKEEL et al., 2018; JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; JUNQUEIRA et al., 2011). Outras vantagens do uso dessas larvas, é a fácil inoculação de amostras e microrganismos, além de ser o único modelo animal alternativo que podem ser incubados em 37°C (CHIBEBE JUNIOR et al., 2013; PELEG et al., 2009).

Além disso, esses insetos possuem um sistema imune semelhante ao de mamíferos, pois apresentam resposta imune inata, pela presença de barreiras físicas como o corpo gorduroso e químicas, pela ação de lisozimas, além da presença dos hemócitos, que são as “células sanguíneas” e “leucocitárias” dessas larvas, presentes na hemolinfa, e que estão envolvidos em processos de fagocitose, coagulação e melanização (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2018). Um exemplo de aplicação dessas larvas para determinação da toxicidade de substâncias é o estudo realizado por Van der Meijden e colaboradores (2017), no qual foram utilizadas larvas de *G. mellonella* para avaliar a toxicidade da peçonha de dez espécies de escorpiões.

Sendo assim, diante dos resultados apresentados, StigA8 e StigA18 apontam para uma baixa toxicidade nesses organismos, demonstrando a potencial aplicação no desenvolvimento de medicamentos. No entanto, para melhor a avaliar essa toxicidade, estudos com animais mais complexos como camundongos ou ratos, são importantes para serem avaliados os sinais de toxicidade em tecidos e órgãos.

4.5 Atividade Antibacteriana de StigA8 e StigA18

4.5.1 Espectro de Ação de StigA8 e StigA18

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Stigmurina, StigA8 e StigA18, foi obtida pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015) e descrita na Tabela 12.

Tabela 12- Determinação da CIM e CBM dos peptídeos Stigmurina, StigA8 e StigA18 frente a cepas gram-positivas e gram-negativas de referência.

Peptídeos/Cepas	CIM/CBM (μM)			
	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Stigmurina	9,37/9,37	9,37/9,37	>150/>150	>150/>150
StigA8	2,34/9,37	1,17/2,34	2,34/2,34	4,68/4,68
StigA18	2,34/18,75	1,17/4,68	2,34/4,68	9,37/18,75

CIM (Concentração Inibitória Mínima); CBM (Concentração Bactericida Mínima). Cada experimento foi realizado em duplicata e a análise em quadruplicata. *Fonte: Dados obtidos e analisados.*

Tomando por base um *cut off* de CIM de 10 μM , pode se observar que todos os peptídeos apresentaram atividade antibacteriana para todas as cepas testadas, exceto Stigmurina que não apresentou ação contra espécies de bactérias gram-negativas até a concentração de 150 μM . Esses resultados corroboram com os dados apresentados por Melo e colaboradores (2015), os quais demonstraram que a Stigmurina não apresentou ação em cepas ATCC de *E. coli* até a concentração de 139 μM . Em contrapartida, os peptídeos análogos apresentaram atividade contra cepas de *Staphylococcus* ssp. com CIM menor que a Stigmurina e ainda ampliou o espectro de ação para *E. coli* e *P.aeruginosa*.

StigA8 e StigA18 tiveram uma CIM 4 vezes menor para *S. aureus* e 8 vezes menor para *S. epidermidis*, quando comparadas com a Stigmurina. Para as bactérias gram-negativas a atividade foi bem mais pronunciada para os peptídeos análogos, já que a Stigmurina não apresentou atividade para as cepas de bactérias gram-negativas até a concentração de 150 μM . Esses resultados demonstram que as modificações na sequência primária e conseqüentemente em parâmetros como carga superficial e momento hidrofóbico promovidas na Stigmurina, resultaram em uma melhor ação antibacteriana por parte dos análogos obtidos, evidenciando que tais fatores estão envolvidos diretamente com uma melhor interação peptídeo-bactéria.

Outros peptídeos nativos oriundos de escorpiões do gênero *Tityus*, como o *T. serrulatus*, também apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas,

porém não apresentaram para bactérias gram-negativas. O TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK-NH₂) apresentou baixa atividade antibacteriana contra *S. aureus* (NCTC 10788) com CIM de 120 µM enquanto TsAP-2 (FLGMIPGLIGGLISAFK-NH₂) apresentou CIM de 5 µM para esta mesma cepa. Os autores relatam que essa diferença na atividade pode estar relacionada aos parâmetros físico-químicos desses peptídeos, como o momento hidrofóbico (0,43 µH e 0,51 µH para TsAP-1 e TsAP-2, respectivamente) e o percentual de α-hélice (58,82% e 76,47% para TsAP-1 e TsAP-2, respectivamente), o que reflete na melhor interação do TsAP-2 com as membranas bacteriológicas, embora apresentem mesma carga superficial (+2) (GUO et al., 2013).

Contrariamente, o seu análogo (TsAP-S1), o qual foi obtido por substituições pontuais de serina e glicina por lisina, teve, além do momento hidrofóbico (88% em média), sua carga superficial aumentada (+6), o que refletiu diretamente na melhor atividade antibacteriana para cepas de *S. aureus* (CIM de 120 µM, para 5 µM). Porém, com o aumento da atividade antibacteriana, ocorreu o aumento da atividade hemolítica, como foi relatado anteriormente por Guo e colaboradores (2013), o que mostra um dos grandes desafios do desenho racional de análogos de peptídeos antimicrobianos, obter um equilíbrio entre os resíduos de aminoácidos que promovam o melhoramento da atividade antibacteriana sem causar aumento da toxicidade da molécula (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

De acordo com LV e colaboradores (2019), que avaliaram a atividade de compostos oriundos da peçonha do escorpião *Buthus martensii* Karsch, quando a razão entre CBM e CIM for menor ou igual a 2 ($CBM/CIM \leq 2$), indica uma possível ação bactericida da amostra, quando $CBM/CIM \geq 4$ indica uma possível ação bacteriostática e quando $CBM/CIM \geq 32$, indica que o microrganismo é tolerante a molécula a qual está sendo testada.

Na tabela 12 os valores de CBM revelam que a ação dos peptídeos sobre as bactérias parece ser variável, a depender da espécie. Para StigA8 e StigA18, as CBMs encontradas para *S. aureus*, foi igual ou superior a 4 vezes a CIM e igual ou superior a 8, respectivamente, caracterizando uma possível ação bacteriostática nessa concentração. Já para *S. epidermidis* StigA8 apresentou uma atividade igual a 2 vezes a CIM, indicando uma possível ação bactericida e StigA18 uma possível ação bacteriostática, já que apresentou CBM 4 vezes a CIM. Em relação as cepas gram-negativas, a razão entre a CBM e a CIM variou entre 1-2, indicando a possível ação bactericida. Os microrganismos apresentaram-se sensíveis aos medicamentos de referência utilizados (vancomicina 0,15 µM e gentamicina 0,62 µM) com CIM igual a CBM, indicando a ação bactericida dessas amostras (dados não mostrados na tabela).

Foi observado que os peptídeos análogos, para as cepas de *Staphylococcus* ssp., perdeu a capacidade bactericida apresentada pela Stigmurina. Essa perda, pode decorrer do fato que a menor concentração apresentada na CIM, em relação a Stigmurina (que foi de 9,37 μM), não seja capaz de matar o microrganismo, mas de impedir o seu crescimento no meio. É possível que na concentração de 2,34 μM , os peptídeos não tenham a capacidade de se agrupar de modo a promover algum mecanismo de formação de poro na membrana, mas apenas de causar perturbação na parede celular, impedindo o crescimento do microrganismo. Mesmo assim, os peptídeos análogos apresentaram melhor atividade, pois a CIM foi diminuída.

Como mencionando anteriormente, muitos PAMs originados dos venenos de escorpiões, tem a capacidade de interagir com as membranas de bactérias. Porém, antes dos PAMs poderem interagir com essas membranas, eles precisam primeiro atravessar a parede celular, no caso das bactérias gram-positivas, e a membrana externa das bactérias gram-negativas. Por isso, acredita-se que inicialmente ocorre uma interação eletrostática com os componentes aniônicos dessas camadas mais externas das bactérias, como ácido tecóico e lipotecóico (bactérias gram-positivas) e o LPS (bactérias gram-negativas) para posteriormente ocorrer o contato com as camadas mais internas por interações eletrostáticas com componentes aniônicos como fosfatidilglicerol e cardiolipina e interações hidrofóbicas com a bicamada fosfolipídica (HARRISON et al., 2016; SCHMIDT; YONGHONG; HOFFMANN, 2018; SWOBODA et al., 2010).

A presença de determinados aminoácidos em regiões específicas na sequência primária de PAMs, contribui para melhoria da atividade antimicrobiana e também na seletividade desses peptídeos. No estudo realizado por Baek e colaboradores (2016), foi demonstrado que o peptídeo α -helicoidal cecroporin-1 (com 31 aminoácidos, encontrado em nematoides do estômago de porcos) na sua porção C-terminal (Lys15 e Gly29), formou uma α -hélice bem definida quando em contato com LPS (resultados revelados por RMN). Nos ensaios de *docking* molecular, o Cecroporin-1 também interagiu eletrostaticamente com grupamentos acil da porção do lipídeo A do LPS. No artigo publicado por Jiang e colaboradores (2014), os autores relatam que a adição de resíduos lisina em regiões hidrofóbicas do peptídeo, o que eles chamam de “determinantes de especificidade”, podem promover além do melhoramento da atividade e do índice de seletividade, a diminuição da ação hemolítica dessas moléculas, o que foi observado para os peptídeos Piscidin 1 (isolado de peixe) e dermaseptina S4 (isolado de sapo).

Outros fatores como presença de resíduos que conferem flexibilidade aos PAMs (glicina, tirosina, arginina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamina, serina e lisina) ou

regiões de dobradiça (prolina), auxiliam na melhor inserção do peptídeo às membranas celulares e portanto maior interação destes com os microrganismos (LIU; FANG; WU, 2013). Para os PAMs com sequência aminoacídica curta e com alta anfipaticidade, quando na presença de resíduos hidrofóbicos alifáticos e aromáticos como a leucina e fenilalanina, respectivamente, podem favorecer a formação e estabilização da conformação em α -hélice ou ainda a ligação entre um peptídeo e outro (MONDAL et al., 2015). Por último, a amidação na extremidade C-terminal pode contribuir também para a estabilidade, proteção contra proteólise e interação com a membrana (BRINCKERHOFF et al., 1999; MURA et al., 2016).

Os resultados de dinâmica molecular da Stigmurina e de dois análogos, StigA25 e StigA31, frente a um arcabouço computacional que mimetiza uma membrana de bactéria gram-negativa, mostrou que os análogos apresentaram maior força de interação que a Stigmurina, provavelmente pela presença de maiores substituições de resíduos de aminoácidos por lisina (3 para StigA25 e 5 para StigA31) o que lhes conferem maior cationicidade (AMORIM-CARMO et al., 2019).

Diante do exposto, tanto StigA8 quanto StigA18, apresentam em sua estrutura primária diferentes aminoácidos que lhes conferem a possibilidade de atuar de maneira efetiva e seletiva em células bacterianas o que refletiu diretamente nos resultados de conformação e estabilidade estrutural, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana *in vitro*. De forma geral, foi demonstrado que as modificações pontuais apresentadas em StigA8 (FFSLIPKLVGKLI~~SA~~FK-NH₂) e StigA18 (FFSLIPKLVGKLI~~KA~~FK-NH₂) foram efetivas no intento de melhoramento da atividade antibacteriana em detrimento da molécula protótipo Stigmurina *in vitro*.

4.5.2 Ação de StigA8 e StigA18 em Cepas Multirresistentes de *S. aureus*

Tendo em vista que StigA8 e StigA18 apresentaram uma atividade frente a diferentes cepas de referência, o próximo passo foi testar essas moléculas frente a cepas clínicas resistentes a antibióticos. Os peptídeos foram avaliados quanto a atividade antibacteriana frente a diferentes cepas clínicas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos como ciprofloxacina, eritromicina, metilicina e oxacilina (Tabela 13).

Inicialmente, foram realizados os testes de triagem com Stigmurina, StigA8 e StigA18 frente a uma cepa *S. aureus* (UFPEDA 02) e uma cepa resistente (UFPEDA 1063) para avaliar como os peptídeos se comportavam em relação a esta atividade. Os análogos StigA8 e StigA18 apresentaram atividade superior, em média 8 vezes, em relação ao peptídeo nativo Stigmurina, no que diz respeito a CIM e CBM para a cepa UFPEDA 02. Para a cepa

UFPEDA 1063, a Stigmurina não apresentou atividade na maior concentração testada (30 μM). Diante disso, foi dado continuidade aos experimentos com as cepas multirresistentes, apenas com os peptídeos análogos.

Os resultados da Tabela 13 indicam que tanto StigA8 quanto StigA18, apresentaram atividade antibacteriana pronunciada para as diferentes cepas de *S. aureus* multirresistentes, com CIM entre 0,93 - 3,75 μM e CBM de 1,87 - 3,75 μM , havendo uma correlação direta entre essas concentrações (CBM é maior não mais que duas vezes a CIM, para a mesma cepa), evidenciando a provável atividade bactericida desses peptídeos para as cepas testadas (LV et al., 2019).

Além disso, pelo painel de 14 isolados clínicos os quais foram submetidos aos peptídeos análogos, estes parecem ter atividade semelhante, independente dos sítios de infecção que essas bactérias foram obtidas, local em que o paciente se encontrava (ambulatorial ou hospitalar) e os graus de capacidade de formar biofilme (Tabela 4). A vancomicina foi utilizada como controle de sensibilidade (dados não mostrados na tabela). A partir desses dados apresentados, os valores de IS foram estimados, os quais foram superior a 40, considerando o valor de $\text{CH}_{50} > 150 \mu\text{M}$ e o maior valor de CIM, demonstrando a potencial efetividade e seletividade desses peptídeos.

Tabela 13- Determinação da CIM e CBM dos peptídeos Stigmurina, StigA8 e StigA18 em cepas multirresistentes de *S. aureus*.

<i>Cepas S. aureus</i>	CIM/CBM (μM)		
	Stigmurina	StigA8	StigA18
(ATCC 002)	15/30	1,87/3,75	1,87/1,87
(UFPEDA 1063)	>30/>30	3,75/7,5	1,87/1,87
(UFPEDA 1040)	--	1,87/1,87	0,93/1,87
(UFPEDA 1041)	--	1,87/1,87	1,87/1,87
(UFPEDA 1042)	--	3,75/3,75	1,87/1,87
(UFPEDA 1044)	--	1,87/1,87	1,87/1,87
(UFPEDA 1045)	--	3,75/3,75	1,87/1,87
(UFPEDA 1046)	--	3,75/3,75	1,87/1,87
(UFPEDA 1048)	--	3,75/3,75	3,75/3,75
(UFPEDA 1049)	--	1,87/1,87	0,93/1,87

(UFPEDA 1051)	--	1,87/3,75	1,87/1,87
(UFPEDA 1053)	--	1,87/1,87	1,87/1,87
(UFPEDA 1055)	--	1,87/1,87	0,93/1,87
(UFPEDA 1057)	--	1,87/1,87	1,87/1,87
(UFPEDA 1058)	--	1,87/1,87	1,87/1,87

CIM (Concentração inibitória mínima); CBM (Concentração Bactericida Mínima); -- (o ensaio não foi realizado).
 Fonte: Dados obtidos e analisados. Cada experimento foi realizado em duplicata e cada amostra em quadruplicata.

A resistência aos antimicrobianos (RAMs) é uma problemática mundial que vem sendo discutida, principalmente nos últimos 20 anos, pelas equipes médicas e científicas. Apesar das diversas discussões de medidas de contenção, não foi possível impedir a disseminação das RAMs do ambiente hospitalar para as comunidades, com grande impacto clínico e econômico em diferentes países (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017). As infecções por *S. aureus* são multifatoriais, causadas pela produção de moléculas de adesão, de enzimas e toxinas, que podem ocorrer isoladamente ou ao mesmo tempo no organismo do hospedeiro. Dessa forma, quando uma infecção por uma cepa resistente se instala, o tratamento torna-se dificultado, levando a quadros de infecções de pele até casos mais graves como pneumonia, osteomielites, endocardites e meningites (GALAR et al., 2019; KIRKETERP-MOLLER et al., 2008; MARTÍNEZ-PULGARÍN et al., 2009; TONG et al., 2015).

A espécie *S. aureus* está na lista das bactérias “ESKAPE”, as quais no ambiente hospitalar vêm constantemente aumentando a resistência a múltiplos medicamentos, incluindo os de última escolha como a vancomicina, bem como, desenvolvendo novas estratégias de virulência (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017; MULANI et al., 2019). A principal estratégia de desenvolvimento de resistência aos PAMs pelas bactérias, é a modificação de seus componentes da parede celular para diminuir a carga líquida negativa dessas superfícies. Por exemplo, bactérias gram-positivas, ativam genes reguladores que ativam os transportadores ABC dessas bactérias, induzindo o efluxo dos antibióticos, bem como, o aumento da D-alanilação entre as pontes interpeptídicas que liga a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico na formação da parede de peptidoglicanos, dessa forma ocorre o espessamento da parede limitando a ação do PAM; além disso, a formação de biofilme e a ativação de proteases são fatores que limitam a ação dos PAMs (GUILHELMELLI et al., 2013; MOORMEIER; BAYLES, 2017).

Embora já tenham estudos envolvendo atividade antibacteriana de peptídeos análogos da Stigmurina (AMORIM-CARMO et al., 2019; PARENTE et al., 2018), esta é a

primeira vez que é demonstrada a atividade antibacteriana sobre um amplo repertório de bactérias multirresistentes. Tanto StigA8 quanto StigA18 apresentaram uma efetiva atividade em cepas de *S. aureus* de diferentes fontes de infecções hospitalares, que provavelmente estão expressando diferentes fatores de patogenia, demonstrando a promissora capacidade dessas moléculas no tratamento de infecções estafilocócicas graves. Esse fato pode estar relacionado a possível capacidade desses peptídeos de não se ligarem a um alvo-específico nas bactérias, sendo as interações peptídeo-membrana anteriormente relatadas, os possíveis mediadores dessa atividade (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; EPAND; EPAND, 2009; WANG; WANG, 2016).

Amorim-Carmo e colaboradores (2019) sugeriram, a partir dos resultados obtidos por MEV em cepa de *S. aureus*, que os peptídeos análogos da Stigmurina (StigA25 e StigA31) foram capazes de causar perturbações na parede celular dessas bactérias pela presença de protuberâncias e rachaduras nessas estruturas, porém sem causar lise da membrana celular. Um peptídeo de estrutura primária semelhante a Stigmurina, o AamAP1 (FLFSLIPHAIGGLISAFK) encontrado no veneno do escorpião norte-africano *Androctonus amoeruxi* apresentou atividade moderada contra cepas de *S. aureus* (20 μ M) e baixa para *E. coli* (150 μ M). Por outro lado, o seu análogo A3 (FLFSLIRKAIGGLISAFK), revelou uma maior efetividade para atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes de *S. aureus* com uma CIM de 5 μ M em média para as cepas testadas, além de apresentar atividade antibiofilme na concentração de 30 μ M para uma cepa de *S. aureus* resistente a eritromicina (BAA-41), demonstrando que a substituição de aminoácidos não polares como a prolina por aminoácidos mais básicos como a lisina, tem a capacidade de melhorar a atividade antibacteriana de PAMs e que isso está intimamente relacionado com o aumento da cationicidade (+1 para +3) e estrutura helicoidal da molécula (55% para 100%) (ALMAAYTAH et al., 2012, 2018).

Adicionalmente, a presença de aminoácidos conservados e amidados na porção C-terminal (GLISAFK- NH₂) desses peptídeos derivados de venenos de escorpiões, como AamAP1, A3, Stigmurina e TsAP-2 (sequência semelhante a Stigmurina), reforça a ideia de que essa sequência e amidação estão envolvidos diretamente na atividade antimicrobiana dessas moléculas, seja pela interação com as membranas dos microrganismos, seja pela manutenção da estrutura secundária dessas moléculas (BRINCKERHOFF et al., 1999; DANIELE-SILVA et al., 2016; MURA et al., 2016).

Portanto, os peptídeos StigA8 e StigA18 apresentaram diferentes determinantes que os favorecem como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos, tais como estrutura secundária em α -hélice, cationicidade e anfipaticidade

aumentadas em relação a molécula protótipo, ação contra bactérias gram-positivas e negativas com ênfase em bactérias multiresistentes de *S. aureus* de diferentes sítios de infecção hospitalares, além de uma potencial biocompatibilidade revelada nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, sobretudo nas concentrações em que StigA8 e StigA18 apresentaram atividade antimicrobiana.

Como apresentado na Tabela 4 deste documento, as cepas multiresistentes utilizadas nesses experimentos são potenciais formadoras de biofilme bacteriano. Dessa forma, StigA8 e StigA18 foram submetidos a testes *in vitro* para avaliação da atividade antibiofilme como será descrito a seguir.

4.5.3 Atividade Antibiofilme de StigA8 e StigA18

Devido a promissora atividade antibacteriana apresentada por StigA8 e StigA18 para cepas de *S. aureus*, sendo estas espécies formadoras de biofilme com capacidade de aderência de média a fortemente aderentes (Tabela 4), foi realizada a avaliação da capacidade desses peptídeos de prejudicar o desenvolvimento dessas estruturas biológicas. Inicialmente, foi avaliada a atividade incubando as amostras de StigA8 e StigA18 na cepa de referência de *S. aureus* (ATCC 29213), também forte formadora de biofilme segundo os critérios de Stepanović e colaboradores (2007), com tratamento inicial do biofilme em 4 h de incubação (biofilme precoce) e após 24 h de incubação (biofilme tardio).

Como é possível observar (Tabela 14), StigA8 e StigA18 apresentaram atividade contra o biofilme de *S. aureus* de forma expressiva, tanto na formação precoce como na formação tardia. Essa atividade variou de 75-87% de inibição da formação de biofilme precoce para StigA8 e StigA18, nas duas maiores concentrações testadas (12,5-6,25 μM). Para o biofilme tardio, a porcentagem de inibição aumentou, variando de 80-88% para ambos os peptídeos, nas duas maiores concentrações de StigA8 (12,5-6,25 μM) e na maior concentração de StigA18 (12,5 μM). StigA8 ainda apresentou porcentagem de inibição de aproximadamente 47% do biofilme tardio na menor concentração testada (3,12 μM).

Comparando a concentração de 12,5 μM dos peptídeos com a mesma concentração da vancomicina, foi observado que para o biofilme precoce, o medicamento teve uma atividade maior que os peptídeos (14,25% maior que StigA8 e 2,93% maior que StigA18). No entanto, para o biofilme tardio vancomicina expressou uma porcentagem menor de atividade em relação aos peptídeos (10,81% menor que StigA8 e 12,63% menor que StigA18), contudo, essas diferenças não foram significativas ($p > 0,05$), evidenciando uma atividade semelhante entre o medicamento de referência e as moléculas testadas.

Tabela 14- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação precoce e tardia de biofilme de *S. aureus*.

Precoce			Tardio		
StigA8 (μM)					
12,5	6,25	3,12	12,5	6,25	3,12
75,74 \pm 0,17	79,92 \pm 1,23	11,12 \pm 4,11	80,72 \pm 3,10	88,72 \pm 1,84	46,91 \pm 10,22
StigA18 (μM)					
12,5	6,25	3,12	12,5	6,25	3,12
87,06 \pm 0,47	77,61 \pm 11,38	5,05 \pm 5,36	82,54 \pm 7,08	0,08 \pm 8,76	3,36 \pm 4,40
Vancomicina (μM)					
50	25	12,5	50	25	12,5
89,42 \pm 3,99	89,99 \pm 2,32	89,99 \pm 4,80	79,80 \pm 8,49	74,70 \pm 5,09	69,91 \pm 7,36

Fonte: Dados obtidos e analisados. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e cada experimento em duplicata. Valores correspondem a média \pm desvio padrão.

Além da cepa de referência, os peptídeos análogos foram testados frente a 7 cepas de *S. aureus* multirresistentes, das quais já haviam sido testadas anteriormente no ensaio de determinação da CIM e CBM (Tabela 15 e 16). Diferentemente do ensaio de determinação de CIM e CBM, em que os peptídeos apresentaram atividade semelhante para todas as cepas multirresistentes de *S. aureus* testadas, no ensaio de atividade antibiofilme houve uma variação na resposta. Tomando por base um *cut-off* de 50% de atividade, os peptídeos análogos apresentaram ação para 4 das cepas testadas (UFPEDA 1044, 1046, 1041 e 1058) e parecem atuar mais na fase precoce do biofilme nas duas maiores concentrações testadas (7,5-3,75 μM) (Tabela 15).

Tanto StigA8 quanto StigA18 apresentaram atividade para as cepas UFPEDA 1044, com porcentagem de inibição de 68,03-59,27% (7,5-3,75 μM) e 70,66-62,53% (7,5-3,75 μM), respectivamente. Para a cepa UFPEDA 1046, os peptídeos análogos inibiram o biofilme em 78,36% (7,5 μM) e 76,68-60,71% (7,5-3,75 μM) para o StigA8 e StigA18, respectivamente. Adicionalmente, StigA8 apresentou atividade para UFPEDA 1041 com porcentagem de inibição de 56,28% na concentração de 7,5 μM . Uma atividade mais expressiva do StigA18 foi demonstrada sobre a cepa UFPEDA 1058, com percentual de inibição superior a 50% até na concentração de 1,87 μM .

No biofilme tardio (Tabela 16), os peptídeos apresentaram atividade mais discreta em relação ao biofilme precoce nas duas maiores concentrações testadas (7,5-3,75 μM), com variação de 55,18-58,17% nas cepas UFPEDA 1045 e UFPEDA 1041, respectivamente, para StigA8. Para o StigA18, a percentual de inibição do biofilme foi de 50,08-51,51% (7,5-3,75 μM) sobre as cepas UFPEDA 1041 e UFPEDA 1044, respectivamente. Semelhante a ação sobre o biofilme precoce, StigA18 atuou de forma mais expressiva na cepa UFPEDA 1058, com percentual de inibição de 66,24-50,45% nas três concentrações testadas (7,5-1,87 μM). Com relação à vancomicina, o percentual de inibição foi acima de 50% para 3 cepas (UFPEDA 1044, 1046 e 1058) na maior concentração testada (10 μM), enquanto no biofilme tardio vancomicina 10 μM apresentou inibição acima de 50%, somente para uma das cepas (UFPEDA 1046).

Portanto, os dados revelam uma promissora ação antibiofilme dos peptídeos análogos da Stigmurina em cepas multirresistentes da espécie *S. aureus* principalmente na fase precoce, embora também tenha apresentado atividade na fase tardia do biofilme para algumas cepas. Além disso, ambos os peptídeos apresentaram uma atividade semelhante ou melhor do que vancomicina, principalmente no biofilme tardio.

Tabela 15- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação precoce de biofilme de cepas multirresistentes de *S. aureus*.

	StigA8			StigA18			Vancomicina		
	Precoce			Tardio			Precoce		
<i>S. aureus</i>	7,5 (µM)	3,75 (µM)	1,87 (µM)	7,5 (µM)	3,75 (µM)	1,87 (µM)	10 (µM)	5 (µM)	2,5 (µM)
1041	56,28±6,46	40,18±6,15	21,59±8,06	43,05±6,38	24,99±7,29	15,29±7,17	46,34±9,82	30,05±7,89	19,47±11,23
1044	68,03±4,60	59,27±4,50	31,72±8,39	70,66±3,22	62,53±6,05	44,98±6,20	53,80±6,46	52,89±7,05	34,45±5,21
1045	47,31±6,70	32,35±7,69	9,31±7,52	51,67±8,40	36,47±6,38	29,59±6,18	48,51±6,44	39,72±7,64	4,31±3,81
1046	78,36±2,67	32,21±1,84	38,38±7,65	76,68±2,07	60,71±4,64	29,78±4,12	72,36±6,39	57,06±11,82	35,28±9,39
1048	35,77±3,68	31,41±4,12	12,66±7,74	38,42±2,28	28,75±4,22	3,42±5,35	16,51±3,82	11,30±9,52	6,78±2,27
1049	45,70±5,69	36,79±1,56	17,38±5,11	45,61±2,91	28,39±2,61	2,20±8,89	31,05±9,57	26,64±8,18	11,70±5,95
1058	52,61±6,57	54,97±9,04	47,00±15,03	71,33±4,50	71,95±10,15	58,37±7,35	80,87±5,49	41,77±24,45	3,74±25,89

Fonte: Dados obtidos e analisados. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e cada experimento em duplicata. Valores correspondem a média ± desvio padrão.

Tabela 16- Porcentagem da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 em formação tardia de biofilme de cepas multirresistentes de *S. aureus*.

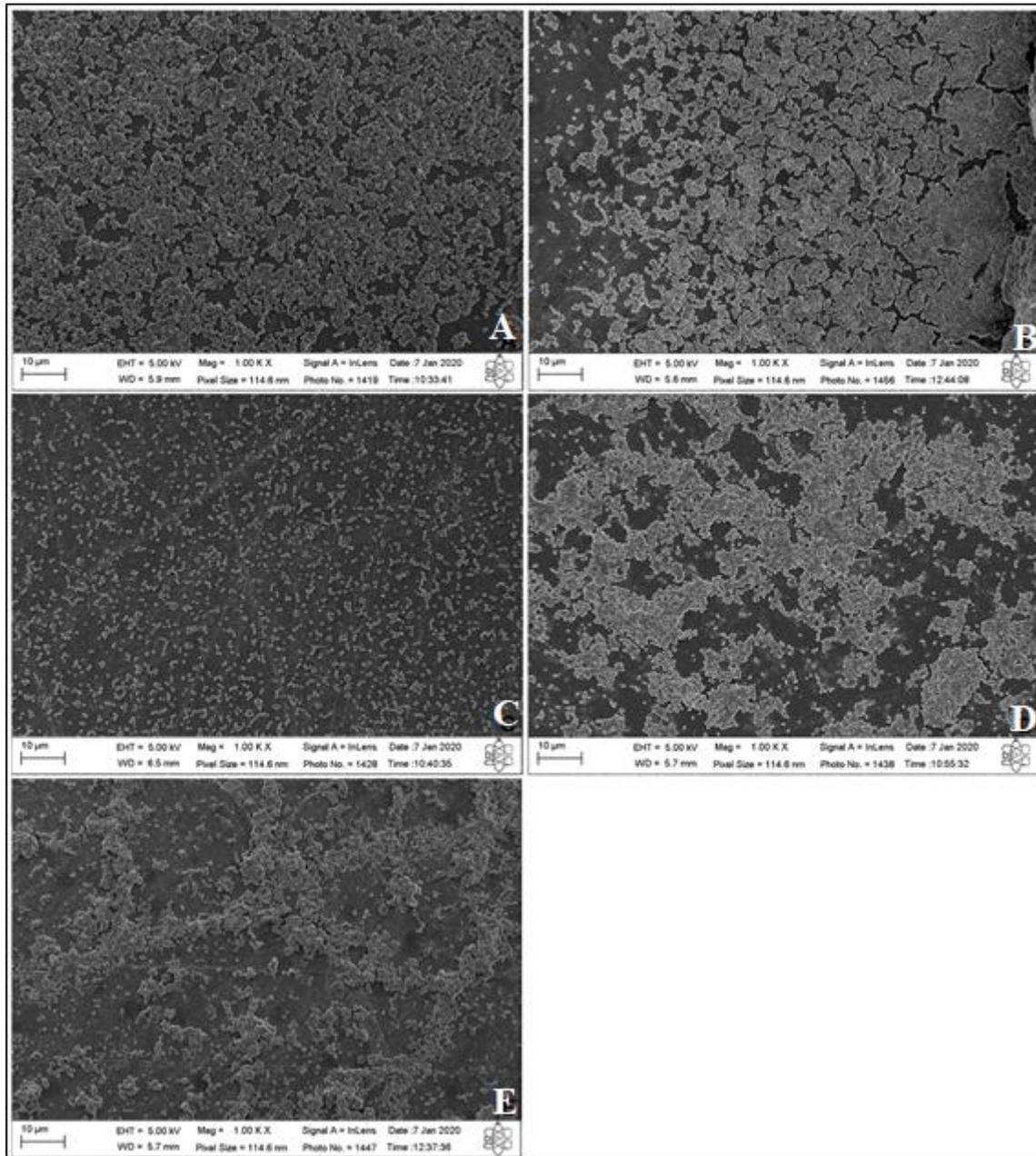
	StigA8			StigA18			Vancomicina		
	Tardio			Tardio			Tardio		
	7,5 (µM)	3,75 (µM)	1,87 (µM)	7,5 (µM)	3,75 (µM)	1,87 (µM)	10 (µM)	5 (µM)	2,5 (µM)
<i>S. aureus</i>									
1041	58,17±8,68	40,62±10,09	21,68±11,44	50,08±5,62	38,61±6,30	30,96±12,77	48,00±9,17	29,63±6,46	12,31±9,07
1044	43,36±5,73	39,61±7,43	11,55±5,51	51,51±5,65	25,27±6,33	11,42±6,33	28,20±7,92	26,57±10,34	10,10±5,68
1045	55,18±5,58	40,33±4,49	30,99±5,80	43,92±7,54	20,73±6,39	10,20±7,05	47,95±8,75	37,38±7,15	11,67±10,80
1046	48,47±4,59	30,31±4,93	22,91±3,72	48,81±6,95	39,16±7,31	13,02±9,48	55,85±6,65	42,32±4,20	16,11±14,33
1048	37,82±4,47	34,79±1,74	10,87±9,20	40,35±6,07	38,99±9,00	8,92±7,66	17,83±5,53	16,37±9,73	15,94±8,26
1049	47,78±3,12	35,25±7,17	14,97±6,74	45,61±2,70	37,57±6,98	15,61±9,02	48,30±7,06	39,62±7,20	15,85±6,98
1058	48,66±5,55	47,08±10,99	23,51±14,47	66,24±8,23	47,01±7,57	50,45±7,33	27,77±13,59	37,72±27,72	32,82±24,13

Fonte: Dados obtidos e analisados. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e cada experimento em duplicata. Valores correspondem a média ± desvio padrão.

4.5.4 Topografia da Atividade Antibiofilme de StigA8 e StigA18

O efeito antibiofilme dos peptídeos análogos foi analisado por MEV para observar as modificações na estrutura do biofilme bacteriano de *S. aureus* (ATCC 29213) como é possível observar na Figura 10 e Figura 11.

Figura 10 – Topografia por Microscopia Eletrônica de Varredura da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 sobre o biofilme formado por *S. aureus*.



Controle de crescimento do biofilme (A); Biofilme precoce tratado com StigA8, na concentração 12,5 μM (B); Biofilme tardio tratado com StigA8, na concentração 12,5 μM (C); Biofilme precoce tratado com StigA18, na concentração de 12,5 μM (D); Biofilme tardio tratado com o peptídeo StigA18, na concentração 12,5 μM (E). Magnitude 1000 X. Escala: 10μm.

StigA8 e StigA18 não apresentaram atividade tão proeminente contra o biofilme precoce (Figura 10B e 10D, respectivamente), diferentemente do biofilme tardio (Figura 10C e 10E, respectivamente), quando comparado ao controle positivo de crescimento de biofilme (10A). Enquanto a área de cobertura (Tabela 17) do controle positivo foi de 61,78%, o do biofilme precoce foi de 69,67% e 55,01% para StigA8 e StigA18, respectivamente. Já no biofilme tardio, esse percentual foi de 23,96% e 38,02% para StigA8 e StigA18, respectivamente.

Tabela 17 – Área de cobertura do biofilme após tratamento com os peptídeos StigA8 e StigA18.

Peptídeos	Tratamento	
	Precoce	Tardio
Controle	61,78%	61,78%
A8	69,67%	23,96%
A18	55,01%	38,02%

Dados obtidos e analisados pelo Software image J.

Em relação ao tamanho do diâmetro do microrganismo e outros danos a estrutura celular, foi observado que houve danos às células bacterianas quando tratadas com os peptídeos StigA8 e StigA18 (Figura 11B1-E3), quando comparadas às células intactas, sem nenhum tratamento (Figura 11A1-A3). As análises morfológicas mostram que as células do controle positivo de crescimento são mais arredondadas, superfície lisa e com diâmetro mais homogêneo. Em contrapartida, nas células que foram tratadas com StigA8 no biofilme precoce, evidenciou a presença de detritos na superfície celular (Figura 11B1-B3) e no biofilme tardio, revelou alterações mais acentuadas na estrutura dessas bactérias, como invaginações, maior rugosidade, fragmentos celulares e heterogeneidade do diâmetro celular (Figura 11C1-C3). Nos grupos tratados com StigA18, apesar de causar menores danos às estruturas da superfície bacteriana quando comparado a StigA8, é possível observar danos ao biofilme precoce com a presença de rugosidade celular (Figura 11D1-D3) e heterogeneidade do diâmetro celular (Figura 11E1-E3).

Foi verificado que os peptídeos diminuíram o diâmetro celular de *S. aureus* na maioria dos tratamentos recebidos, quando avaliado a média aritmética do diâmetro de dez células bacterianas. As bactérias do controle positivo de crescimento apresentaram uma média de diâmetro de 855,5 nm (Tabela 18). No biofilme precoce, StigA8 e StigA18 tiveram médias de 797,79 e 877,3 nm, respectivamente, no entanto, não apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$). Para o biofilme tardio, foi observado uma diminuição mais proeminente do diâmetro celular, 737,4 e 721,6 nm para StigA8 e StigA18, respectivamente,

evidenciando mais uma vez, a melhor atuação no dano bacteriano na fase tardia do biofilme ($p < 0,05$).

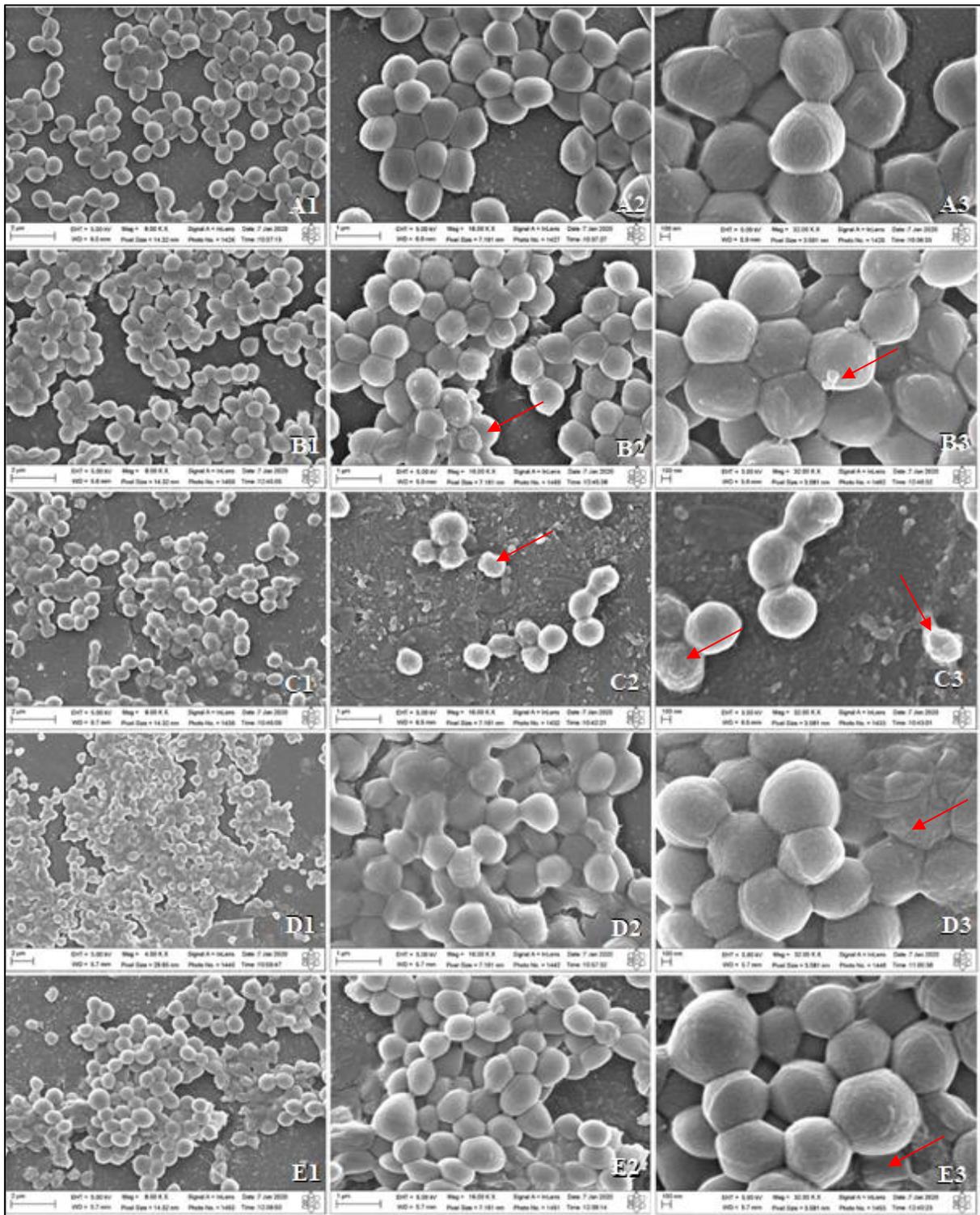


Figura 11 – Análise da ultraestrutura do biofilme formado pela bactéria *S. aureus* e tratados com StigA8 e StigA18 por MEV. Controle de crescimento do biofilme (A1, A2 e A3); Biofilme precoce tratado com o StigA8, na concentração 12,5 μ M (B1, B2 e B3); Biofilme tardio tratado com StigA8, na concentração 12,5 μ M (C1, C2 e C3); Biofilme precoce tratado com StigA18, na concentração de 12,5 μ M (D1, D2 e D3); Biofilme tardio tratado com StigA18, na concentração 12,5 μ M (E1, E2, E3). Magnitude 8000 X, 16000 e 32000. As setas indicam os danos causados ao biofilme. Escala: 2 μ m.

Tabela 18 – Média do diâmetro celular de *S. aureus* após tratamento com os peptídeos análogos da Stigmurina, StigA8 e StigA18.

Tratamento	Média do Diâmetro celular (nm)
Controle	855,5 ±56,08
StigA8 precoce	797,79 ±80,71
StigA8 tardio	737,4 ±60,25
StigA18 precoce	877,3±73,17
StigA18 tardio	721,6 ±84,53

Dados obtidos pela média aritmética do diâmetro de dez células bacterianas para cada grupo.

A presença do *S. aureus* na maioria das infecções crônicas envolvendo o uso de dispositivos médicos internos como cateteres urinários, válvulas cardíacas e próteses articulares, acarreta em altos índices de morbidade e mortalidade, com comprometimento do tratamento, necessitando muitas das vezes de uma remoção cirúrgica desses dispositivos, o que leva ao aumento da permanência dos pacientes nos hospitais (GALAR et al., 2019; GJØDSBØL et al., 2006; KIRKETERP-MOLLER et al., 2008). Além disso, o tratamento dos biofilmes é dificultado pela alta tolerância e resistência que apresentam aos antibióticos utilizados, sendo muitas vezes 100-1000 vezes mais resistentes quando comparado a sua forma planctônica (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012; ROY et al., 2018).

Essa alta resistência e tolerância por parte dos biofilmes, não só de *S. aureus*, muito se deve a Matriz Extra Celular (MEC) produzida pelos microrganismos, sendo essa matriz composta por uma maior parte polissacarídica e outra parte por proteínas secretadas, DNA e outras proteínas extracelulares oriundas da lise de células bacterianas. Nos biofilmes estafilocócicos, a presença dos ácidos tecóico e lipotecóicos, além do DNA extracelular (e-DNA), auxiliam na produção de uma matriz densa com caráter aniônico (MOORMEIER; BAYLES, 2017).

A MEC constitui uma barreira física, impedindo a passagem do antibiótico até as células bacterianas ou ainda pode interagir quimicamente com essas moléculas, permitindo apenas uma parcela chegar até as camadas celulares. Além disso, os antibióticos tendem a atuar mais efetivamente nas camadas celulares mais superficiais do biofilme, em que as bactérias estão em fase de crescimento exponencial e os fármacos podem atuar em alvos do processo de multiplicação como na replicação ou tradução. Nas camadas mais profundas, devido à baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio, o metabolismo celular é baixo e o processo de

multiplicação é quase nulo, limitando a ação dos antimicrobianos (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012; MOORMEIER; BAYLES, 2017).

Os estudos envolvendo PAMs catiônicos e α -helicoidais na atividade antibacteriana vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas, porém, estudos envolvendo atividade antibiofilme bacteriano são mais recentes, sendo dificultados por não se compreender totalmente o mecanismo pelo qual essas estruturas se formam (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019). Peptídeos antimicrobianos de escorpião têm se destacado na atividade antibiofilme contra *S. aureus*, como o A3 (FLFSLIRKAIGGLISAFK), análogo do AamAP1 (FLFSLIPHAIGGLISAFK) do escorpião *A. amoeruxi*. O A3, além de apresentar atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus* melhor que a molécula protótipo, sobretudo sobre cepas de *S. aureus* multirresistentes (5 μ M), apresentou atividade antibiofilme em cepas *S. aureus* ATCC 29213 e BAA-41 (SARM) nas concentrações de 25 μ M e 30 μ M, respectivamente (ALMAAYTAH et al., 2018).

Kim e colaboradores (2018), avaliaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do peptídeo Hp140 (GILGKLWEGVKSIF-NH₂) do escorpião *Heterometrus petersii* e de seus análogos (todos com estrutura secundária em α -hélice) contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, dos quais o Hp1404-T1e (ILKKLLKKVKKI-NH₂) se mostrou mais promissor. A CIM para a atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* variou de 12,5-6,25 μ M para Hp140, enquanto para Hp1404-T1e foi de 6,25-0,78 μ M. Em relação a atividade antibiofilme, Hp1404-T1e se mostrou mais promissor em concentrações de 12,5-6,25 μ M, no entanto, o peptídeo nativo (Hp140) revelou ação em concentração superior, em média de 25 μ M. O estudo demonstrou que o peptídeo parental possui atividade contra *P. aeruginosa* por rompimento da membrana externa (pela análise de PI-FACS) enquanto o Hp1404-T1e interage com alvos intracelulares como o DNA (pelo ensaio de ligação ao DNA em retardamento de em gel).

No peptídeo Hp1404-T1e foram deletados aminoácidos aromáticos (como a fenilalanina) e a glicina, que tem sua cadeia lateral apolar, indicando que a presença desses aminoácidos na estrutura dos peptídeos é importante para interação com as membranas das bactérias. A substituição de alguns aminoácidos pela lisina, favoreceu a permeabilização a membrana sem causar lise. Além disso, tanto Hp140 como Hp1404-T1e apresentaram atividade antibacteriana em camundongos infectados com *P. aeruginosa*, demonstrando a potencial aplicação desses peptídeos na terapêutica (KIM et al., 2018).

Diante do exposto, StigA8 e StigA18 revelaram um caráter promissor como agentes antibiofilme, mostrando ação sobre o biofilme precoce ou tardio de *S. aureus*. Não se sabe quais os mecanismos de ação pelos quais essas moléculas podem estar atuando, porém, devido às

suas características físico-químicas, como carga superficial líquida positiva, anfipaticidade e estrutura em α -hélice, algumas hipóteses podem ser levantadas.

Por exemplo, a possível capacidade desses peptídeos em interagir primeiramente com componentes da MEC, como os ácidos teicoicos e moléculas de e-DNA que possuem carga negativa, “abrindo caminhos” e permitindo a passagem de outras unidades dessas moléculas até as células bacterianas superficiais, alterando a estrutura de membrana dos microrganismos pela formação de poros, ou se depositando na membrana formando um “tapete”. Além disso, pensando em uma futura aplicação medicamentosa dos peptídeos análogos, estes, poderiam ser aplicados em tratamentos combinados com antibióticos, dos quais os peptídeos facilitariam a permeabilização dos medicamentos, através do biofilme.

Algumas estratégias, além da substituição do dispositivo médico interno, vêm se desenvolvendo no tratamento de biofilmes, como por exemplo, o revestimento desses dispositivos com moléculas antimicrobianas ou desinfetantes (ROY et al., 2018), sendo possível também a aplicação de StigA8 e StigA18 com essas finalidades no caso do desenvolvimento de um medicamento..

4.5.5 Atividade Antibacteriana *in vivo* de StigA8 e StigA18

A atividade antibacteriana dos peptídeos StigA8 e StigA18, também foi testada em modelo experimental *in vivo* utilizando larvas de mariposa da espécie *Galleria mellonella*. Nesse modelo, as larvas foram infectadas com a cepa *S. aureus* multirresistente (UFPEDA 1058) e tratadas com diferentes doses dos peptídeos análogos. A porcentagem foi dada pela contabilidade de indivíduos vivos a cada dia de observação, durante sete dias.

Na Figura 12, foi observado que o grupo positivo de infecção bacteriana, induziu a morte de 95% das larvas no terceiro dia de observação e no quarto dia, houve a erradicação total dos indivíduos. Neste grupo, os indivíduos apresentaram melanização no corpo inteiro e dificuldade de locomoção poucos minutos após a inoculação, revelando sinais indicativos de toxicidade (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2018). Contudo, nos grupos experimentais de StigA8 e StigA18 que receberam a dose de 40 mg/kg, ocorreu um aumento discreto da sobrevida das larvas para a menor dose, enquanto um aumento mais proeminente dessa sobrevida foi observado na maior concentração dos peptídeos análogos 120 mg/kg. Na dose de 40 mg/kg, no primeiro dia de observação, StigA8 e StigA18 apresentaram 95% de sobrevida, com uma diminuição mais evidente dos indivíduos no segundo dia, com 55% e 75% de sobrevida para StigA8 e StigA18, respectivamente. No segundo dia, verificou-se a morte de indivíduos maior no grupo tratado com StigA8 na dose de 40 mg/kg (55% de sobrevida) do que

no grupo do controle positivo que foi de 65% de sobrevivência. No terceiro dia, a porcentagem de indivíduos vivos do controle positivo foi de 5% e nos grupos tratados com 40 mg/kg foi de 30 e 35% para StigA8 e StigA18, respectivamente. No quarto dia, no controle positivo, todos os indivíduos morreram e no grupo tratado com StigA8 manteve-se a sobrevivência em 25% até o último dia de observação. Já StigA18, apresentou porcentagem de 35%, 30%, 20% e 5% de sobrevivência do quarto ao sétimo dia, respectivamente.

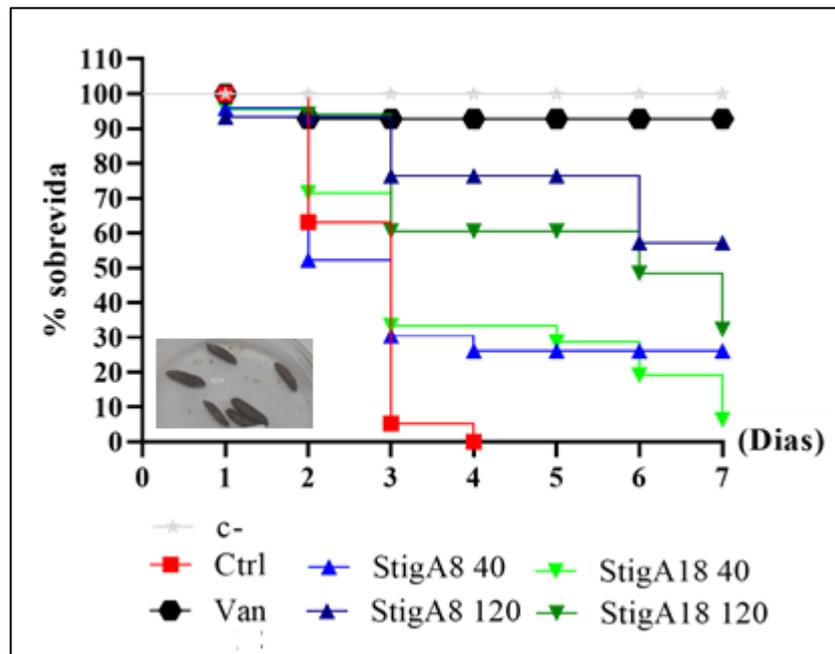


Figura 12 – Atividade antibacteriana in vivo de StigA8 e StigA18. Atividade antibacteriana dos peptídeos análogos em larvas da espécie *Galleria mellonella*, Ctrl (controle positivo de infecção); C- (controle negativo de infecção); StigA8 40 e 120, StigA18 40 e 120 (peptídeos análogos administrados na dose de 40 e 120 mg/kg); Van (vancomicina administrado na dose de 12 mg/kg).

Quando se observam os grupos tratados com a dose de 120 mg/kg, tanto StigA8 quanto StigA18, apresentaram melhora na atividade antibacteriana contra a cepa de *S. aureus*. No primeiro dia de observação, a porcentagem de sobrevivência foi de 95%, 100% e 100% para StigA8, StigA18 e controle positivo, respectivamente. No segundo dia, a porcentagem para os grupos tratados com os peptídeos foi de 95%, enquanto que no grupo controle positivo teve uma redução para 65% de sobrevivência. No terceiro dia de observação, ocorreu uma queda brusca na porcentagem de sobrevivência das larvas no controle positivo (de 65% para 5%), sendo os peptídeos um ponto de inflexão na sobrevivência dessas larvas, apresentando porcentagem de 75% e 60% para StigA8 e StigA18, respectivamente. Essa sobrevivência foi mantida do terceiro ao quinto dia de observação, reduzindo para 55% e 50% no sexto dia, para StigA8 e StigA18, respectivamente. Em um panorama geral, tanto StigA8 quanto StigA18, apresentaram atividade antibacteriana contra a cepa *S. aureus* na dose de 120 mg/kg, aumentando a sobrevivência das larvas, sobretudo no pico de infecção que ocorreu no terceiro dia de observação. Não foi

observada diminuição significativa da porcentagem de sobrevivência dos grupos controle negativo (100% de sobrevivência) e vancomicina (95% de sobrevivência).

Em relação aos sinais de toxicidade, os grupos controle negativo e vancomicina apresentaram boa aparência no que diz respeito a coloração, e motilidade normal, demonstrando a efetividade da vancomicina no tratamento por infecção com *S. aureus* nesse modelo experimental, embora os indivíduos tenham apresentado pontos de melanização em alguns segmentos do corpo das larvas. Comparativamente à vancomicina, os indivíduos tratados com StigA8 e StigA18 na menor dose testada e que sobreviveram, apresentaram mais pontos de melanização pelo corpo, mudança de coloração (amarela para acinzentada) e menor motilidade. Para a dose de 120 mg/kg, as larvas que sobreviveram apresentaram melhor motilidade, coloração mais amarelada e menos melanização do corpo quando comparada a dose de 40 mg/kg.

Vale ressaltar que a administração dos peptídeos foi em dose única, demonstrando o potencial antibacteriano dessas moléculas para infecções estafilocócicas. Provavelmente, a amidação na porção C-terminal dos peptídeos foi eficaz na estabilização estrutural e proteção contra proteólise, haja vista que a larva de *G. mellonella* possui metabolismo ativo, com resposta imune inata e presença de lisozimas em sua hemolinfa (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2018). Sendo assim, estudos com o tratamento em dias alternados podem ser realizados para melhor avaliar a efetividade da atividade antibacteriana de StigA8 e StigA18 nesse modelo experimental, bem como, a avaliação do perfil de degradação dos peptídeos por espectrometria de massas, pelos fluídos corporais das larvas como hemolinfa ou fezes.

A avaliação da atividade antimicrobiana de peptídeos de escorpião em larvas de *G. mellonella* ainda é pouco explorada, porém alguns peptídeos de outras fontes naturais como plantas (PT13 da espécie *Populus trichocarpa*) (AL AKEEL et al., 2018) e secreção da pele de anuros (Temporina 10La da espécie *Rana okaloosae*) (MISHRA et al., 2018), além de medicamentos como gentamicina e meropenem, têm sido descritos (PELEG et al., 2009). Adicionalmente, a atividade antibacteriana da Stigmurina também já foi testada *in vivo* em modelo experimental murino de sepse polimicrobiana, o qual, o peptídeo foi capaz de diminuir fatores inflamatórios dessa condição patológica como migração leucocitária, citocinas pró-inflamatórias e a inflamação do pulmão e ceco dos animais sépticos (DANIELE-SILVA et al., 2016), demonstrando o alto potencial terapêutico em infecções bacterianas desses PAMs oriundos do escorpião *T. stigmurus*.

Sendo assim, nesse modelo experimental, StigA8 e StigA18 demonstraram potencial antimicrobiano contra infecção estafilocócica, sendo importante a análise em organismos mais complexos como camundongos ou ratos para avaliação dessa atividade.

4.6 Atividade Tripanocida de StigA8 e StigA18

O potencial antiparasitário dos peptídeos análogos da Stigmurina foi avaliado através da atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*, sendo observado inicialmente com 24 h de incubação dos parasitas com as amostras de peptídeo. StigA8 e StigA18 apresentaram significativa atividade tripanocida nesse intervalo de tempo em todas as concentrações testadas (25-1,56 μM) (Figura 13A), o que pode ser visto pela porcentagem de parasitas vivos (contagem em microscópio), a qual variou entre 95-100%, conforme aumentou-se a concentração dos peptídeos (Tabela 19), ou seja, não ocorreu diferença significativa entre as concentrações testadas.

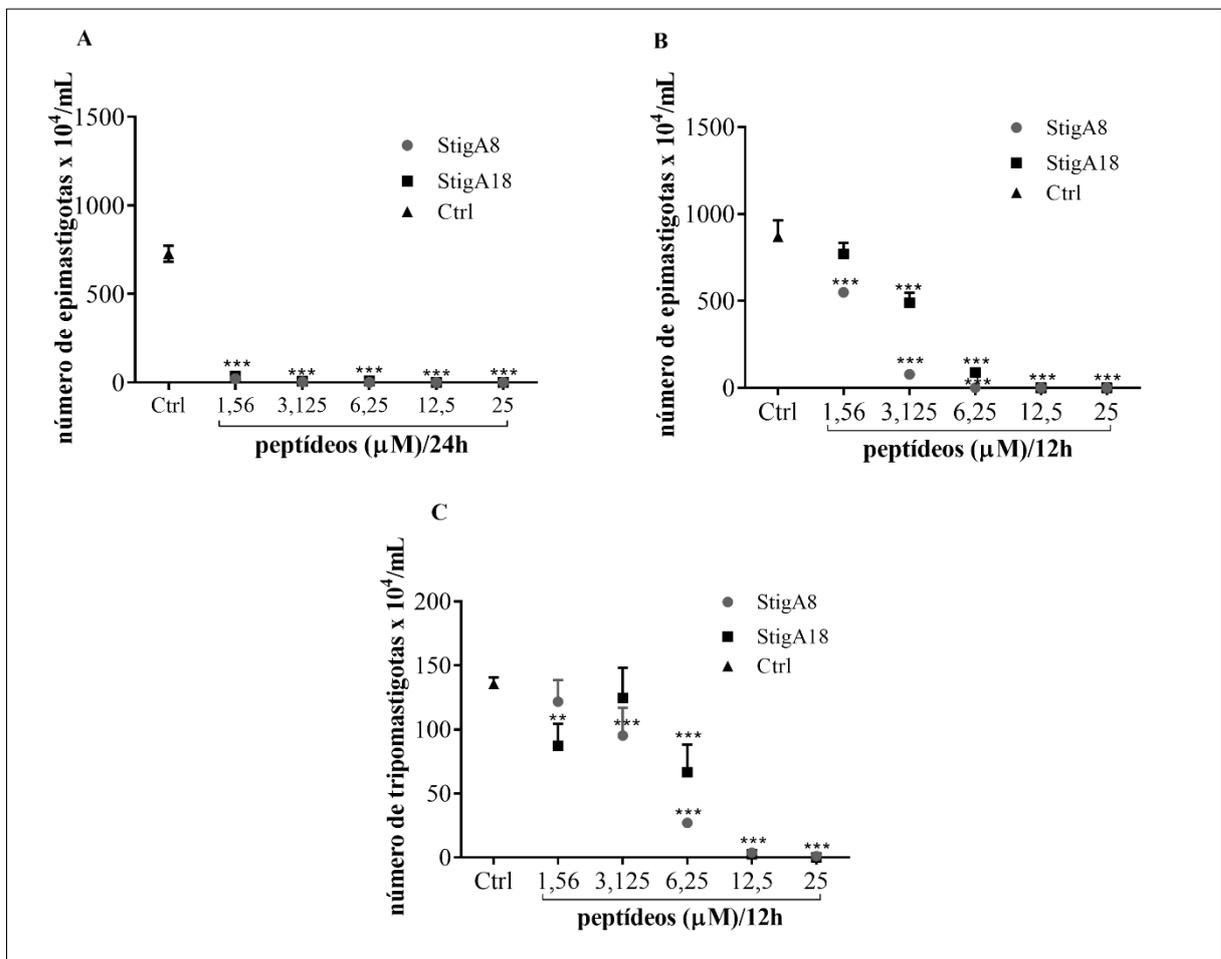


Figura 13 – Atividade tripanocida de StigA8 e StigA18 para as formas epimastigotas e tripomastigotas. Contagem do número de parasitas foi realizada após a incubação com diferentes concentrações de StigA8 e StigA18 (25-1,56 μM) nos intervalos de tempo de 24 h (A) e 12 h (B) e das formas tripomastigotas no intervalo

de tempo de 12 h (C). Dados representam a média de valores obtidos das quadruplicatas das amostras e as linhas verticais indicam o desvio padrão. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ representam a significância da atividade em comparação ao grupo controle positivo (Ctrl).

Diante disso, visando observar se os peptídeos atuariam em um menor intervalo de tempo de incubação, essas mesmas formas do parasita foram incubadas por 12 h com StigA8 e StigA18, nas mesmas concentrações anteriormente citadas. O que pode ser observado, é que mesmo com menor tempo de contato das amostras com os parasitas, estas ainda mantiveram sua atividade tripanocida significativa (Figura 13B) e que o percentual de inibição permaneceu alto, variando de 93-100% para StigA8, a partir da concentração de 3,25 μ M, embora a menor concentração (1,56 μ M) ainda tenha mantido um percentual de 52,64% dessa atividade. Para StigA18, o perfil foi semelhante, com percentual de inibição de 90-100%, a partir da concentração de 6,25 μ M. As menores concentrações (3,25 e 1,56 μ M), inibiram em 43,07% e 15,46%, respectivamente (Tabela 19).

Estes resultados demonstram o potencial tripanocida dessas moléculas nas formas epimastigotas do parasita *T. cruzi*, que é a forma que parasita o intestino médio do triatomíneo (inseto). Com o intuito de avaliar a ação sobre as formas infectantes e circulantes nos seres humanos, as formas tripomastigotas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018) foram incubadas com os peptídeos análogos por 12 h. O gráfico da Figura 13C evidencia que tanto StigA8 quanto StigA18, apresentaram elevada atividade tripanocida contra as formas tripomastigotas, principalmente nas concentrações de 25-6,25 μ M, que inibiram de 99,26-80,07% para StigA8 e 98,15%-100% para StigA18 (Tabela 19).

Tabela 19 – Determinação da porcentagem de inibição de crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

% de inibição do crescimento das formas epimastigotas/24h									
StigA8 (µM)					StigA18 (µM)				
25	12,5	6,25	3,12	1,56	25	12,5	6,25	3,12	1,56
100± 0,00	100± 0,00	100± 0,00	99,55± 0,20	97,00± 0,51	100± 0,00	99,93± 0,07	98,89± 0,40	99,00± 0,23	95,04± 1,07
% de inibição do crescimento das formas epimastigotas/12h									
StigA8 (µM)					StigA18 (µM)				
25	12,5	6,25	3,12	1,56	25	12,5	6,25	3,12	1,56
100± 0,00	100± 0,00	100± 0,00	93,27± 5,32	52,64± 31,60	100± 0,00	100± 0,00	89,99± 0,63	43,07± 3,00	15,46± 8,80
% de inibição do crescimento das formas tripomastigotas/12h									
StigA8 (µM)					StigA18 (µM)				
25	12,5	6,25	3,12	1,56	25	12,5	6,25	3,12	1,56
99,26± 0,60	97,23± 0,70	80,0± 1,80	29,70± 16,70	14,88± 9,82	98,15± 3,88	100± 0,00	55,71± 15,77	15,62± 11,10	29,64± 5,18

Fonte: dados obtidos e analisados. Cada amostra foi realizada em quadruplicata e cada experimento em duplicata. Valores correspondem a média ± desvio padrão.

Como já foi mencionado, no Brasil, o único tratamento utilizado na doença de Chagas é o benznidazol, contudo seu efeito é limitado, principalmente na fase crônica da doença, com taxas de cura consideradas baixas, sobretudo em adultos (2-40% dos casos) e apresenta algumas limitações no que diz respeito a baixa solubilidade em meio aquoso e dificuldade de atravessar as barreiras biológicas. Assim, o estudo envolvendo novas abordagens terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas se torna necessário (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Nesse sentido, Parente e colaboradores (2018) verificou através de ensaio colorimétrico *in vitro*, pela redução do MTT, que o benznidazol na concentração de 384 µM não foi eficaz na inibição do crescimento das formas tripomastigotas do *T. cruzi* após 24h de incubação (20% de inibição), diferentemente do StigA16 que apresentou 100% de inibição na concentração de 2,5 µM nesse mesmo intervalo de tempo.

Não se sabe por qual mecanismo de ação esses peptídeos estão atuando, porém algumas hipóteses podem ser levantadas, tomando como base os componentes de membrana do protozoário *T. cruzi*.

A membrana desses microrganismos é composta por uma bicamada lipídica em que associado ao glicocálix, possui diferentes glicoproteínas ancoradas, como a glicosilfosfatidilinositol, importante para que o parasita possa expressar em sua membrana as proteínas envolvidas na sua virulência, além de resíduos de manose, que conferem cargas negativas às membranas do *T. cruzi* em pH fisiológico (NEVES et al., 2019). No estudo realizado por Neves e colaboradores (2019), foi demonstrado que o uso de moléculas catiônicas como a ferritina cationizada e a poli-L-lisina, foram capazes de interagir com as membranas das formas tripomastigotas da cepa Y, em um primeiro momento promovendo o capeamento dessas células, depois induzindo a formação de vesículas na membrana, levando a formação de poros. Tal fato também foi observado para o VmCT1 do escorpião mexicano *V. mexicanus* e seus análogos, com substituições de alguns aminoácidos por arginina, os quais apresentaram ação tripanocida em cepas Y de *T. cruzi* sobre as três formas evolutivas do parasita (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas), com destaque para o análogo [Arg] 11-VmCT1 que apresentou maior atividade e seletividade do que a molécula protótipo, sendo também, observado a formação de poros na forma epimastigotas nas imagens de MEV (PEDRON et al., 2020).

Levando esses fatos em consideração, é possível que StigA8 e StigA18 atuem por esses mecanismos de ação, tendo em vista as propriedades físico-químicas dessas moléculas e a composição química da membrana desses parasitas, o que reflete na sua atividade tripanocida apresentada nesse estudo.

4.7 Atividade Antiproliferativa de StigA8 e StigA18

O potencial antiproliferativo contra linhagens de células cancerígenas dos peptídeos análogos StigA8 e StigA18, foi avaliado pelo ensaio colorimétrico MTT sobre as linhagens celulares de adenocarcinoma cervical humano (786-0) e melanoma murino (B16-F10).

Para a linhagem celular 786-0 (Figura 14A), StigA8 apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 2 μM , com 67,8 % de inibição da viabilidade celular e em 40 μM apresentou 78,5% de inibição, quando comparados ao grupo controle de viabilidade celular. Para StigA18, a citotoxicidade a partir de 4 μM foi 55,3% de inibição, já em 40 μM essa porcentagem foi de 80,7%. Na menor concentração testada, StigA18 não apresentou citotoxicidade às células de adenocarcinoma renal humano.

Para as células do melanoma murino (B16-F10), os peptídeos apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de 8 μM , com inibição da viabilidade celular de 30,5% e 60% para StigA8 e StigA18, respectivamente. Na concentração de 15 μM , essa toxicidade aumenta, com 64% e 66% de inibição para StigA8 e StigA18, respectivamente (Figura 14B).

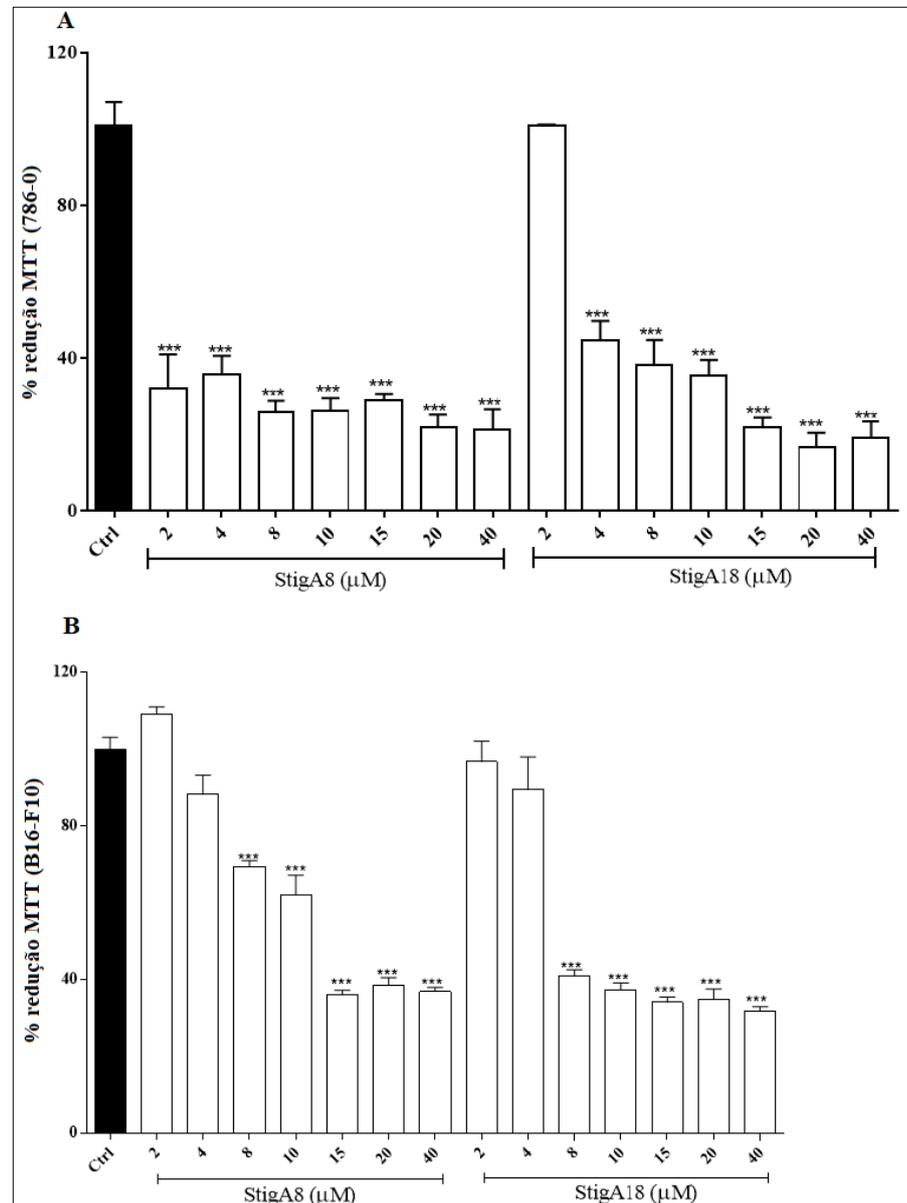


Figura 14 – Atividade antiproliferativa de StigA8 e StigA18. As células foram cultivadas na presença de diluições seriadas (40-2 μM) de StigA8 e StigA18 durante 24h para células 786-0 (A) e B16-F10 (B). Os valores são expressos como média \pm DP (n = 4). *** p < 0,001 comparando o grupo controle (100% de viabilidade celular).

A Stigmurina foi testada para algumas linhagens de células cancerígenas das quais o peptídeo apresentou diferentes perfis de atividade antiproliferativa. Enquanto para células do câncer cervical humano (SiHa) o IC_{50} foi de 118 μM , para células do carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e adenocarcinoma cervical humano (HeLa), significativa redução da viabilidade celular ocorreu na faixa de concentração de 20-40 μM , demonstrando que o

peptídeo pode ter efeito distinto dependendo da linhagem celular avaliada (DANIELE-SILVA et al., 2016; MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018). Para os peptídeos análogos StigA6 e StigA16 demonstraram um potencial antiproliferativo mais proeminente em células HeLa do que o peptídeo protótipo, com redução da viabilidade celular de 85% na concentração de 2 μ M, demonstrando que as modificações realizadas na sequência primária da Stigmurina exerceram papel importante na interação peptídeo-célula cancerígena.

O câncer continua sendo uma das doenças que mais acometem os seres humanos e que mais causam mortes em todo o mundo. As células cancerígenas ao longo dos anos foram desenvolvendo estratégias de resistência aos quimioterápicos como: retirada do medicamento do citosol e devolvendo ao meio extracelular, através de transportadores de membrana; capacidade de reparação de danos ao DNA causados pelos medicamentos; e a alta tolerância a condições extremas de estresse, além da baixa seletividade dos quimioterápicos para as células cancerígenas (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013). Essa problemática tem incentivado a inúmeros grupos de pesquisa a incessante busca por novas moléculas terapêuticas que sejam mais efetivas e mais seletivas para o tratamento dos pacientes acometidos por essa doença (AHMADI et al., 2020; HARRISON et al., 2014; ZHANG; YANG; ERICSSON, 2019).

Não se sabe por qual mecanismo de ação a Stigmurina e seus análogos podem estar atuando para apresentar potencial antiproliferativo nas mais diferentes linhagens de células cancerígenas, porém, algumas hipóteses podem ser destacadas levando em consideração os aspectos físico-químicos e estruturais desses peptídeos e as propriedades das células cancerígenas. As células cancerígenas apresentam na superfície de sua bicamada lipídica uma malha de cargas negativas conferidas por moléculas aniônicas como, as fosfatidilserinas, mucinas -O- glicosiladas, ácidos siálicos e heparan sulfatos, diferentemente das células normais que apresentam membranas essencialmente zwitteriônicas.

Na literatura é descrito que os PAMs catiônicos, como StigA8 e StigA18, podem atuar por duas vias: membranolíticas e não membranolíticas. No mecanismo de ação membranolítico, pode ocorrer a interação eletrostática inicial dos peptídeos catiônicos com a membrana das células cancerosas, induzindo a formação de poros ou a promoção de dano membranar, ou ainda induzindo a permeação dessas moléculas ao citosol, possibilitando a interação desses PAMs com alvos intracelulares como mitocôndrias, proteínas e DNA. No mecanismo de ação não membranolítico, pode ocorrer a ligação desses peptídeos a receptores dos vasos sanguíneos ligados a angiogênese, dificultando o progresso do crescimento de tumor. Além disso, as microvilosidades apresentadas pelas células cancerígenas aumentam a superfície de contato para que os peptídeos possam exercer sua atividade (GASPAR; VEIGA;

CASTANHO, 2013; ZHANG; YANG; ERICSSON, 2019). No entanto, para saber qual mecanismo de ação está ocorrendo, outros estudos devem ser realizados.

Diante do exposto, os peptídeos Stigmurina e os análogos StigA8 e StigA18 podem estar atuando por algum desses mecanismos de ação, tendo em vista que apresentaram potencial antiproliferativo em linhagens de células cancerígenas. Contudo, mais estudos em relação ao mecanismo de ação para estas atividades, devem ser realizados para avaliar esses potenciais farmacológicos.

5 CONCLUSÕES

- A predição estrutural e físico-química de StigA8 e StigA18 revelou aumento da estrutura em α -hélice, momento hidrofóbico e cationicidade em relação a molécula protótipo;
- Os peptídeos StigA8 e StigA18 apresentaram, por modelagem molecular, estrutura secundária em α -hélice com presença de uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica;
- A análise por dicroísmo circular evidenciou a flexibilidade da estrutura secundária de StigA8 e StigA18 em diferentes meios, com formação predominante de α -hélice em ambientes semelhantes às membranas biológicas. Os peptídeos também apresentaram estabilidade conformacional em ampla faixa de pH e temperatura com capacidade de renaturação;
- StigA8 e StigA18 apresentaram biocompatibilidade *in vitro* em eritrócitos humanos e fibroblastos murinos e nenhum sinal de toxicidade em larvas de *G. mellonella*;
- Os peptídeos StigA8 e StigA18 apresentaram atividade antibacteriana em cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas com ação bactericida ou bacteriostática dependendo da cepa testada;
- Os análogos StigA8 e StigA18 apresentaram atividade antibiofilme na formação precoce e tardia, causando danos nas células bacterianas visualizadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- StigA8 e StigA18 apresentaram atividade antibacteriana *in vivo* em larvas de *G. mellonella* aumentando a sobrevivência dos indivíduos.
- StigA8 e StigA18 apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* contra *T. cruzi* nas formas epimastigotas e tripomastigotas;
- Os peptídeos análogos da Stigmurina, StigA8 e StigA18, revelaram atividade antiproliferativa em linhagens de células cancerígenas;
- StigA8 e StigA18 são moléculas promissoras para o tratamento de infecções estafilocócicas e outras infecções bacterianas, bem como, apresentam potencial tripanocida e antiproliferativo, sendo necessários estudos mais aprofundados para melhor caracterizar essas atividades.

6 PERSPECTIVAS

- Conclusão dos ensaios de dinâmica molecular com simulações em membranas miméticas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, aumentando o número de moléculas no sistema;
- Concluir os ensaios com as larvas de *G. mellonella* com tratamento em dias alternados;
- Avaliação da atividade antibiofilme de StigA8 e StigA18 por MEV em cepa de *S. aureus* UFPEDA 1058;
- Avaliar o mecanismo de morte por citometria de fluxo de StigA8 e StigA18 em cepa de *S. aureus* UFPEDA 1058;
- Finalizar a interpretação dos dados de Ressonância Magnética Nuclear de StigA8 e StigA18 (RMN).
- Finalizar o manuscrito a ser submetido na revista: *International Journal of Antimicrobial Agents* (Fator de impacto: 4,621).

REFERÊNCIAS

- ABACHIN, E. et al. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 1–14, jan. 2002.
- ABDEL-RAHMAN, M. A. et al. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 349–359, mar. 2009.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; HARRISON, P. L.; STRONG, P. N. Snapshots of scorpion venomics. **Journal of Arid Environments**, v. 112, n. PB, p. 170–176, 2015.
- AHMADI, S. et al. Scorpion Venom: Detriments and Benefits. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 118, 12 maio 2020.
- AL AKEEL, R. et al. Alanine rich peptide from *Populus trichocarpa* inhibit growth of *Staphylococcus aureus* via targetting its extracellular domain of Sensor Histidine Kinase YycGex protein. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, n. May, p. 115–122, ago. 2018.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. et al. Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 484–489, 2013.
- ALMAAYTAH, A. et al. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. **Peptides**, v. 35, n. 2, p. 291–299, 2012.
- 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, n. 4, p. 281–293, 21 dez. 2013.
- ALMAAYTAH, A. et al. A3, a Scorpion Venom Derived Peptide Analogue with Potent Antimicrobial and Potential Antibiofilm Activity against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Gram Positive Bacteria. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1603, 2 jul. 2018.
- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A

review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.

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.

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.

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. 623, 31 jan. 2019.

ANAND, P. et al. Antitumor effects of Tv1 venom peptide in liver cancer. **bioRxiv**, v. 2, p. 1–27, 2019.

ARAÚJO, K. A. M. et al. Epidemiological study of scorpion stings in the Rio Grande do Norte State, Northeastern Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of tropical medicine**, v. 59, p. 1–9, 2017.

ASSARAF, Y. G. et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 46, p. 100645, set. 2019.

BAEK, M.-H. et al. Lipopolysaccharide-bound structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 4, p. 214–221, abr. 2016.

BARRIERE, S. L. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 151–153, 2015.

BEA, R. D. L. S.; PETRAGLIA, A. F.; JOHNSON, L. E. L. DE. Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides. **Toxicon**, v. 101, p. 79–84, jul. 2015.

BERGERON, Z.; BINGHAM, J.-P. Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. **Toxins**, v. 4, n. 11, p. 1082–1119, 1 nov. 2012.

- BHAVYA, J. et al. Scorpion Toxin Polypeptides as Therapeutic Agents: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 9, p. 848–859, 8 ago. 2016.
- BORDON, K. C. F. et al. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 43, p. 1–12, 22 dez. 2015.
- BOUCHER, H. W. et al. 10 × '20 progress - Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1685–1694, 2013.
- BOURINET, E.; ZAMPONI, G. W. Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 1–7, dez. 2016.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. Manual de controle de escorpiões/Ministério da saúde, secretaria de Vigilância em saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica. – Brasília. [s.l.: s.n.].
- BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. 1ª ed. SALVADOR: EDUFBA: [s.n.].
- BRINCKERHOFF, L. H. et al. Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1 27-35 peptide: Implications for peptide vaccines. **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 3, p. 326–334, 29 out. 1999.
- BUCARETCHI, F. et al. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331–336, 1995.
- BUCARETCHI, F. et al. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, v. 89, p. 17–25, 2014.
- BULET, P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 329–344, 1999.
- CAI, Y.; LEE, W.; KWA, A. L. Polymyxin B versus colistin: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 12, p. 1–19, 2 dez. 2015.

- CAMPOS, M. A. et al. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107–7114, dez. 2004.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- CHIBEBE JUNIOR, J. et al. Photodynamic and Antibiotic Therapy Impair the Pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a Whole Animal Insect Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55926, 14 fev. 2013.
- CICCARELLI, A. B. et al. Antiparasitic effect of vitamin B12 on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5315–5320, 2012.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard-Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A10.**, v. 35, n. 2, p. 3–110, 2015.
- COLOGNA, C. et al. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 920–932, 1 ago. 2009.
- COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, n. 1, p. 155–167, 1986.
- 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, 1 out. 2001.
- CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642–649, 2015a.
- CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 639–641, dez. 2015b.
- D'SOUZA, A. et al. Designed Heme-Cage β -Sheet Miniproteins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 21, p. 5904–5908, 15 maio 2017.
- 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. 3967–72, 2008.

- 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, out. 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. March 2021, p. 170478, mar. 2021.
- DARVEAU, R. P. et al. β -lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 6, p. 1153–1159, 1 jun. 1991.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, dez. 1999.
- DENNISON, S. R. et al. The effect of C-terminal amidation on the efficacy and selectivity of antimicrobial and anticancer peptides. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 332, n. 1–2, p. 43–50, 10 dez. 2009.
- DESHPANDE, D. et al. Super-Resolution Microscopy Reveals a Direct Interaction of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* with the Antimicrobial Peptide LL-37. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6741, 14 set. 2020.
- DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV GERCEKER, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 95–103, 2016.
- DOUGLAS, A. E. Simple animal models for microbiome research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 764–775, 15 dez. 2019.
- DU, Q. et al. Cationicity-Enhanced Analogues of the Antimicrobial Peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the Venom of the Scorpion, *Androctonus crassicauda*, Display Potent Growth Modulation Effects on Human Cancer Cell Lines. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1097–1107, 2014.
- 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 an. **Toxins**, v. 7, n. 2, p. 219–237, 23 jan. 2015.
- DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm : structure , function , and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, p. 2–16, 2012.
- EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 1, p. 140–144, 1 jan. 1984.
- EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. **Molecular BioSystems**, v. 5, p. 580–587, 2009.
- ESPOSITO, L. A. et al. Systematic Revision of the Neotropical Club-Tailed Scorpions, *Physoctonus*, *Rhopalurus*, and *Troglophalurus* , Revalidation of *Heteroctenus*, and Descriptions of Two New Genera and Three New Species (Buthidae: Rhopalurusinae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 415, p. 1–134, jun. 2017.
- FAN, Z. et al. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5220–5229, 2011.
- FOUNOU, R. C.; FOUNOU, L. L.; ESSACK, S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–18, 2017.
- 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.
- FURTADO, A. A. et al. Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review. **Toxicon**, v. 185, n. April, p. 36–45, out. 2020.
- FUZITA, F. J. et al. Biochemical, Transcriptomic and Proteomic Analyses of Digestion in the Scorpion *Tityus serrulatus*: Insights into Function and Evolution of Digestion in an Ancient Arthropod. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. 1–31, 2015.
- GALAR, A. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Valve Endocarditis:

Pathophysiology, Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1373–1392, 13 fev. 2019.

GAO, B. et al. Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1230–1245, 2009.

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

GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–16, 2013.

GJØDSBØL, K. et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: A longitudinal study. **International Wound Journal**, v. 3, n. 3, 2006.

GRANIER, C. et al. Immunothérapie des cancers : rationnel et avancées récentes. **La Revue de Médecine Interne**, v. 37, n. 10, p. 694–700, out. 2016.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–12, 2013.

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. 1784–94, 2013.

HANCOCK, R. E. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 3, p. 156–164, 2001.

HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. **The Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418–422, fev. 1997.

HAO, G. et al. The intracellular mechanism of action on *Escherichia coli* of BF2-A/C, two analogues of the antimicrobial peptide Buforin 2. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 200–206, 27 abr. 2013.

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

- HARRISON, P. L. et al. Phospholipid dependent mechanism of smp24, an α -helical antimicrobial peptide from scorpion venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2737–2744, 2016.
- HERNÁNDEZ-APONTE, C. A. et al. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 84–92, 2011.
- HUANG, Y.-B. et al. Role of Helicity on the Anticancer Mechanism of Action of Cationic-Helical Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6849–6862, 5 jun. 2012.
- HUANG, Y. et al. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. **Protein & Cell**, v. 5, n. 8, p. 631–642, 9 ago. 2014.
- JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843–3845, 1 jul. 2000.
- JANKOWSKI, M. D. et al. Sialic acid on avian erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 238, p. 110336, dez. 2019.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.
- JERAM, A. J. Phylogeny , classification and evolution of Silurian and Devonian scorpions. **Proceedings of the 17th European Colloquium of Arachnology Edinburgh 1997**, n. 1989, p. 17–31, 1998.
- JIANG, Z. et al. “Specificity Determinants” Improve Therapeutic Indices of Two Antimicrobial Peptides Piscidin 1 and Dermaseptin S4 Against the Gram-negative Pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 4, p. 366–391, 25 mar. 2014.
- JOHANSSON, J. et al. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3718–3724, 6 fev. 1998.
- JUNQUEIRA, J. C. et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have

- similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 247, 2011.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.
- KIM, M. K. et al. Mechanisms driving the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1763, 29 dez. 2018.
- KIRKETERP-MOLLER, K. et al. Distribution, Organization, and Ecology of Bacteria in Chronic Wounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2717–2722, 2008.
- KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 7, p. 517–528, 2019.
- KRAGOL, G. et al. The Antibacterial Peptide Pyrrocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding †. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3016–3026, mar. 2001.
- LAXIO ARENAS, J.; KAFFY, J.; ONGERI, S. Peptides and peptidomimetics as inhibitors of protein–protein interactions involving β -sheet secondary structures. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 157–167, out. 2019.
- LEE, C.-S.; TUNG, W.-C.; LIN, Y.-H. Deletion of the carboxyl-terminal residue disrupts the amino-terminal folding, self-association, and thermal stability of an amphipathic antimicrobial peptide. **Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society**, v. 20, n. 6, p. 438–45, 2014.
- LEE, T.-H.; N. HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 16 set. 2016.
- LI, Y. J. et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. **Chinese journal of cancer**, v. 36, n. 1, p. 52, 2017.
- LIU, L.; FANG, Y.; WU, J. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2479–2486, nov. 2013.

- LOURENÇO, W. R.; VON EICKSTEDT, V. R. D. Sinopse das espécies de *Tityus* do nordeste do Brasil, com a redescritção da *T. neglectus* Mello-Leitão (Scorpiones, Buthidae). **Revista Brasileira de zoologia**, v. 5, n. 3, p. 399–408, 1988.
- LUNA-RAMÍREZ, K. et al. Membrane interactions and biological activity of antimicrobial peptides from Australian scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2140–2148, set. 2014.
- LV, B. et al. Neo-5,22E-cholestadienol derivatives from *Buthus martensii* karsch and targeted bactericidal action mechanisms. **Molecules**, v. 24, n. 72, p. 1–17, 2019.
- 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.
- 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 : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 101, p. 11–18, 2015.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F. et al. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922). **Toxicon**, p. 1–44, set. 2016.
- MARTÍNEZ-PULGARÍN, S. et al. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models Printed in Great Britain. p. 1505–1515, 2009.
- MCBRIDE, S. M.; SONENSHEIN, A. L. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1457–1465, 2011.
- MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**, v. 90, p. 269–281, 2017.
- MCGWIRE, B. S. et al. Killing of African Trypanosomes by Antimicrobial Peptides. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 1, p. 146–152, jul. 2003.

- 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, 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.
- 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, p. 91–98, 2017.
- MENEZES, Y. A. S. et al. Protein-Rich Fraction of *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur Leaves: Enzymatic Characterization and Procoagulant and Fibrinolytic Activities. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3552–3569, 2014.
- MIHAILESCU, M. et al. Structure and Function in Antimicrobial Piscidins: Histidine Position, Directionality of Membrane Insertion, and pH-Dependent Permeabilization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 25, p. 9837–9853, 26 jun. 2019.
- MILLE, B. G. et al. Transcriptomic approach reveals the molecular diversity of Hottentotta conspersus (Buthidae) venom. **Toxicon**, v. 99, p. 73–79, 2015.
- MISHRA, B. et al. Antibacterial, antifungal, anticancer activities and structural bioinformatics analysis of six naturally occurring temporins. **Peptides**, v. 106, n. 10, p. 9–20, ago. 2018.
- MONDAL, S. et al. Formation of functional super-helical assemblies by constrained single heptad repeat. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8615, 15 dez. 2015.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, maio 2017.
- MOSKOWITZ, S. M.; ERNST, R. K.; MILLER, S. I. PmrAB, a Two-Component Regulatory System of *Pseudomonas aeruginosa* That Modulates Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Addition of Aminoarabinose to Lipid A. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 2, p. 575–579, 2004.
- MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–24, 1 abr. 2019.

- MURA, M. et al. The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides. **European Biophysics Journal**, v. 45, n. 3, p. 195–207, 8 abr. 2016.
- NASCIMENTO, D. G. et al. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 628–639, 2006.
- 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.
- NEVES, R. F. C. DAS et al. Trypanosoma cruzi : cell surface dynamics in trypomastigotes of different strains. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 310–321, 18 mar. 2019.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.
- NICOLINI, A. et al. A new immunotherapy schedule in addition to first-line hormone therapy for metastatic breast cancer patients in a state of clinical benefit during hormone therapy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 98, n. 3, p. 375–382, 29 mar. 2020.
- NIRTHANAN, S. et al. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 669–678, fev. 2005.
- NORTON, R. S.; CHANDY, K. G. Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 124–138, dez. 2017.
- ODDO, A.; HANSEN, P. R. Antimicrobial Peptides. In: HANSEN, P. R. (Ed.). . **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1548p. 427–434.
- OJANGUREN-AFFILASTRO, A. A. et al. Molecular Phylogenetics and Evolution Dated phylogenetic studies of the southernmost American buthids (Scorpiones ; Buthidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 110, p. 39–49, 2017.
- ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–135, jan. 2015.

- PARENTE, A. et al. Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 161, 18 abr. 2018.
- PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, n. 1, p. 253–257, mar. 1998.
- PEDRON, C. N. et al. The effect of lysine substitutions in the biological activities of the scorpion venom peptide VmCT1. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 136, p. 104952, ago. 2019.
- PEDRON, C. N. et al. Arg-substituted VmCT1 analogs reveals promising candidate for the development of new antichagasic agent. **Parasitology**, p. 1–9, 2 out. 2020.
- PELEG, A. Y. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2605–2609, 1 jun. 2009.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.
- PESSINI, A. C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: Isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495–1504, 2001.
- PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 249–253, 2012.
- PINTO, E. G. et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, 2014.
- POYART, C. et al. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1615–1625, 2003.
- PRENDINI, L.; WHEELER, W. C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy. **Cladistics**, v. 21, p. 446–494, 2005.

- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328–342, 2013.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, jun. 2012.
- REIN, J. O. The scorpion files. Accessed at <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>, May, 2020., 2020.
- RODRIGUES, E. G. et al. Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma By the Antimicrobial Peptide Gomesin. **Neoplasia**, v. 10, n. 1, p. 61–68, jan. 2008.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1155–1161, 2010.
- ROMEO, D. et al. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9573–9575, 1988.
- ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.
- RUSSELL, A. L. et al. The effect of the length and flexibility of the side chain of basic amino acids on the binding of antimicrobial peptides to zwitterionic and anionic membrane model systems. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1723–1739, 2012.
- SANI, M. A.; SEPAROVIC, F. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. **Accounts of Chemical Research**, 2016.
- SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; POSSANI, L. D. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. **Toxicon**, p. 317–326, 2015.
- SANTO, K. P.; IRUDAYAM, S. J.; BERKOWITZ, M. L. Melittin creates transient pores in a lipid bilayer: Results from computer simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 17, p. 5031–5042, 2013.

- SANTOS, M. D. S. et al. Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). **ZooKeys**, v. 435, p. 49–61, 2014.
- SCHMIDT, R.; YONGHONG, D.; HOFFMANN, R. Phospholipid composition of the outer membrane of *Escherichia coli* influences its susceptibility against antimicrobial peptide apidaecin 1b. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 90, n. 4, p. 316–323, 2018.
- SIKORSKA, E. et al. Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides. **Journal of Structural Biology**, v. 168, n. 2, p. 250–258, nov. 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 Ciências**, v. 88, p. 665–675, 2016.
- SONG, I. K.; KANG, Y. K. Puckering Transition of 4-Substituted Proline Residues. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 35, p. 16982–16987, set. 2005.
- SOUZA, C. A. R. et al. On the *Tityus stigmurus* complex (scorpiones, Buthidae). **Zootaxa**, n. 1987, p. 1–38, 2009.
- STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.
- SWOBODA, J. G. et al. Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. **ChemBiochem.**, v. 11, n. 1, p. 35–45, 2010.
- TAN, S.-H.; WOLFF, A. C. Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists in Premenopausal Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 7, n. 6, p. 455–464, fev. 2007.
- THEVISSSEN, K. et al. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9531–9536, 15 ago. 2000.
- THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*

- Bloodstream Infections. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 343–364, 23 maio 2016.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 1 jan. 2016.
- 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. February, p. 109830, 2019.
- TRACY, R. P. The Five Cardinal Signs of Inflammation : Calor , Dolor ,. **Journal of Gerontology**, v. 61A, n. 10, p. 1051–1052, 2006.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 3, 26 dez. 2018.
- TYTGAT, J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 11, p. 444–447, 1999.
- ULVATNE, H. Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 461–467, 1 out. 2002.
- VAHDATPOUR, T. et al. The Systematic Review of Proteins Digestion and New Strategies for Delivery of Small Peptides. **Electronic Journal of Biology**, v. 12, n. 3, p. 265–275, 2016.
- VAN DER MEIJDEN, A. et al. Target-Specificity in Scorpions; Comparing Lethality of Scorpion Venoms across Arthropods and Vertebrates. **Toxins**, v. 9, n. 10, p. 312, 4 out. 2017.

- VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. November, p. 1–17, 28 nov. 2019.
- VILJANEN, P.; VAARA, M. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 25, n. 6, p. 701–705, 1 jun. 1984.
- VON EICKSTEDT, V. R. D. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 48, p. 133–137, 1984.
- WANG, X.; WANG, G. Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2016.
- WARD, M. J.; ELLSWORTH, S. A.; NYSTROM, G. S. A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. **Toxicon**, v. 151, n. July, p. 137–155, 2018.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2007.
- WU, J. A. et al. Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3407–3414, 2003.
- XU, D. et al. AIDA: Ab initio domain assembly server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 308–313, 2014.
- XU, Y. et al. Scorpion Toxins Targeting Voltage-gated Sodium Channels Associated with Pain. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. October, p. 848–855, 2018.
- 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, jan. 2011.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.
- ZENG, X.-C. et al. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*.

Peptides, v. 45, p. 28–34, jul. 2013.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p. 13–21, 2005.

ZHANG, C.; YANG, M.; ERICSSON, A. C. Antimicrobial Peptides: Potential Application in Liver Cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1257, 5 jun. 2019.

ZHIJIAN, C. et al. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 348–355, 2006.

ZHONG, L.; JOHNSON, W. C. Environment affects amino acid preference for secondary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 4462–4465, 1992.

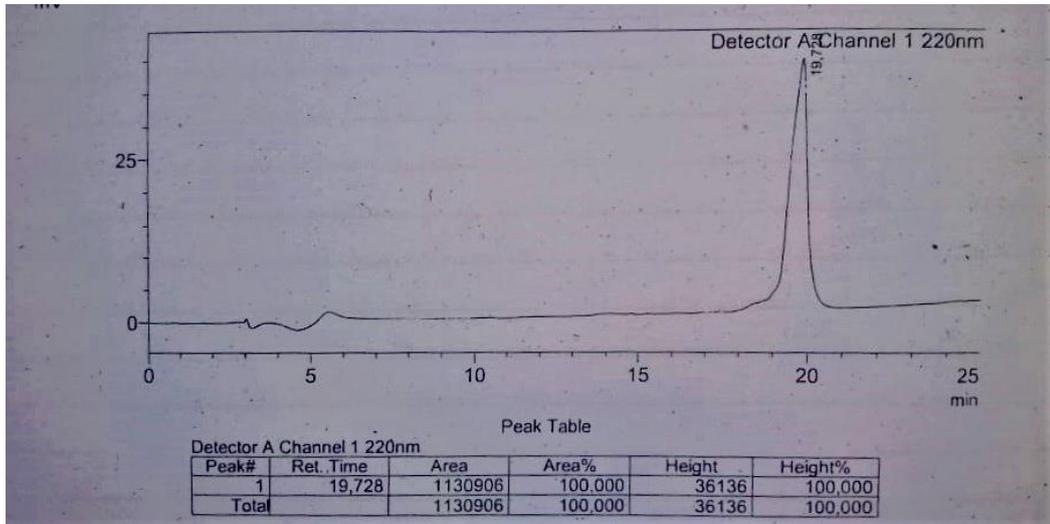
ZHU, L. et al. Two recombinant α -like scorpion toxins from *Mesobuthus eupeus* with differential affinity toward insect and mammalian Na⁺ channels. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1732–1740, 2013.

ZHU, X. et al. Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity. **Acta Biomaterialia**, v. 18, p. 155–167, maio 2015.

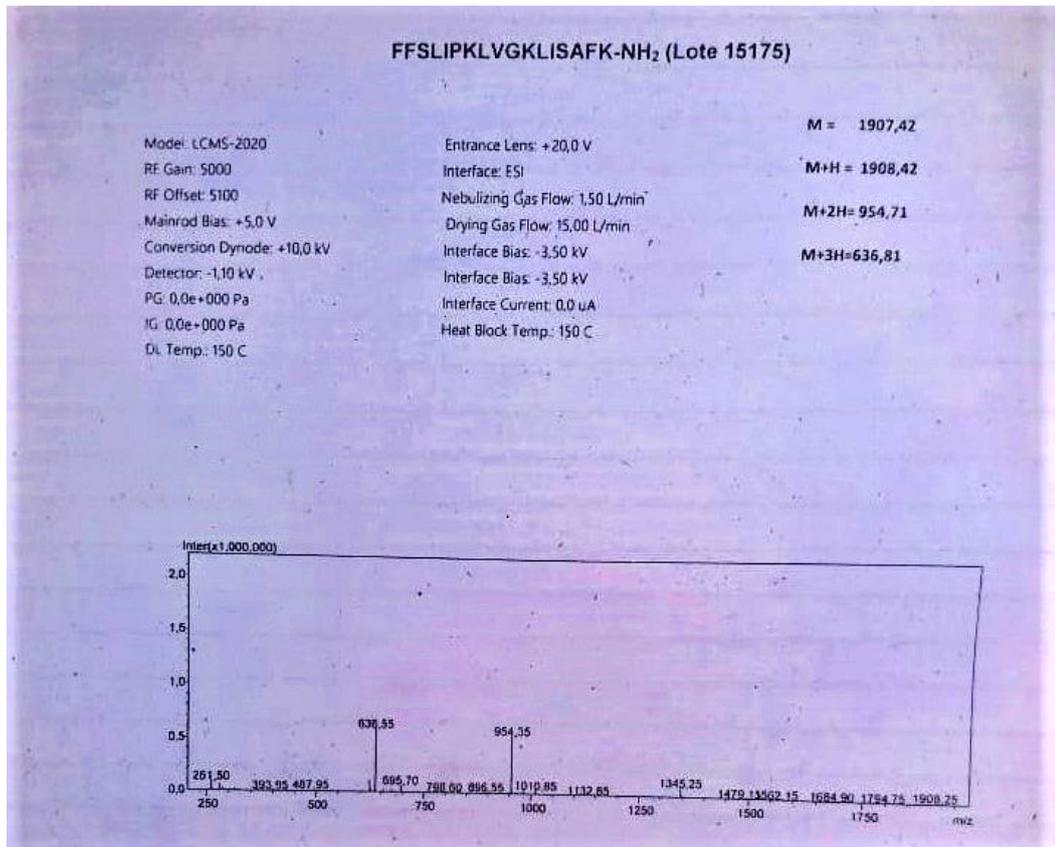
ZOU, R. et al. Activity of Antimicrobial Peptide Aggregates Decreases with Increased Cell Membrane Embedding Free Energy Cost. **Biochemistry**, v. 57, n. 18, p. 2606–2610, 8 maio 2018.

ANEXOS

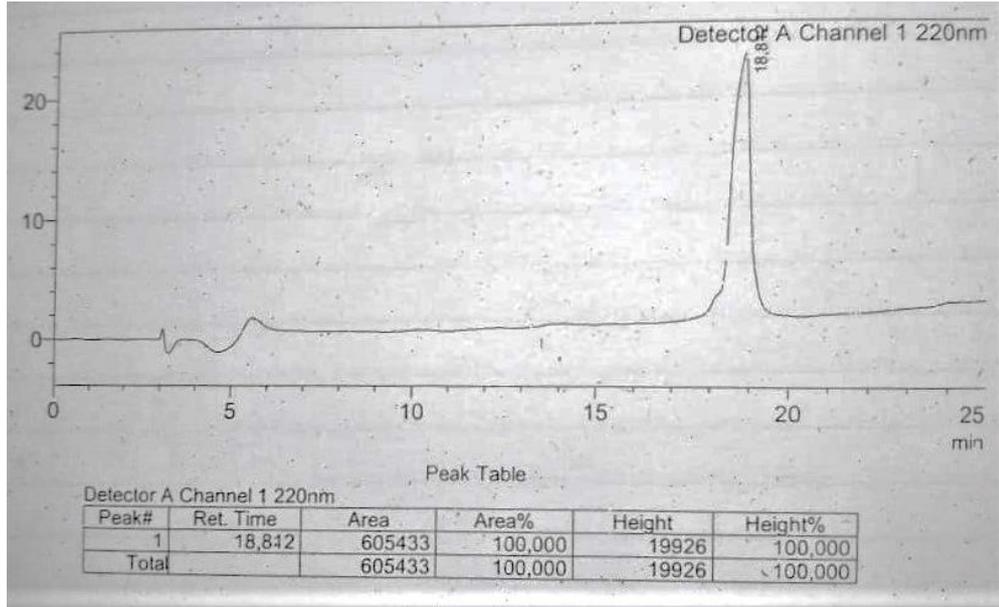
ANEXO A



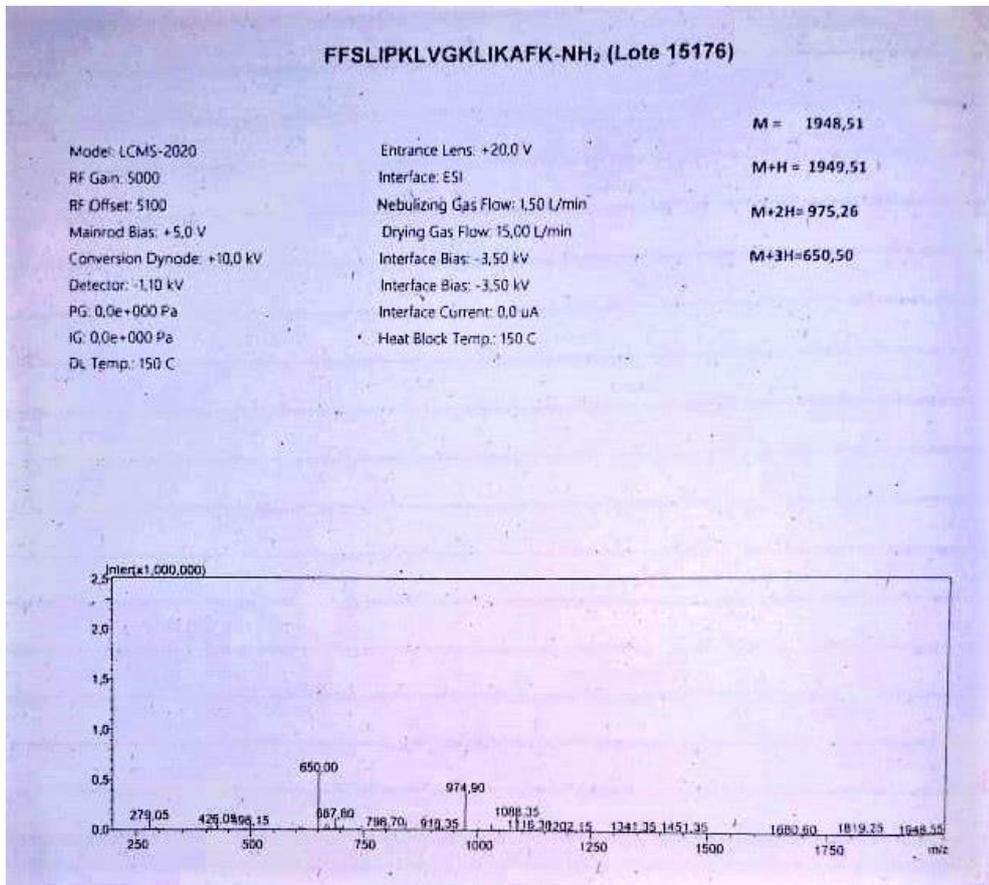
Anexo A.1. Análise por Cromatografia de Alta Eficiência de StigA8. Laudo fornecido pela empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil)



Anexo A.2. Análise por Espectrometria de Massas de StigA8. Laudo fornecido pela empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil).



Anexo A.3. Análise por Cromatografia de Alta Eficiência de StigA18. Laudo fornecido pela empresa *AminoTech* Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil).



Anexo A.4. Análise por Espectrometria de Massas de StigA18. Laudo fornecido pela empresa *AminoTech* Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil).

ANEXO B

PRODUÇÃO CIENTÍFICA COMO PRIMEIRA AUTORA

Toxicon 185 (2020) 36–45

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Toxicon

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/toxicon>

Review

Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review

Allanny Alves Furtado, Alessandra Daniele-Silva, Arnóbio Antônio da Silva-Júnior, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa*

Laboratory of Technology and Pharmaceutical Biotechnology (Techiofar), Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Petrópolis, Natal, 59012-570, Brazil



PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM COLABORAÇÃO

Journal of Ethnopharmacology 264 (2021) 113229



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect

Renato Dantas-Medeiros^{a,*,**}, Allanny Alves Furtado^b, Ana C. Zanatta^{c,d}, Manoela Torres-Rêgo^b, Estela Mariana Guimarães Lourenço^a, Jovelina Samara Ferreira Alves^a, Éder Galinari^e, Hugo Alexandre de Oliveira Rocha^f, Gerlane Coelho Bernardo Guerra^g, Wagner Vilegas^d, Thiago Antônio de Sousa Araújo^h, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa^b, Silvana Maria Zucolotto^{a,*}



pharmaceutics



Article

Chitosan Film Containing *Mansoa hirsuta* Fraction for Wound Healing

Joquebede Rodrigues Pereira¹, Gabriela Suassuna Bezerra², Allanny Alves Furtado², Thaís Gomes de Carvalho³, Valéria Costa da Silva⁴, Amanda Lins Bispo Monteiro⁵, Gerlane Coelho Bernardo Guerra⁴, Raimundo Fernandes de Araújo Júnior³, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana⁶, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa², Daniel de Melo Silva⁷, Eduardo Pereira de Azevedo⁸, Tania Maria Sarmiento Silva⁵, Telma Maria Araújo Moura Lemos¹ and Ádley Antonini Neves de Lima^{2,*}

Received: 21 April 2020; Accepted: 22 May 2020; Published: 27 May 2020

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2020) 53(10): e10204, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X202010204>
ISSN 1414-431X Research Article



1/8

Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the isatin derivative (Z)-2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)-N-phenyl-hydrazinecarbothioamide in mice

L.L.S.F.R. Dantas¹, A.G. Fonseca¹, J.R. Pereira¹, A.A. Furtado², P.A.T.M. Gomes³, M.F. Fernandes-Pedrosa^{1,2,4}, A.C.L. Leite^{3,5}, M.J.B.M. Rêgo⁶, M.G.R. Pitta⁶, and T.M.A.M. Lemos^{1,7}



Article

Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity

Adriana M. S. Parente^{1,3}, Alessandra Daniele-Silva¹, Allanny A. Furtado^{1,3}, Menilla A. Melo^{1,2}, Ariane F. Lacerda^{1,2}, Moacir Queiroz³, Cláudia Moreno³, Elizabeth Santos^{1,2} , Hugo A. O. Rocha³, Euzébio G. Barbosa² , Eneas Carvalho⁴, Arnobio A. Silva-Júnior^{1,2}, Marcelo S. Silva^{2,3,5} and Matheus de F. Fernandes-Pedrosa^{1,2,3,*}

Received: 6 March 2018; Accepted: 14 April 2018; Published: 18 April 2018



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Analogs from the Scorpion Peptide Stigmurin

Bruno Amorim-Carmo¹ , Alessandra Daniele-Silva¹, Adriana M. S. Parente¹, Allanny A. Furtado¹, Eneas Carvalho², Johnny W. F. Oliveira³, Elizabeth C. G. Santos¹ , Marcelo S. Silva^{3,4} , Sérgio R. B. Silva⁵ , Arnóbio A. Silva-Júnior¹ , Norberto K. Monteiro⁶ and Matheus F. Fernandes-Pedrosa^{1,*}

Received: 20 December 2018; Accepted: 24 January 2019; Published: 31 January 2019



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Aspidosperma pyriformium Has Anti-Inflammatory Properties: An Experimental Study in Mice with Peritonitis Induced by *Tityus serrulatus* Venom or Carrageenan

Maíra Conceição Jerônimo de Souza Lima¹, Mariana Angélica Oliveira Bitencourt¹, Allanny Alves Furtado¹, Manoela Torres-Rêgo¹ , Emerson Michell da Silva Siqueira², Ruth Medeiros Oliveira³, Hugo Alexandre Oliveira Rocha³ , Keyla Borges Ferreira Rocha⁴, Arnóbio Antônio da Silva-Júnior¹, Silvana Maria Zucolotto² and Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa^{1,*}

Received: 15 September 2017; Accepted: 20 October 2017; Published: 26 October 2017



Article

Phytochemical Analysis by HPLC–HRESI-MS and Anti-Inflammatory Activity of *Tabernaemontana catharinensis*

José Ivan Marques ^{1,*}, Jovelina Samara Ferreira Alves ¹, Manoela Torres-Rêgo ² , Allanny Alves Furtado ², Emerson Michell da Silva Siqueira ¹, Eder Galinari ¹, Daline Fernandes de Souza Araújo ³, Gerlane Coelho Bernardo Guerra ⁴, Eduardo Pereira de Azevedo ⁵, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa ²  and Silvana Maria Zucolotto ^{1,*}

Received: 22 November 2017; Accepted: 13 January 2018; Published: 24 February 2018



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 003529 3

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATOS E FRAÇÕES RICOS EM FENÓIS E FLAVONOIDES OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DA ESPÉCIE *Tabernaemontana catharinensis* A.DC.

Resumo: Refere-se a formulações farmacêuticas contendo extratos e frações ricos em fenóis e flavonoides obtidos de diferentes partes da espécie *Tabernaemontana catharinensis* A.DC com ação anti-inflamatória, para uso humano e veterinário. Na forma de gel, o tratamento será via tópica para doenças que apresentam processo inflamatório e em cápsulas, será feito o uso oral. Outras formas farmacêuticas podem ser desenvolvidas para tratar diferentes processos inflamatórios. Estudo prévio conduzido com o extrato das folhas de *T. catharinensis*, para avaliar o efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina, mostrou que o extrato foi eficaz na redução do edema, quando administrado via oral, antes e após a indução da inflamação por um agente flogístico.

APÊNDICES

APÊNDICE A

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

<i>Aminoácidos</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Cadeia lateral (Grupo R)</i>
Glicina	G	Gly	Apolar alifática
Alanina	A	Ala	Apolar alifática
Valina	V	Val	Apolar alifática
Leucina	L	Leu	Apolar alifática
Isoleucina	I	Ile	Apolar alifática
Metionina	M	Met	Apolar alifática
Prolina	P	Pro	Apolar alifática
Fenilalanina	F	Phe	Apolar aromática
Triptofano	W	Trp	Apolar aromática
Tirosina	Y	Tyr	Polar alifática
Serina	S	Ser	Polar alifática
Treonina	T	Thr	Polar alifática
Asparagina	N	Asn	Polar alifática
Glutamina	Q	Gln	Polar alifática
Cisteína	C	Cys	Polar alifática
Lisina	K	Lys	Carregada positivamente
Arginina	R	Arg	Carregada positivamente
Histidina	H	His	Carregada positivamente
Ácido Aspártico	D	Asp	Carregada negativamente
Ácido Glutâmico	E	Glu	Carregada negativamente

Fonte: autoria própria.