



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

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

LUCAS BIANCHI NUNES

CAMPO GRANDE – MS
2018

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

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

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração Biotecnologia aplicada à Saúde.

Orientador: Prof Dr. Ludovico Migliolo

Coorientador: Prof Dr. Octávio Luiz Franco

CAMPO GRANDE – MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

N972d Nunes, Lucas Bianchi

Desenho racional de peptídeos antibacterianos análogos a toxina do
escorpião *Tityus sp.* / Lucas Bianchi Nunes; orientador Ludovico Migliolo;
coorientador Octávio Luis Franco. -- 2018
72 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Bactérias patogênicas 2. Peptídeos antimicrobianos 3. Biotecnologia
I. Migliolo, Ludovico. II. Franco, Octávio Luiz. III. Título.

CDD: 660.6

Desenho Racional de Peptídeos Antibacterianos Análogos a Toxina do Escorpião *Tityus* sp

Autor: Lucas Bianchi Nunes

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo


Coorientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

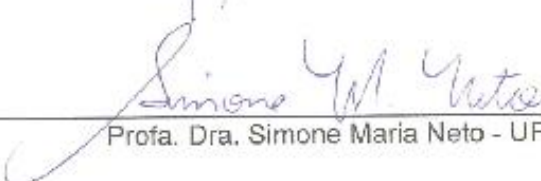
APROVADO em 08 de maio de 2018.



Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB



Profa. Dra. Maria Claudia da Silva - UCDB



Profa. Dra. Simone Maria Neto - UFMS

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço ao meu Deus, sou grato pela sua graça que se derramou sobre minha vida, mesmo eu sendo limitado o Senhor é fiel em me abençoar.

Eu agradeço sinceramente a todas as pessoas do laboratório S-INOVA da Universidade Católica Dom Bosco. Principalmente ao Professor Doutor Ludovico Migliolo, grande orientador, e ao Professor Doutor Octávio Luiz Franco, os quais também se empenharam neste trabalho.

Agradeço à minha mãe, Rosária Bianchi, a qual me suportou, de todas as formas, nesta jornada árdua e estressante. À minha noiva Yasmin Benitez Martins, a qual me acompanhou nos momentos bons e ruins desta jornada. De forma geral, a todos os meus familiares pelos conselhos e críticas que foram essenciais neste processo.

Ao meu grande parceiro de conversas e artes no Photoshop essenciais para o desenvolvimento intelectual e gráfico deste trabalho, Marcos Ferreira, também conhecido como "grande Stifler". De igual maneira, agradeço aos meus colegas e parceiros de caminhada Breno, Patrícia e Elisângela.

Gostaria de agradecer a banca examinadora formada pelo Professora Doutora Maria Cláudia e Simone.

Por fim, e de fundamental importância, agradeço à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que contribuíram com recursos financeiros para a realização deste trabalho.

A todos, o meu mais sincero obrigado!

BIOGRAFIA

Lucas Bianchi Nunes, nascido em Campo Grande no dia 02/04/1993, MS, filho de Rosária Bianchi e Luis Carlos Leite Nunes. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) sendo bolsista da Fundect. Graduado em Enfermagem pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O combate à infecções e o surgimento das resistências aos antibióticos	1
1.2	A possibilidade dos Peptídeos Antimicrobianos.....	4
1.3	Estrutura molecular dos PAMs e sua interação com estruturas biológicas.....	5
1.4	Utilização de PAM na clínica médica	7
1.5	Disposição de PAM na natureza e em escorpiões.....	7
1.6	Entendendo a biologia de escorpiões e sua relação com PAM	10
1.7	Aplicação do Desenho Racional e Modelagem Molecular no desenvolvimento de moléculas bioativas	14
1.7.1	Modelagem Molecular (MM).....	15
1.7.2	<i>Docking</i> (Docagem ou atracamento molecular) e Dinâmica molecular	17
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Geral:.....	18
2.2	Específicos:.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Desenho racional e predição dos análogos do peptídeo TsAP-1	19
3.2	Síntese, Espectrometria de massa e quantificação do produto	20
3.3	Análises estruturais <i>in silico</i>	20
3.3.1	Alinhamento e modelagem molecular	20
3.3.2	Estudo em <i>Docking</i> (Docagem Molecular)	20
3.4	Quantificação dos peptídeos.....	21
3.5	Análise funcional <i>in vitro</i>	21
3.5.1	Ensaio hemolítico	21
3.5.2	Ensaio antibacterianos	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Desenho racional e síntese de análogos do TsAP1	23
4.1.1	Alinhamento e modelagem molecular	27
4.2	Validação dos modelos tridimensionais	29
4.3	Estudo em <i>Docking</i> (Docagem Molecular).....	34
4.4	Síntese dos peptídeos	52
4.5	Bioensaios com bactérias	52
5	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expectativa de mortes por micro-organismos em 2050.....	1
Figura 2 - Mecanismos de seleção e resistência bacteriana.....	3
Figura 3 - Mecanismos de ação de PAMs na membrana bacteriana.....	5
Figura 4 - Estrutura de PAMs Estrutura de PAMs.....	6
Figura 5 - Disposição de peptídeos purificados a partir de toxinas de escorpiões. Legenda: As cores correspondem ao peptídeo na legenda à direita do gráfico.....	8
Figura 6 - Escorpião <i>Tytilus serrulatus</i>	11
Figura 7 - Composição da peçonha de escorpiões <i>Tityus</i>	12
Figura 8- Disposição helicoidal dos resíduos de aminoácidos.....	23
Figura 9 - Resultado do gráfico de Ramachandran para o TsAP-1 e os peptídeos B1, B2, B3 e B4 desenhados racionalmente.	33
Figura 10- Interação entre o TsAP-1 e a membrana aniônica.	35
Figura 11 - Interação entre o TsAP-1 e a membrana catiônica.....	35
Figura 12 - Interação in silico entre TsAP-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.	36
Figura 13 - Interação entre o Butylatus-1 e a membrana aniônica.	37
Figura 14 - Interação entre o Butylatus-1 e a membrana catiônica.....	38
Figura 15 - Interação in silico entre Butylatus-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.	39
Figura 16- Interação entre o Butylatus-2 e a membrana aniônica.	40
Figura 17- Interação entre o Butylatus-2 e a membrana catiônica.....	41
Figura 18 - Interação in silico entre Butylatus-2 e membranas miméticas aniônica e catiônicas.	42
Figura 19 - Interação entre o Butylatus-3 e a membrana aniônica.	43
Figura 20- Interação entre o Butylatus-3 e a membrana catiônica.....	44
Figura 21 - Interação in silico entre Butylatus-3 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.	45
Figura 22 - Interação entre o Butylatus-4 e a membrana aniônica.	46
Figura 23 - Interação entre o Butylatus-4 e a membrana catiônica.....	46
Figura 24 - Interação in silico entre Butylatus-4 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos de escorpiões, sua carga líquida e ação biológica.	9
Tabela 2 - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados.	25
Tabela 3 - Estruturas tridimensionais construídas pelo servidor <i>I-TASSER</i> para o peptídeo controle e os quatro análogos. Visualização pelo programa <i>PyMol</i>	28
Tabela 4 - Localização dos resíduos no Gráfico de <i>Ramachandran</i>	30
Tabela 5- Avaliação <i>in silico</i> das interações entre os peptídeos TsAP-1 e Butylatus-1, 2, 3 e 4 com membrana bacteriana mimética catiônica e aniônica.	50
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com os peptídeos Butylatus e o controle sintéticos e atividade hemolítica.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPE - 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

DPPG- 1,2-Dipalmitosil-glicero-3-fosfatidilglicerol

MM – Modelagem Molecular

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

PDB - Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*)

NaTx - Toxinas de canal de sódio

KTx - Toxinas de canal de potássio

BPPs - Peptídeos potencializadores de bradicinina

LPS - Lipopolissacarídeos

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CASP - Critical Assessment of protein Structure Prediction

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

RESUMO

Atualmente, as infecções bacterianas têm sido preocupação de governos e alvo de estudos, pois este é um problema em todo o mundo. As pessoas que mais sofrem são aquelas imunossuprimidas, sendo afetadas por super bactérias como *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* que provocam graves danos à saúde. Com o avanço da tecnologia e a prospecção de novas drogas, os peptídeos antimicrobianos (PAM) são candidatos a combater esses microrganismos e curar pessoas. Visando o melhoramento molecular dos PAMs, a metodologia de Desenho Racional de Peptídeos visa melhorar a atividade antibacteriana dessas moléculas e reduzindo efeitos adversos ao paciente. Os Butylatus são o resultado do desenho racional da toxina TsAP-1, do escorpião *Tytlus serrulatus*. Em relação aos resultados *in silico*, os peptídeos Butylatus apresentaram características de peptídeos antimicrobianos, baixa energia de interação nas membranas miméticas, boa estabilidade estrutural na membrana. Além disso, a atividade *in vitro* observada foi que os peptídeos apresentam atividade antimicrobiana e baixa atividade hemolítica. A partir desses resultados, é possível considerar os peptídeos Butylatus como candidatos a produtos biotecnológicos de interesse para a indústria farmacêutica e hospitalar.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas; Desenho racional; Peptídeos antimicrobianos; Estudo *in silico*.

ABSTRACT

Currently, bacterial infections have been government concern and targeted studies as this is a problem worldwide. The people who suffer most are those immunosuppressed, being affected by super bacteria like *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* that cause serious damage to health. With the advancement of technology and the prospection of new drugs, antimicrobial peptides (AMP) are candidates to fight these microorganisms and heal people. Aiming at the molecular improvement of AMPs, the methodology of Rational Peptide Design aims to improve the antibacterial activity of these molecules and reducing adverse effects to the patient. The Butylatus are the result of the rational design of the toxin TsAP-1, of the scorpion *Tytlus serrulatus*. In relation to the *in silico* results, Butylatus peptides presented characteristics of antimicrobial peptides, low interaction energy in the mimetic membranes, and good structural stability in the membrane. In addition, the *in vitro* activity observed was that the peptides present antimicrobial activity and low hemolytic activity. From these results, it is possible to consider Butylatus peptides as candidates for biotechnological products of interest to the pharmaceutical and hospital industry.

Keywords: Pathogenic bacteria; Rational design; Antimicrobial peptides; *In silico* study.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O combate à infecções e o surgimento das resistências aos antibióticos

Infecções bacterianas tem sido alvo da atenção dos estudos da comunidade médica, organizações de saúde e governos. Este problema global é tratado a partir de pesquisas de produtos no intuito de eliminar esses patógenos. Busca-se atingir esse objetivo por meio de fármacos que sejam eficazes e que causem menos efeitos adversos aos pacientes. Se por um lado a resistência bacteriana aos fármacos atualmente recomendados contribui para significativo aumento dos óbitos, por outro há gastos exorbitantes em tratamentos (GURGEL; CARVALHO, 2008; PEREIRA et al., 2005; WANNMACHER, 2004). Estima-se que, em breve, estaremos sem condições de tratar infecções bacterianas devido ao fato de não termos mais opções para deter sua resistência e multiplicação (VIANNA et al., 2016). A Figura 1 apresenta uma expectativa de mortes por microrganismos em 2050.

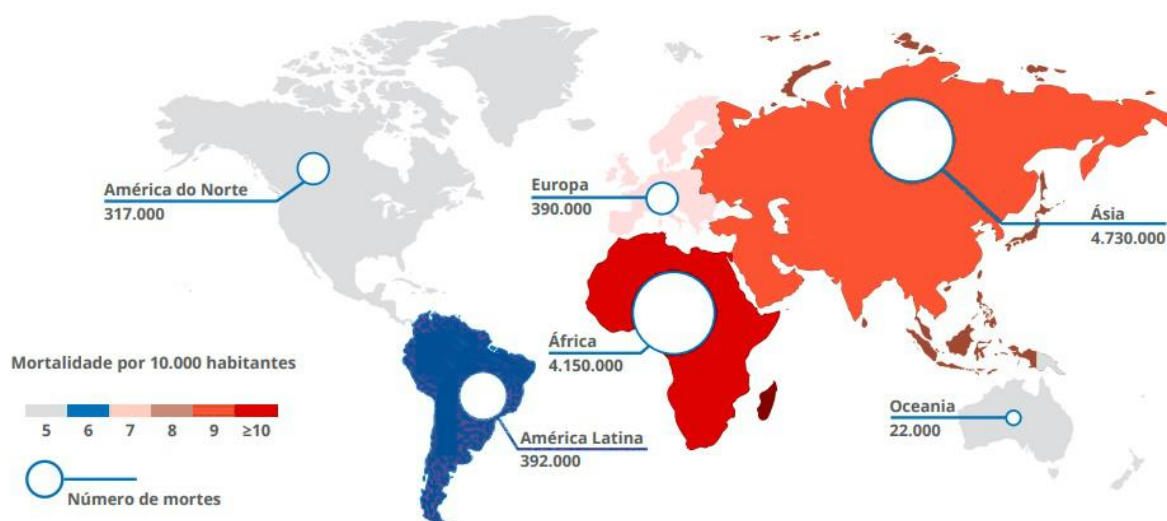


Figura 1 - Expectativa de mortes por micro-organismos em 2050.

Legenda: Mortalidade por 10.000 habitantes de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho).

Fonte: (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2016) (ADAPTADO).

Desde a descoberta dos antibióticos, uma guerra entre humanos e microrganismos foi iniciada e uma disputa entre o mais adaptado teve início. Embora os seres humanos possuam a ciência e o desenvolvimento tecnológico em mãos, a resistência microbiana é tão nociva e preocupante desde a descoberta dos

antibióticos. Em 1928, Alexander Fleming, descobridor da penicilina e pioneiro na era dos antibióticos, já observara em seus experimentos cepas bacterianas já resistentes à penicilina e que logo havia uma população resistente a substância. Fato que em pouco tempo tomara proporções bem maiores com o início da Segunda Guerra Mundial e o uso indiscriminado de antibióticos por médicos de campanha nos soldados feridos a fim curar infecções oriundas da batalha, assim logo havia uma cepa resistente à penicilina. Com o tempo, o uso antibióticos foi estendido à agricultura e criação de animais com o objetivo de aumentar a produção e reduzir perdas devido a pragas. Já em meados dos anos 50 a 70 novos antibióticos entram no mercado, tais como ampicilina e estreptomicina (VENTOLA, 2015; DAVIES; DAVIES, 2010).

Ao passo que novos antibióticos entravam no mercado, a resistência a eles se tornava algo comum. Isso vem de encontro com o surgimento de cepas resistentes a vários tipos de antibióticos, como *Enterococcus faecalis* (CONWELL et al., 2017; HERSHBERGER et al., 2005; KITAGAWA et al., 2016; TRINDADE et al., 2015) e *Escherichia coli* (BLAIR et al., 2015; BROWN; WRIGHT, 2016; HUIJBERS et al., 2015; RTIMI et al., 2015; STRYJEWSKI; JONES; COREY, 2015) que são resistentes aos antibióticos carbapênicos, que são atualmente, microrganismos muito nocivos à saúde dos pacientes imunossuprimidos em ambientes hospitalares. Além disto, na avicultura e pecuária, cepas bacterianas resistentes a tetraciclinas preocupam criadores e órgãos ligados à saúde pública. Deve-se considerar que o uso indiscriminado sem orientação médica também propicia a seleção de cepas resistentes em ambientes urbanos (VENTOLA, 2015; DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência bacteriana tem início quando cepas bacterianas são expostas à antibióticos e, assim, indivíduos resistentes são selecionados e acabam se multiplicando. Este mecanismo acontece por mutação genética, por expulsão do antibiótico do interior celular ou ainda quando bactérias recebem um gene de uma bactéria resistente. Todos processos impossibilitam a atividade farmacológica, favorecendo a sobrevivência e resistência bacteriana (GONZÁLEZ-CANDELAS et al., 2011). Desta forma, os antibióticos tem cada vez menos ação sobre estes microrganismos. O problema é tão grave que, visando a diminuição do surgimento de cepas multirresistentes, a ANVISA proibiu a compra e distribuição de antibióticos

sem receita médica por meio da RDC Nº 44 de 2009 (BRASIL. ANVISA, 2009). A Figura 2 apresenta, de forma simplificada, como a resistência bacteriana pode ocorrer em organismos infectados por bactérias (CHOPRA; ROBERTS, 2001; VENTOLA, 2015).

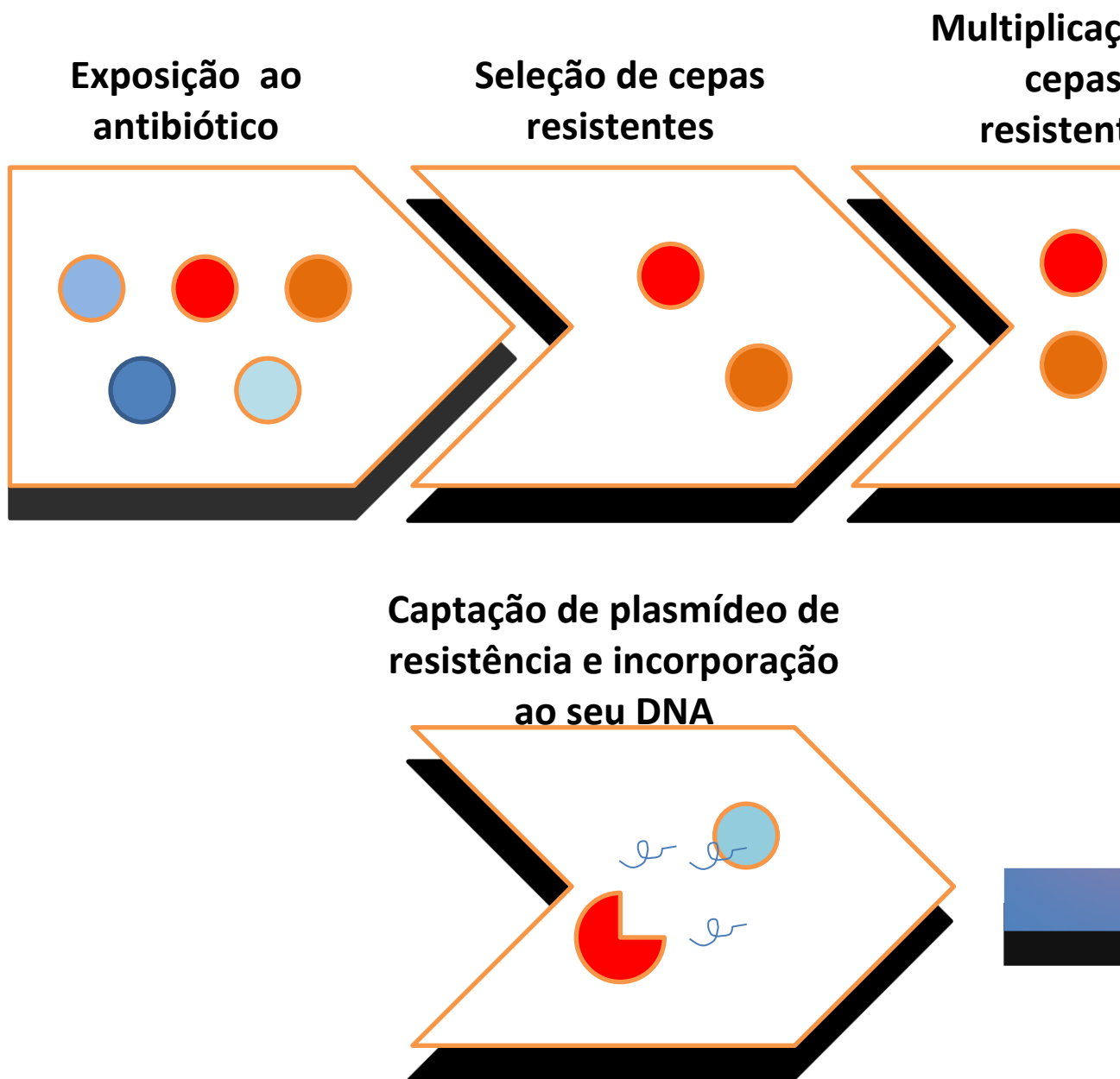


Figura 2 - Mecanismos de seleção e resistência bacteriana.

Legenda: Círculos com cores vermelha e laranja são as cepas resistentes ao antibacteriano, os círculos azuis representam as cepas suscetíveis ao antibacteriano.

Fonte: Autor.

Os mecanismos de infecção estão associados a fatores externos (dispositivos invasivos como próteses articulares, cateteres urinários, implantes) e internos (déficit imunológico, má circulação, comorbidades). É estimado que cerca de dez milhões de pessoas só nos Estados Unidos sofrerão com problemas relacionados ao biofilme

de microbiano somente este ano. Infelizmente, para tal problema, são poucas as alternativas de tratamento e prognóstico quando o paciente é acometido pelo biofilme microbiano (MICHAEL T. MADIGAN, JOHN M. MARTINKO, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, 2016).

1.2 A possibilidade dos Peptídeos Antimicrobianos

Visando obter novas ferramentas para tratamento de infecções bacterianas, Peptídeos Antimicrobianos (PAM) aparecem como uma alternativa proveitosa. Os PAMs são peptídeos que exercem atividade bacteriostática, bactericida, lise celular, prevenção do biofilme, entre outras, nas quais podem ser usadas contra a infecção bacteriana (HARRISON et al., 2014).

A interação dos PAM se dá nas membranas destes organismos, interagindo com a membrana externa das bactérias. Após o PAM se fixar na membrana inicia-se a desestabilização da parede microbiana por meio da formação de poros ou a atividade de enfraquecimento da membrana. As formas de atuação dos peptídeos na membrana bacteriana foi estudada ao longo do tempo e elucidadas várias maneiras de interação, como demonstra a Figura 3 (CALISKAN et al., 2013a; TARAZI, 2015). Contudo, Powers e Hancock (2003), apresentam que a capacidade antimicrobiana dos peptídeos se dá pela combinação de cationicidade, hidrofobicidade, formação de estrutura secundária, anfipaticidade, conformação, hidrofobicidade e ângulo polar. Para promover a ação antimicrobiana descrita, o PAM interage com a membrana da célula alvo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Para tanto, características estruturais e eletrostáticas precisam ser consideradas pois a mudança em alguma característica do peptídeo acarreta mudanças no corpo e atividade do peptídeo (POWERS; HANCOCK, 2003).

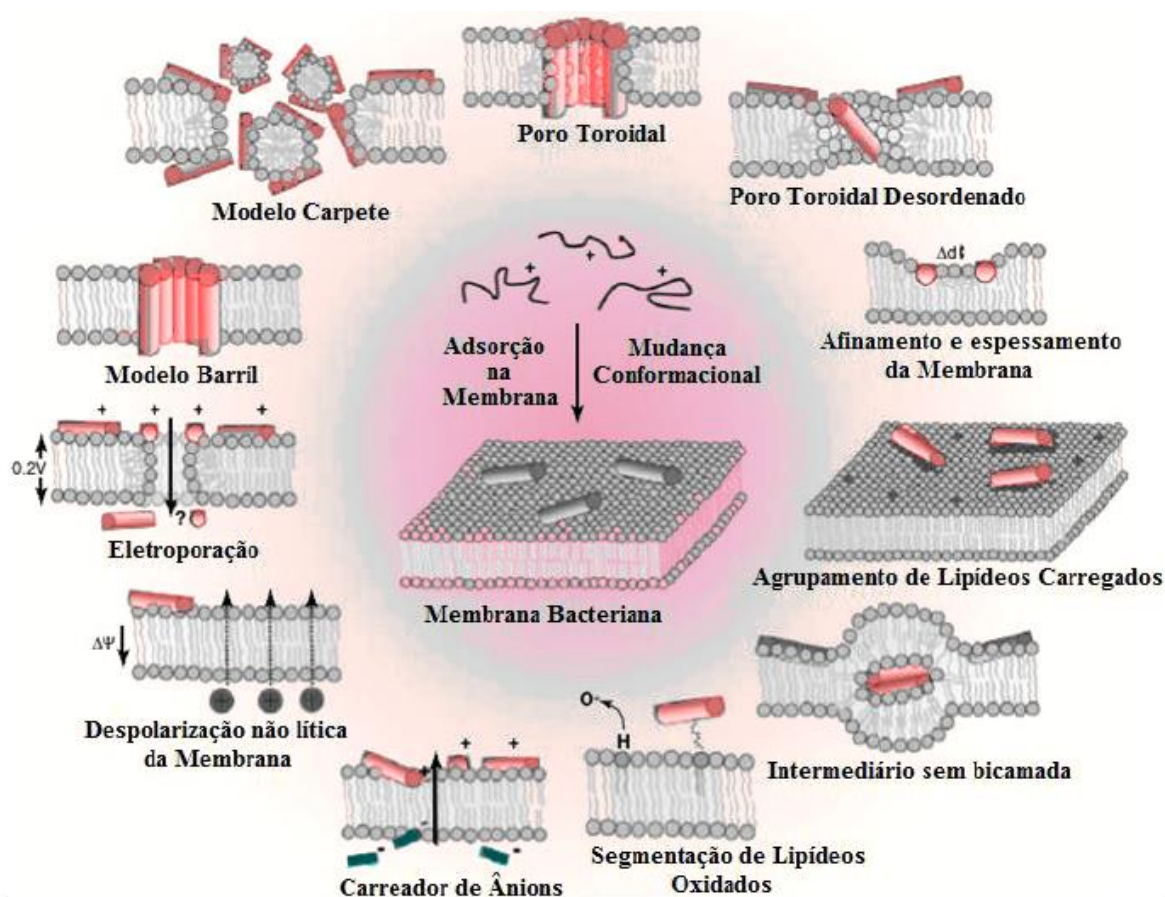


Figura 3 - Mecanismos de ação de PAMs na membrana bacteriana.

Padrões clássicos de ruptura de membrana, os peptídeos se encontram com a membrana interagindo de maneira a formar um limiar de concentração e penetrar-se em toda membrana formando poros no modelo Barril, solubilizar a membrana em estruturas de micelas no modelo tapete ou formar poros peptídeo-lipídeo como é o padrão poro toroidal. No modelo de poro toroidal desordenado, a formação de poros é, de certa forma, aleatória e envolve um número menor de peptídeos. A espessura da bicamada de fosfolípidios pode ser perturbada pela existência de peptídeos, ou a própria membrana pode ser reconstruída de modo a formar domínios ricos em lipídeos aniônicos. Em poucos casos, a bicamada sem intermediários poder induzir pequenos ânions por meio da bicamada, resultando no efluxo, o potencial de membrana pode ser dissipado sem outro dano aparente, ou, também podemos observar inversamente, no modelo molecular de eletroporação, a acumulação de peptídeo na monocamada externa que aumenta o potencial da membrana a um limiar que torna a membrana porosa a transitoriedade de várias moléculas, incluindo o peptídeo que causou este efeito (NGUYEN, et al., 2011) (ADAPTADO).

1.3 Estrutura molecular dos PAMs e sua interação com estruturas biológicas

Peptídeos apresentam variedade quanto à sequência, estrutura e conformação, geralmente possuindo de 12 a 50 resíduos de aminoácidos. Podem ser classificados em quatro famílias com base em suas conformações secundárias em α -hélices, folhas- β , estruturas mistas e não α ou β -estruturas (estendido) (WANG, 2013) como apresenta a Figura 4. A família de peptídeos α -hélices são compostos pelos que apresentam hélices anfipáticas em membranas ou em locais semelhantes. A família dos peptídeos com folhas- β geralmente são estabilizados por pontes dissulfeto, apresentando estrutura rígida (SEO et al., 2012).

Concomitantemente, os PAMs têm tipicamente uma elevada proporção (até 50% ou mais) de aminoácidos hidrofóbicos (HANCOCK; SAHL, 2006). Essas duas

últimas características físico-químicas permitem que as PAMs se dobrem (por exemplo, após a interação com membranas) em estruturas secundárias anfipáticas com os resíduos hidrofóbicos localizando em um lado da molécula e os resíduos catiônicos e polares aparecendo na face oposta (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

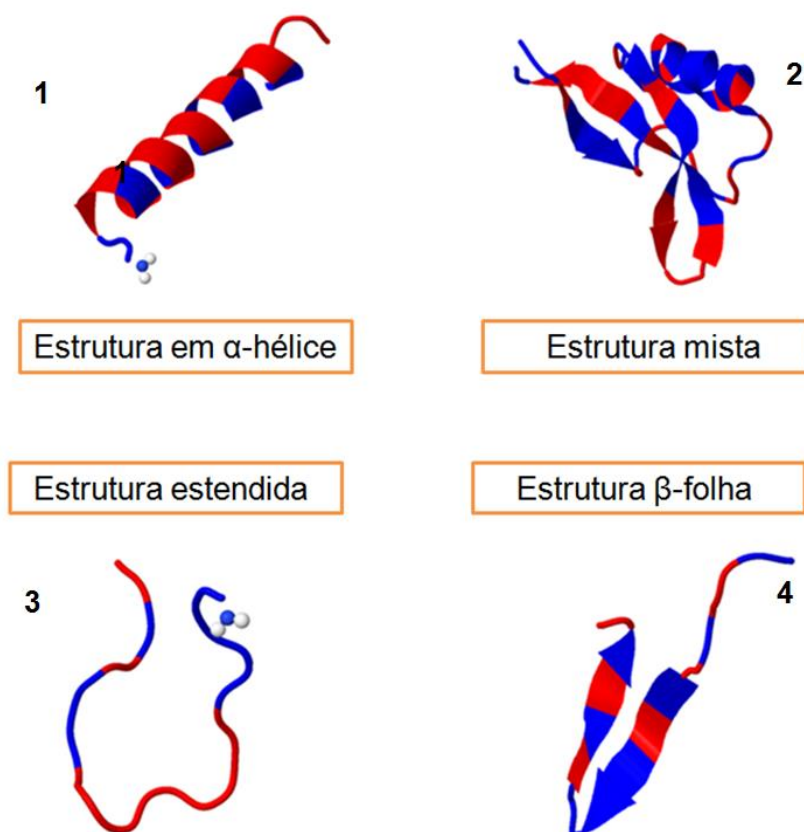


Figura 4 - Estrutura de PAMs

Apresentando regiões hidrofílicas (em azul) e hidrofóbicas (em vermelho). 1- Magainin 2 (GESELL; ZASLOFF; OPELLA, 1997); 2- Defensin-like protein 2 (VRIENS et al., 2015); 3- Indolicidin derivative (ROZEK et al., 2003); 4 -Protegrin-2 (USACHEV et al., 2015).

Fonte: Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> - (código de acesso das estruturas respectivamente P11006; P30230; P33046; P32195).

O momento hidrofóbico está correlacionado ao aumento da toxicidade contra células que possuem em sua composição fosfolipídios neutros (YEAMAN, 2003). A carga líquida positiva (principalmente entre +2 a +9) favorece a interação entre os peptídeos e fosfolipídios ácidos ionizados, os quais são presentes em membranas bacterianas. Contudo o excesso de cationicidade pode ser citotóxico e hemolítico bem como diminuir a ação antimicrobiana em resposta a repulsão por meio de poros pelas bactérias (DATHE; WIEPRECHT, 1999). Já a hidrofobicidade se relaciona intimamente com a citotoxicidade com células de mamíferos, bactérias Gram-positivas e diminuição de atividade para bactérias Gram-negativas (DATHE; WIEPRECHT, 1999). Por outro lado, o ângulo polar diz respeito a uma relação entre

as faces polar e não polar do peptídeo, geralmente em estrutura secundária. Para Yeaman & Yount, 2003, esta característica facilitaria a penetração na membrana microbiana além de maior estabilidade e meia-vida dos poros.

Embora os peptídeos preservem características comuns, sua especificidade está diretamente associada a mudanças nos espectros de sua conformação. Os peptídeos que demonstram melhores atividades antimicrobianas apresentam carga de 0 a +7 e permanecendo com hidrofobicidade em torno de 31 a 70%. Além disto, têm se buscado peptídeos pequenos para síntese e comercialização em larga escala (peptídeos de 10 a 24 resíduos de aminoácidos) (SADREDINAMIN et al., 2016).

1.4 Utilização de PAM na clínica médica

Em um cenário de constante resistência bacteriana contra antibióticos atualmente utilizados, principalmente aqueles utilizados para o tratamento de infecções nosocomiais e, analisando a estrutura, natureza e diversidade dos PAM e a probabilidade de baixa resistência dos microrganismos a eles, pois não são amplamente utilizados na clínica, os PAM tornam-se possíveis candidatos para tratamentos antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários, que pode estender ao tratamento de cancro e infecções virais (SADREDINAMIN et al., 2016). Um exemplo é o pexiganan, peptídeo desenhado racionalmente a partir da magainina, o qual demonstrou boa atividade frente a úlceras de pés diabéticos com cura clínica ou melhora do estágio III em 90% dos pacientes além de produzir quase nenhuma resistência microbiana nas amostras testadas (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; TARAZI, 2015; GE et al., 1999).

1.5 Disposição de PAM na natureza e em escorpiões

PAM são sintetizados em vários organismos, tais como serpentes, lagartas, anuros e escorpiões (HARRISON et al., 2014, 2016; HEINEN et al., 2014; LADRAM, 2016; VAN HOEK, 2014). Estudos recentes apresentam que as toxinas de escorpiões possuem propriedades biológicas eficientes contra bactérias, fungos, células tumorais, inibição de canais iônicos e mediadores da dor (CALISKAN et al., 2013b; KING; HARDY, 2013; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Uma breve representação da atividade das toxinas em estado bruto é apresentada na Tabela 1. A Figura 5 apresenta as famílias proteicas presentes em toxinas de escorpiões.

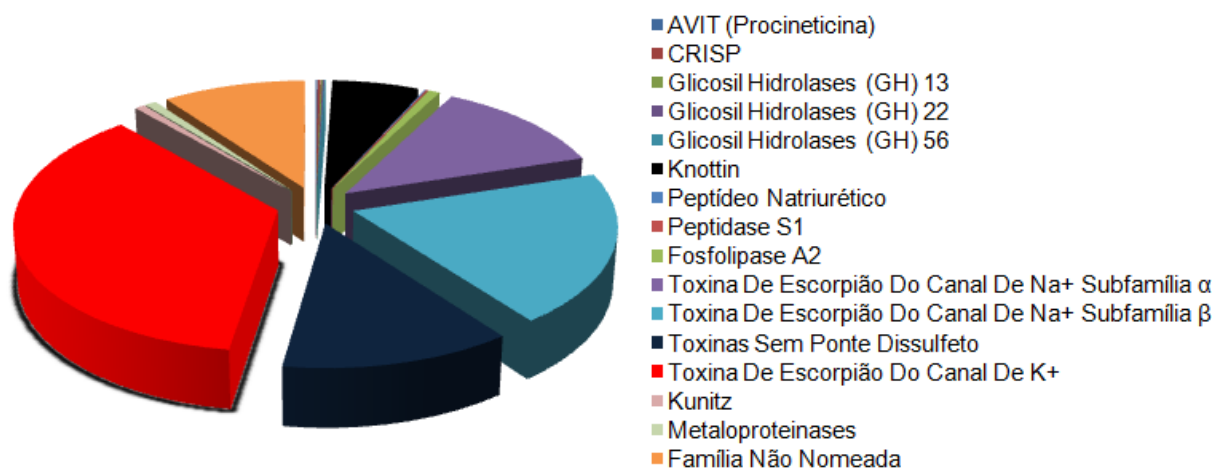


Figura 5 - Disposição de peptídeos purificados a partir de toxinas de escorpiões. Legenda: As cores correspondem ao peptídeo na legenda à direita do gráfico
 Fonte: VenomZone e UniProt*.

Tabela 1 - Peptídeos de escorpiões, sua carga líquida e ação biológica.

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

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

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

1.6 Entendendo a biologia de escorpiões e sua relação com PAM

Escorpiões são artrópodes quelicerados, pertencentes ao Filo Arthropoda (*arthro*:articuladas/*podos*:pés), classe Arachnida (por terem oito pernas) e ordem Scorpiones. A denominação escorpião é derivada do latim *scorpio/scorpionis* (ROBERTS, LARRY S.; LARSON, 2004; SAÚDE, 2009; OHMORI et al., 2009).

Há relatos da existência dos escorpiões a mais de 400 milhões de anos. Com a sua capacidade evolutiva e de adaptação foram bem sucedidos nos grandes cataclismos planetários. Para tanto, esses animais se adaptaram aos mais diversos tipos de habitats terrestres, podendo ser encontrados em climas e altitudes variadas. Contudo, grande parte dos escorpiões são encontrados em regiões de climas tropicais e subtropicais. Os escorpiões brasileiros são representados pelas famílias Bothriuridae, Chactidae, Liochelidae e Bothidae. Vivem em terrenos arenosos aparentemente localizam suas presas sentindo as ondas da superfícies que são geradas pelos movimentos dos insetos sobre ou dentro da areia. Essas ondas são capturadas por sensilas em fenda compostas localizadas no basitarso das pernas (ROBERTS, LARRY S.; LARSON, 2004; SAÚDE, 2009; OHMORI et al., 2009).

Atualmente, as espécies de escorpiões tem habitado locais específicos os quais propiciam adequada sobrevivência e reprodução, assim, sua localização e padrão ecológico são previsíveis e bem localizados. Contudo, na família Buthidae, em que possuem espécies dentro dos gêneros *Tityus*, *Centruroides* e *Isometrus*, que são dotados de alta capacidade de adaptação, são encontrados em diversas regiões do Brasil (ROBERTS, LARRY S.; LARSON, 2004; SAÚDE, 2009; OHMORI et al., 2009).

Naturalmente, os escorpiões são terrestres, sendo encontrados em vários ambientes urbanos tais como: casas, construções, e terrenos baldios, por exemplo. No mundo, são conhecidos 1600 espécies de escorpiões, sendo que somente 25 apresentam importância clínica por causa de suas toxinas. Já no Brasil, o gênero predominante é o *Tityus*, que tem como característica específica um espinho sob o ferrão localizados no télson. Também conhecido como "escorpião-amarelo", como pode ser visto na Figura 6, atualmente, o *T. serrulatus* é o escorpião que mais causa acidentes no Brasil sendo responsável por grande parte dos óbitos em crianças por causas escorpiônicas. Suas características são: pernas e caudas amareladas e o

tronco escuro. Possui serrilhas no 3º e 4º anéis da cauda, o que dá nome a esta espécie. Mede até 7 centímetros de comprimento. Além disso, reproduz-se por partenogênese, não precisando, necessariamente, de um macho para reprodução, tendo dois partos, em média por ano com 20 filhotes cada (ROBERTS, LARRY S.; LARSON, 2004; SAÚDE, 2009; OHMORI et al., 2009).



Figura 6 - Escorpião *Tytius serrulatus*
Fonte: BORTOLUZZI, QUEROL & QUEROL, 2007

A peçonha dos escorpiões apresenta aspecto opalescente e leitoso, sendo constituída por muco, proteínas básicas neurotóxicas, nucleotídeos, aminoácidos e enzimas. Sua composição pode variar de acordo com a presa do escorpião, região geográfica e variações genéticas (DIEGO-GARCÍA et al., 2013; RATES et al., 2008).

Contudo, a toxina do *T. serrulatus*, possui as seguintes famílias de proteínas (classificadas por atividade): toxinas de canal de sódio (NaTx), toxinas de canal de potássio (KTx), toxinas diuréticas, peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), PAM, enzimas e outras toxinas, como mostra a Figura 7.

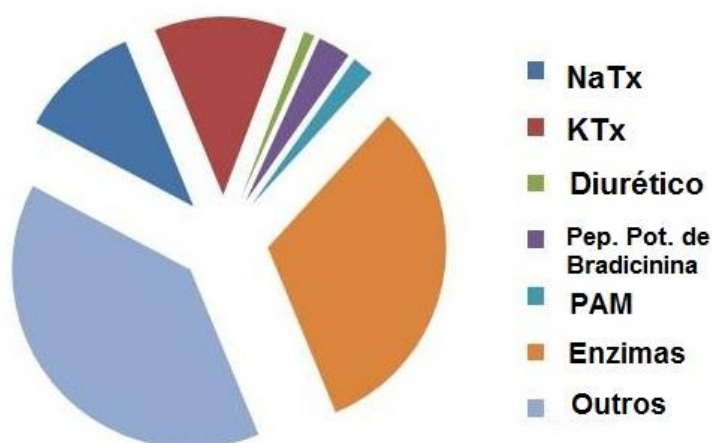


Figura 7 - Composição da peçonha de escorpiões *Tityus*.
Fonte: Venom Zone (ADAPTADO).

Esta peçonha possui características que os capacitam a serem bons caçadores e garantem defesa contra possíveis predadores, para tanto, a composição de sua toxina torna-se essencial para este artrópode (RATES et al., 2008). É sabido que sua peçonha possui alta afinidade por canais iônicos e atividade antimicrobiana, antitumoral e antiviral (ALMAAYTAH et al., 2013; DIEGO-GARCÍA et al., 2013; KING; HARDY, 2013; SAROJINI, 2013).

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

Isolando determinadas frações da toxina do escorpião *T. serrulatus*, observou-se que existem pelo menos dezenove peptídeos tóxicos, podendo ser classificados em α e β -toxinas, de acordo com a sua conformação estrutural. As mais notáveis, no entanto, são a TityusToxina1 (Ts1) caracterizada como β -neurotoxina com atividade tóxica para mamíferos e insetos ao interagir fortemente com o sítio quatro de canais de sódio; Ts2 com ação de retardo na inativação de canais de sódio, sendo uma α -neurotoxina; a Ts3 é composta por 62 resíduos de aminoácidos, massa de 7,240

kDa e ação sobre o terceiro canal de sódio induzindo a liberação de mediadores químicos como a acetilcolina e a catecolaminas, além disso, esta toxina exerce atividade sobre a despolarização de fibras nitrégicas e liberação de óxido nítrico, levando ao relaxamento do músculo liso cavernoso (HWANG et al., 2013; LEE et al., 2013; RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012).

A Ts15 bloqueia canais de potássio Kv1.2 e Kv1.3 e observou-se que tal bloqueio é físico; já a Ts18 apresenta-se como uma proteína curta e com ação em canais de íons sódio (LIMA, 2014; QUINTERO et al., 2013); outros componentes menos estudados como peptidases e hialuronidases estão presentes neste veneno. Hialuronidases são enzimas capazes de degradar hialurona, componente presente na matriz extracelular, facilitando a rápida difusão das toxinas no organismo da presa (ALMAAYTAH et al., 2014; DE MELO et al., 2015).

Sobre a atividade antimicrobiana dos peptídeos da peçonha, observa-se que existem fatores interdependentes nos componentes estruturais que determinam essa atividade (TARAZI, 2015; VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013). Foi observado que os peptídeos antimicrobianos oriundos da toxina de escorpião desempenham papel eletrostático na parede das membranas de bactérias, uma vez que a membrana apresenta amino-componentes carregados negativamente como fosfolípidios ácidos e lipopolissacarídeos (LPS) (TARAZI, 2015).

Na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, o peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK) apresenta 17 resíduos de aminoácidos, carga +1, 78% de hidrofobicidade, 52% de resíduos hidrofóbicos e massa de 1161.94 Da. O TsAP-1 este possui concentração inibitória mínima (CIM) de crescimento de *Staphylococcus aureus* (120µM), *Escherichia coli* (160 µM) e *Candida albicans* (160 µM) e concentrações bactericidas mínimas de *S. aureus* (>160 µM), *E. coli* (>160 µM) e *C. albicans* (>160 µM), além de ser bioativo contra células tumorais *in vitro* H157 e H838 (Carcinoma epidermóide oral humano e adenocarcinoma de câncer de pulmão, respectivamente) com valores de inibição de 55,9 µM e 52,5 µM, respectivamente, atividade hemolítica de 6,48% na concentração máxima (160 µM). Por estas características este peptídeo foi utilizado para desenho racional de peptídeos análogos sintéticos (GUO et al., 2013).

1.7 Aplicação do Desenho Racional e Modelagem Molecular no desenvolvimento de moléculas bioativas

A partir de peptídeos definidos estruturalmente é possível realizar mudanças locais nos peptídeos com o fim de produzir peptídeos mais nocivos aos micro-organismos alvo e, ao mesmo tempo, menos citotóxicos aos seres humanos. Esta tecnologia é chamada de planejamento racional de fármacos, a qual é uma modalidade que vem sendo cada vez mais explorada no mundo todo, visto que há uma enormidade de peptídeos com potencial farmacêutico. Além de simular as interações moleculares com grande eficácia, descobrir protótipos (ou compostos de partida), otimizar a ação de compostos já bioativos e a elaboração de compostos candidatos, esta tecnologia é muito menos onerosa e mais rápida (MICHAEL T. MADIGAN, JOHN M. MARTINKO, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, 2016; VERLI, 2014).

Os eixos, ϕ (phi) e ψ (psi), no diagrama de *Ramachandran*, variam de -180° a $+180^\circ$, as regiões no interior das áreas demarcadas no gráfico são regiões permitidas. Fica claro, a partir da análise do gráfico, que a área não permitida é maior do que a permitida. As regiões, não permitidas são possíveis de ocupação para a glicina, pois sua cadeia lateral restringe-se a um átomo de hidrogênio, permitindo mais liberdade para os ângulos *phi* e *psi*.

O programa *PROCHECK* indica as glicinas como triângulos, e estas podem ocupar qualquer região do diagrama de *Ramachandran*, visto que sua cadeia lateral restringe-se a um hidrogênio, que permite maior flexibilidade da cadeia principal. Os resíduos de aminoácidos que ocupam as regiões generosamente permitida e proibida são indicados em amarelo e amarelo pálido, respectivamente (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Para tanto, são utilizadas técnicas e procedimentos como a modelagem molecular, *Docking*, modelagem comparativa e dinâmica molecular (VERLI, 2014). Para operacionalizar esta ferramenta, os programas bioinformáticos baseiam-se nos processos e mecanismos bioquímicos conhecidos, seja no processo fisiológico, definição da intervenção terapêutica ou eleição do alvo terapêutico desejado (VERLI, 2014). Para compreender a interação entre peptídeo membrana, é possível construir membranas miméticas *in silico* para projetar as interações possíveis. Por meio das

membranas miméticas DPPE (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina) e DPPG (1,2-Dipalmitosil-glicero-3-fosfatidilglicerol), carregados é possível estudar as interações e prospectar interações eletrostáticas entre peptídeo e membrana.

1.7.1 Modelagem Molecular (MM)

A modelagem molecular, de acordo com a IUPAC, busca investigar as estruturas e propriedades moleculares por meio da química computacional e de técnicas de visualização tridimensional (BARREIRO et al., 1997). Desta forma, a MM tem por objetivo gerar, manipular e/ou representar com precisão estruturas moleculares e calcular as propriedades físico-químicas delas (VERLI, 2014). Para continuação da atuação e desenvolvimento desta nova metodologia, os empenhos em tecnologia computacional precisaram avançar também tanto em capacidade de armazenamento de dados como em sua análise, o que, somado ao aprimoramento na química funcional (técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raio-X, bioquímica e biologia molecular) trouxe desenvolvimento em áreas até então completamente desconhecidas (COHEN, 1996; VERLI, 2014).

A MM pode ser categorizada em dois grupos:

- **Planejamento direto ou dependente do receptor:** quando usa a estrutura tridimensional de uma molécula alvo em um complexo com a micromolécula: utilizando comparação por homologia e conhecimento das sequencias *template - based modelling* a qual condiz a alguma estrutura já existente com suas propriedades tridimensional identificadas (VERLI, 2014).
- **Planejamento indireto ou independente do receptor:** que aproveita-se de estrutura dos ligantes disponíveis: utilizando métodos *ab initio* e métodos *de novo* com sequencias alvos *template free modelling* para sequencias com moléculas sem suas características tridimensionais resolvidas (VERLI, 2014).
- **Iterative Threading ASSEmbly Refinement:** é um método de bioinformática que permite prospectar o modelo de estrutura tridimensional de peptídeos a partir de uma sequencia de aminoácidos. Este programa detecta modelos de estrutura do banco de dados de proteínas pela técnica chamada reconhecimento de dobras (ou *threading*). Os modelos de estrutura de comprimento total são construídos pela remontagem de fragmentos

estruturais de modelos de *threading* utilizando simulações de Monte Carlo de troca de réplica. O *I-TASSER* é um dos métodos de previsão de estrutura de proteína mais bem sucedidos nos experimentos *Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP)* em toda a comunidade científica (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; ZHANG, 2008).

1.7.1.1 Modelagem Molecular comparativa por homologia

Neste processo, há o alinhamento da sequência de aminoácidos de interesse com a sequência do banco de dados de outras proteínas com estrutura tridimensional previamente elucidada e armazenada no *Protein Data Bank* (PDB). As comparações realizadas são possíveis pois no processo evolutivo das famílias proteicas existem regiões conservadas as quais podem ser preditoras de suas atividades e estrutura. Para construção de um peptídeo a partir de modelagem comparativa é necessário seguir um processo que se configura em elucidação da sequências resolvidas tridimensionalmente e mostrar identidade entre as sequências de pelo menos 25% (VERLI, 2014).

Para alguns pesquisadores, existe uma série de passos a seguir para o refinamento de um peptídeo pelo método de homologia.

- 1) Utilizar o banco de dados PDB para encontrar proteínas ou peptídeos homólogos;
- 2) Alinhar as sequências *template* e a de interesse;
- 3) Identificar resíduos na molécula de interesse da estrutura de interesse que são iguais às do *template*;
- 4) Modelar regiões variáveis;
- 5) Modelar regiões de interesse na nova molécula;
- 6) Refinar a estrutura do peptídeo de interesse empregando métodos de refinamento com o uso de energia potencial.

Para realizar estes processos, atualmente, existem programas *on-line* que permitem realizar a modelagem molecular comparativa ou por homologia como o *MODELLER* e o *I-TASSER*, por exemplo (ESWAR et al., 2008).

1.7.2 *Docking* (Docagem ou atracamento molecular) e Dinâmica molecular

A Docagem Molecular, também chamada de Acoplamento molecular, Ancoragem molecular ou *Docking*, na área da modelagem molecular, é um método que prevê a orientação preferencial de uma molécula a uma outra, quando ligados entre si para formar um complexo estável. O conhecimento da orientação preferida por sua vez pode ser utilizado para prever a força de associação ou a afinidade de ligação entre duas moléculas, por exemplo, utilizando funções de *scoring*.

A técnica de docagem molecular tem como objetivos encontrar a posição mais razoável para ancoragem da molécula de interesse com o alvo, de forma que seja possível a predição das estruturas espaciais do complexo receptor-ligante como também da energia livre de formação. A capacidade de precisão da docagem possibilita a previsão da conformação de ligantes de pequenas moléculas no espaço de ligação do sítio de ligação. Já a dinâmica molecular é uma técnica de simulação computacional que retrata as movimentações, de acordo com o tempo, das posições e velocidades dos átomos que constituem cada resíduo do peptídeo (VERLI, 2014).

Para garantir o bom desenvolvimento da predição nas simulações computacionais entre o receptor-ligante por *Docking* e dinâmica molecular existem duas técnicas alternativas, a primeira se concentra em identificar sítios ativos preferenciais de ligação e a indicação de possíveis modificações específicas no ligante, resultando no conhecimento a respeito de grau de afinidade e especificidade entre eles, já o segundo é o resultado do estudo da geometria para aplicação dos métodos computacionais mais sofisticados tendo em vista a quantificação energética livre do complexo de ligação receptor-ligante (VERLI, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Desenhar racionalmente peptídeos análogos ao peptídeo TsAP-1, isolado da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*, ligando atributos físico-químicos à atividade antimicrobiana.

2.2 Específicos:

- Compreender características físico-químicas conformacionais dos peptídeos desenhados racionalmente;
- Estudar o comportamento estrutural dos Butylatus por meio de *Docking*;
- Avaliar a bioatividade dos peptídeos desenhados racionalmente contra microrganismos suscetíveis;
- Avaliar efeitos hemolíticos dos peptídeos controle e dos desenhados racionalmente;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho racional e predição dos análogos do peptídeo TsAP-1

O peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK), oriundo do escorpião *Tytilus serrulatus*, (GUO et al., 2013) escorpião brasileiro conhecido escorpião-amarelo, foi utilizado como *template* para que os peptídeos fossem desenhados racionalmente por meio da observação da estrutura primária de aminoácidos e pela predição de sua conformação em α -hélice, então, os resíduos de aminoácidos foram reorganizados utilizando o diagrama em hélice do servidor **HeliQuest** (GAUTIER et al., 2008) para realizar o desenho racional com a intenção de melhorar características físico-químicas (hidrofobicidade, carga líquida e massa teórica) do peptídeo TsAP-1, que é o controle para comparação dos análogos.

A partir da visualização da estrutura tridimensional, o objetivo do desenho racional foi de aumentar a atividade bactericida com manutenção ou diminuição da ação hemolítica. Para isto, foram retirados resíduos de aminoácidos serina, glicina e prolina com posterior alocação de aminoácidos carregados positivamente e inserção de alaninas com o fim de manter o peptídeo carregado positivamente e favorecer a formação de α -hélice, respectivamente. Os resíduos hidrofóbicos foram alocados de maneira a não deixar os peptídeos Butylatus com hidrofobicidade acima de 78%, que é a do controle. Para garantir a visualização das predições dos peptídeos desenhados foram utilizados o servidor *Protein Data Bank* (**PDB**).

Utilizou-se o servidor *Antimicrobial Peptide Database* (**APD**) para conhecer a porcentagem de resíduos hidrofóbicos e massa teórica do peptídeo TsAP-1 e os desenhados racionalmente. Para conhecer a similaridade entre o peptídeo molde e seus análogos foi utilizado o programa **Clustal Omega** versão 1.2.4 (SIEVERS et al., 2011) no formato com números. Para prever a atividade antimicrobiana, foi utilizado o servidor **CAMP_{R3}** (WAGHU et al., 2016) o qual utiliza banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *UniProtKB* e *PDB*

(<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) selecionando peptídeos com as palavras-chave: antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários considerando informações sobre a sequência, estrutura, definição proteica, atividade, taxonomia do organismo de origem e organismos alvos (WAGHU et al., 2016).

3.2 Síntese, Espectrometria de massa e quantificação do produto

Os peptídeos TsAP-1 e os análogos foram sintetizados pela empresa Aminotech, com uma pureza de 95% (após remoção de TFA), pelo método da fase sólida utilizando o químico N-9-fluorenilmetiloxycarbonilo (*F-moc*) em resina de amida Rink. O peptídeo sintético foi solubilizado em ácido trifluoroacético aquoso a 0,1% (TFA) e filtrado com um filtro Millex de 0,22 µm 25 mm (Millipore-Merck, Billerica, MA). As concentrações de peptídeos sintéticos para todas as experiências *in vitro* e foram determinadas utilizando a medição por absorvância a 205, 215 e 225 nm (FALCAO et al., 2016).

3.3 Análises estruturais *in silico*

3.3.1 Alinhamento e modelagem molecular

A construção dos modelos tridimensionais do peptídeo controle e dos peptídeos análogos foi realizada por similaridade por meio do servidor **I-TASSER** utilizando o banco de dados PDB (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Para realizar a validação dos modelos desenvolvidos utilizou-se o programa **PROCHECK14**, o qual apresenta a geometria peptídica, a estereoquímica e a distribuição energética pontuando ângulos diedros considerando forças covalentes e análise do **gráfico de Ramachandran**. Além deste, por meio do programa **ProSA-web** calculou-se o nível de qualidade dos peptídeos gerados baseado em resultados previamente dados dentro de intervalos de proteínas nativas por meio do Z-score (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

3.3.2 Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

O programa **AutoDock 4.2** foi utilizado para elucidar modos possíveis de interação entre os peptídeos desenhados racionalmente e o peptídeo controle em uma membrana mimética bacteriana Gram-negativa e Gram-positiva. As membranas foram construídas utilizando o servidor **CHARMM-GUI**, na proporção de 9:1 de 1,2-

dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DPPG). A bicamada foi construída em uma caixa retangular, onde moléculas de água foram adicionadas, bem como neutralizando íons por métodos de substituição. A caixa da grade foi calculada com 40 × 40 × 25 pontos e espaçamento de 1,0 Å centrado na superfície da membrana. Depois disso, cinquenta quadros de encaixe foram feitos e as estruturas geradas foram classificadas de acordo com seus valores de afinidade. O programa **PyMOL** foi utilizado para visualizar as estruturas tridimensionais dos peptídeos modelados bem como as interações peptídeo-membrana respeitando a distância de 2,8 a 3,6 Å para todos os átomos ancorados com a membrana (CARDOSO et al., 2016)

3.4 Quantificação dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados foram quantificados de acordo com a metodologia de Murphy e Kies (MURPHY, J. B.; KIES, 1960) pela absorção de luz UV, utilizando a média entre as seguintes fórmulas:

$$a. (ABS_{215} - ABS_{225}) \times 0,144 = k$$

$$b. ABS_{205} \times 0,031 = T$$

$$c. \frac{(k + T)}{2} = C$$

Onde, ABS é a absorbância e C é igual à concentração do peptídeo em mg/mL nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm. As constantes são representadas por 0,144 e 0,031.

3.5 Análise funcional *in vitro*

3.5.1 Ensaio hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo TsAP-1 e os análogos foi avaliada utilizando eritrócitos de camundongo. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A solução peptídica foi adicionada à suspensão de eritrócitos (1%, em volume), em uma concentração final variando de 256 a 8 µg.mL⁻¹ em um volume final de 100 µL. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 60 min. A liberação de hemoglobina foi monitorizada medindo a absorbância do sobrenadante a 540 nm. O controle de hemólise zero (branco) foi determinado com eritrócitos suspensos na presença de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e para controle

positivo (100% de lise de eritrócitos); utilizou-se uma solução de 1% (em volume) de Triton X-100 dissolvido em água milli-Q em vez da solução peptídica. Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata (CARDOSO et al., 2016).

3.5.2 Ensaios antibacterianos

Escherichia coli (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), sensíveis à metilicina foram utilizados para ensaios antimicrobianos. As espécies bacterianas foram cultivadas em 1,0 mL de *Mueller-Hinton* (MH) por 24 horas a 37°C sob agitação em tubos de ensaio. Após isto, cada peptídeo sintético foi incubado com 5×10^5 UFC.mL⁻¹ de bactéria. Os controles negativos e positivos do ensaio foram bactérias em meio MH e várias diluições de ciprofloxacina, respectivamente, com volume final de 100 µL. Foi considerado atividade inibitória quando o peptídeo apresentou >90% de inibição do crescimento bacteriano quando comparado ao controle. O crescimento bacteriano foi medido em 595 nm após 24 horas de incubação na placa, realizado de acordo com os protocolos descritos pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (NCLS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho racional e síntese de análogos do TsAP1

Neste trabalho, foram propostos análogos do peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK) e sintetizados quimicamente. Os análogos foram chamados de Butylatus-1 (KAFKFIFKFAAAI), Butylatus-2 (KAFRFLRKFAAAI), Butylatus-3 (KLAKFIFKLFAAAF), Butylatus-4 (RLARFIRRLFAAAR) de acordo com a sequência de desenho destes. O nome foi construído a partir do gênero, família e espécie do escorpião *Tityus serrulatus*: **Buthidae**, *Tityus serrulatus*. Para facilitar a leitura, os peptídeos serão nomeados B1, B2, B3 e B4 de acordo com seu nome. A Figura 8 apresenta o peptídeo controle TsAP-1 e os peptídeos Butylatus desenhados racionalmente. Considerando o arcabouço do peptídeo controle, com uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica.

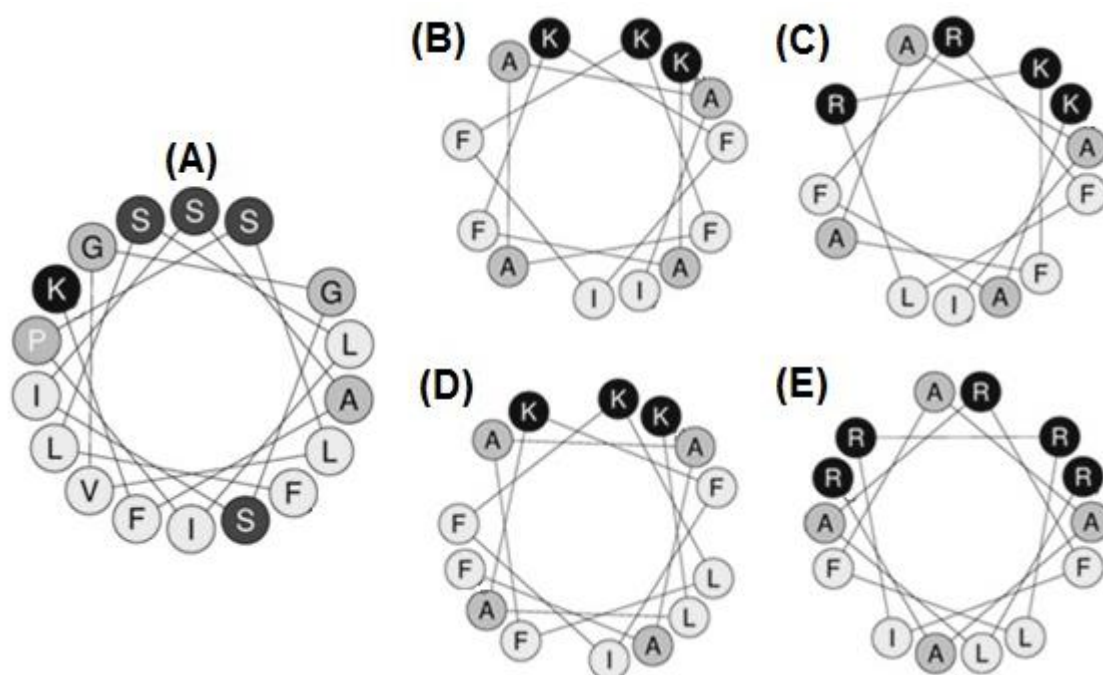


Figura 8- Disposição helicoidal dos resíduos de aminoácidos.

Legenda: (A) TsAP-1, (B) Butylatus-1, (C) Butylatus-2, (D) Butylatus-3 e (E) Butylatus-4.

As características físico-químicas são importantes para prever aspectos relacionados à performance dos peptídeos e para ter ideia de seu potencial antibacteriano. Os peptídeos podem ser visualizados na Tabela 2 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Tabela 2 - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados.

Peptídeo controle TsAP-1 e os análogos B1, B2, B3 e B4, destacando em vermelho os resíduos conservados do controle; propriedades físico-químicas e predição das probabilidades para antimicrobianos por meio de análises: Máquina de vetores de suporte (SVM), *Random Forest* (RF), análise discriminante (DA) e rede neural artificial (ANN).

Análise computacional	TsAP-1	B-1	B-2	B-3	B-4
Sequência	FLSLIPSLVGGSISAFK	KAFKFIFKFAAAI	KAFRFLRKFAAAI	KLAKFIFKLFAAAF	RLARFIRRLFAAAR
Resíduos	17	13	13	14	14
Carga	+1	+3	+4	+3	+5
Hidrofobicidade	78%	70%	47%	76%	35%
Momento hidrofóbico	0.471	0.566	0.635	0.554	0.637
SVM	0.915	0.807	0.891	0.838	0.997
RF	0.9585	0.856	0.864	0.848	0.8015
AD	0.985	0.983	0.967	0.986	0.979
ANN	PAM	PAM	PAM	PAM	PAM
Massa teórica	1736,1	1501,9	1483,8	1615,0	1717,1

A partir do arcabouço do peptídeo controle, o qual apresenta uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica, os peptídeos Butylatus foram então desenhados. O peptídeo B1 foi desenhado mantendo a face hidrofílica com lisinas, com o objetivo de manter a face hidrofílica e aumentar a carga líquida do peptídeo, e a face hidrofóbica permaneceu com resíduos fenilalaninas e isoleucinas buscando manter a estrutura helicoidal espelhada do peptídeo, ainda, adicionando aminoácidos alaninas para favorecer a formação de α -hélice. O B2 manteve a face hidrofílica com duas alaninas e duas argininas, com objetivo de aumentar sua carga líquida, já sua face hidrofóbica manteve os resíduos fenilalaninas, leucina e fenilalanina, com alocação de alaninas para favorecer formação de α -hélice. O peptídeo B3 permaneceu com uma face hidrofílica composta por lisinas, e sua face hidrofóbica composta por fenilalaninas, leucinas e isoleucina mantendo a hidrofobicidade deste peptídeo alta, e, também, adicionando alaninas para favorecer a formação de α -hélice. Já o peptídeo B4 manteve sua face hidrofílica com cinco argininas com o fim de aumentar muito sua carga em relação ao peptídeo controle TsAP-1, e sua face hidrofóbica foi composta por fenilalaninas, leucinas e isoleucina, com adição de alaninas para favorecer a formação de α -hélice.

Como pode ser observado na Tabela 2, os peptídeo Butylatus-1, Butylatus-2, Butylatus-3 e Butylatus-4 apresentaram redução na hidrofobicidade e aumento da carga líquida quando comparados ao peptídeo controle, contudo se mantiveram no limiar de antimicrobianos da literatura, como foi proposto. Embora Dathe & Wieprecht (1999), Yeaman & Yount (2003) e Sadredinamin *et al.* (2016) difiram a respeito das características de um PAM, os peptídeos Butylatus se encaixam como potenciais antimicrobianos por possuírem hidrofobicidade, carga líquida e poucos resíduos de aminoácidos de acordo com as três literaturas. Além disso, embora existam peptídeos com carga baixa, hidrofobicidade mais alta e muitos resíduos, peptídeos com carga entre +1 e +4, hidrofobicidade entre 40 e 60% e até 20 resíduos de aminoácidos com estrutura em α -hélice demonstram melhor performance antibacteriana.

Em relação à similaridade dos peptídeos análogos ao controle, foi mantido resíduos de aminoácidos na sequência original, principalmente aqueles hidrofóbicos,

além de alaninas. A homologia mantida permaneceu sempre igual ou superior a 30%.

Como forma de prever se os peptídeos desenhados racionalmente apresentariam atividade antimicrobiana e prospectar sua massa foi utilizado o servidor CAMP_{R3}. Por meio de um banco de dados é possível conhecer, com grande precisão, a probabilidade da molécula apresentar atividade antimicrobiana. Conforme análise, por meio da ferramenta "Resultados com classificador de análise discriminante", o controle obteve 98,5% de chance de ser antimicrobiano, os análogos Butylatus-1, Butylatus-2, Butylatus-3 e Butylatus-4, obtiveram 98,3, 96,7, 98,6% e 98,0% respectivamente, e 1501,87, 1483,81, 1615,03 e 1717,1 Da respectivamente, o que é considerado uma margem de segurança para prosseguir com os estudos, tanto para os padrões de atividade antimicrobiana como de massa, visto que é de comum acordo na comunidade científica atividade antimicrobiana prevista de no mínimo 85% (THOMAS et al., 2009; WAGHU et al., 2016).

Após o desenho racional foi iniciado avaliações funcionais e estruturais para os análogos dos peptídeos Butylatus.






4.1.1 Alinhamento e modelagem molecular

A predição estrutural foi realizado por meio do programa *I-TASSER*, o qual utiliza o banco de dados PDB. Para isso, esse programa busca na biblioteca do *PDB* proteínas molde (*templates*) para projetar a estrutura tridimensional do peptídeo desenhado racionalmente. Em seguida, o *I-TASSER* utiliza simulações de Monte Carlo para encadear regiões alinhadas construídas por *ab initio*. O terceiro passo é a simulação da montagem do peptídeo pelo *SPICKER* onde restrições espaciais serão agrupadas dos modelos do *LOMETS* e *PDB* pelo servidor *TM-align* com posterior orientação das simulações. Desta forma, é possível reduzir choques estéricos na cadeia de aminoácidos. Os modelos finalizados com a estrutura atômica são realizadas por meio do programa *REMO*, o qual traduz particularidades mediante otimização da rede de ligações de hidrogênio (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SHEN et al., 2009;).

Os peptídeos analisados modelados por meio do *I-TASSER* foram alinhados com dez (10) *templates* de maior significância nos alinhamentos *LOMETS*. As

análises das estruturas tridimensionais podem ser visualizados na Tabela 3 com seus respectivos dados:

Tabela 3 - Estruturas tridimensionais construídas pelo servidor *I-TASSER* para o peptídeo controle e os quatro análogos. Visualização pelo programa *PyMol*.

MODELOS					
Parâmetros de qualidade	TsAP-1	B1	B2	B3	B4
Predição 3D					
C-score	-0,96	-0,11	-0,17	-0,05	-0,13
TM-score	0,59±0,14	0,7±0,12	0,69±0,12	0,71±0,12	0,70±0,12
RMSD	2,4±1,8Å	0,5±0,5Å	0,6±0,6Å	0,5±0,5Å	0,7±0,7Å

O N-terminal está voltado para baixo enquanto o C-terminal está para cima das estruturas. Os valores do C-score, TM-score e RMSD estão indicados por média e desvio padrão da média.

Os parâmetros utilizados são o *C-score*, *TM-score* e o *RMSD*. O *C-score* dizem respeito ao padrão que estima a qualidade dos modelos construídos pelo servidor *I-TASSER*, considerando a importância dos alinhamentos e parâmetros de convergência da estrutura. É considerado significativo quando o valor do *C-score* se encaixa entre -5 e 2, onde quanto maior valor maior a confiança e vice-versa. Quando avalia-se o *TM-Score* propõe-se a mensurar a similaridade estrutural de duas estruturas. Contudo, o *TM-Score* atua em conjunto com o *RMSD*, que é a distância média dos pares de aminoácidos das duas estruturas que é sensível a erros locais, colabora para diminuir erros nos modelos gerados. Valores de *TM-score* >0,5 indicam um modelo topológico preciso, enquanto valores de *TM* <0,17 constituem uma similaridade aleatória (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SHEN et al., 2009; ZHANG, 2008). O *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*, ou Desvio Médio do Quadrado da Raiz, em português) prevê o desvio médio dos átomos das estruturas alinhadas, do controle e os análogos. De forma que, quanto maior este valor, também será maior a diferença de estrutura entre os peptídeos que estão sendo comparadas (KUFAREVA; ABAGYAN, 2012).

Com base nos dados apresentados na tabela 3, observa-se que os peptídeos desenhados racionalmente bem como o controle, apresentaram resultados no alinhamento considerados satisfatórios para suas predições, de acordo com *C-*

score e *TM-score* (-5 a 2; 0,5 a 1, respectivamente) com previsão de precisão satisfatória pelo *RMSD* para modelagem.

Estas predições tridimensionais baseadas em 10 (dez) *templates* oferecem a ideia de sua conformação e, assim, a sua atividade microbiana pode ser simulada por meio de estudo em *Docking*.

A partir dos dados de referência é possível observar que os modelos gerados respeitam os parâmetros de qualidade do *C-score* quando todos os valores se alojam no espaço de -5 a 2 e o *TM-score* permanece maior que 0,5.

4.2 Validação dos modelos tridimensionais

Uma importante etapa no processo de desenho racional é a avaliação das estruturas preditas, e se torna ainda mais relevante quando os modelos desenhados apresentam diferenças quanto à ação (SCHAFFERHANS; KLEBE, 2001). Atualmente, existem programas *on-line* que possibilitam a avaliação dos modelos, tais como: *PROCHECK* e *Aggrescan3D* (DAVY et al., 1993; ZAMBRANO et al., 2018). O objetivo destes programas é avaliar níveis de qualidade e confiabilidade dessas estruturas geradas. Para tanto, buscam avaliar as propriedades da organização estrutural (como regularidade estereoquímica), qualidade do empacotamento de resíduos e a fidelidade do enovelamento em conformidade com o ambiente químico dos resíduos dos peptídeos (HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, 2003). Segundo Höltje e colaboradores, é necessário verificar a qualidade estereoquímica das estruturas dos modelos formados e avaliar a formatação de parâmetros como comprimentos de ligações, ângulos no meio de ligações, ângulos torsionais e a quiralidade dos resíduos (HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, 2003).

O programa *PROCHECK* foi utilizado para avaliação dos parâmetros estereoquímicos (ângulos torsionais da cadeia principal Φ e Ψ , ângulos torsionais das cadeias laterais, contatos ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- α , dentre outros). Para validar os dados estéricos com qualidade, o programa emite o valor "*G-factor*", o qual representa qualidade acima de -0,5, abaixo deste valor é considerado "não-usual" e abaixo de -1,0 é considerado "altamente não-usual" (DAVY et al., 1993).

Contudo, para melhor avaliação das estruturas secundárias, é necessária a utilização do gráfico de *Ramachandran*. Com esta ferramenta é possível prever qual estrutura secundária o peptídeo terá por meio das posições ϕ (phi) e ψ (psi) nos quadrantes desta ferramenta. Para conformação em α -hélice, os valores obtidos deverão estar agrupados sobre o eixo $\phi = -57^\circ$ e $\psi = -47^\circ$. Já para estruturas secundárias em β -folha, os valores deverão estar agrupados no eixo de $\phi = -130^\circ$ e $\psi = +140^\circ$. Graficamente, isto significa que muitos resíduos no quadrante superior esquerdo terão propensão a se comportar em β -folha e se este fenômeno ocorrer no quadrante inferior esquerdo terá propensão a se comportar em α -hélice. Além disso, o gráfico de *Ramachandran* apresenta um controle de qualidade visual que evidencia os valores analisados. Em suma, as regiões de melhor valor são chamadas de regiões favorecidas onde o choque entre átomos é mínimo; as regiões permitidas são onde há pouca chance de choques estérico; as regiões generosamente indica grande chance de choque estérico e a região negligenciada, ou não permitida, é onde provavelmente haverá choque estérico. Considera-se um modelo de qualidade aqueles em que, pelo menos, 90% dos resíduos estejam nas áreas favorecidas e permitidas (HOVMÖLLER; ZHOU; OHLSON, 2002; RAMACHANDRAN, GOPALASAMUDRAM NARAYANA; RAMAKRISHNAN, CHANDRASEKHARAN; SASISEKHARAN, 1963). Os dados aqui obtidos podem ser observados na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Localização dos resíduos no Gráfico de *Ramachandran*.

GRÁFICO DE RAMACHANDRAN (Ângulos Psi e Phi)					
Regiões	Favorecidas (%)	Permitidas (%)	Generosamente permitidas (%)	Não permitidas (%)	Total em áreas favorecidas e permitidas (%)
TsAP-1	83,3	8,3	-	8,3	91,6
Butylatus-1	81,8	18,2	-	-	100
Butylatus-2	81,8	18,2	-	-	100
Butylatus-3	83,3	8,3	8,3	-	91,6
Butylatus-4	91,7	8,3	-	-	100

*São considerados valores de qualidade quando a % de resíduos em áreas favorecidas e permitidas são maiores que 90%.

Quanto às análises, o peptídeo controle apresentou *G-factor*, do *PROCHECK*, de -0,75 e seus resíduos apresentam posicionamento, no gráfico de *Ramachandran*, de 83,3% em posições favorecidas, 8,3% em região permitida e 8,3% em regiões

não permitidas. Para o peptídeo Butylatus-1, apresentou *G-factor*, do *PROCHECK*, de -0,28 e seus resíduos apresentam posicionamento, no gráfico de *Ramachandran*, de 81,8% e em posições favorecidas 18,2%. Para o peptídeo Butylatus-2, apresentou *G-factor*, do *PROCHECK*, de -0,16 e seus resíduos apresentam posicionamento, no gráfico de *Ramachandran*, de 81,8% e em posições favorecidas 18,2%. Para o peptídeo Butylatus-3, apresentou *G-factor*, do *PROCHECK*, de -0,17 e seus resíduos apresentam posicionamento, no gráfico de *Ramachandran*, de 83,3% em posições favorecidas 8,3% e 8,3% em posições generosamente permitidas, contudo disso, o peptídeo Butylatus-4 apresentou 91,7% dos resíduos em regiões favorecidas e 8,3 em regiões permitidas e *G-factor* de 0,1.

Na Figura 9, são apresentadas as regiões na parcela com a maior densidade de pontos são as chamadas regiões "permitidas", também chamadas regiões de baixa energia. Alguns valores de ϕ e ψ são proibidos, uma vez que os átomos envolvidos chegarão muito perto um do outro, resultando em um choque estérico. Para uma estrutura experimental de alta qualidade e alta resolução, essas regiões negligenciadas geralmente estão vazias ou quase vazias - muito poucos resíduos de aminoácidos nas proteínas têm seus ângulos de torção nessas regiões. Mas às vezes existem exclusões desta regra - esses valores podem ser encontrados e, provavelmente, resultarão em alguma tensão na cadeia de polipeptídeos. O vermelho indica regiões de baixa energia, regiões permitidas por marrom, amarelo, as chamadas regiões genericamente permitidas e regiões de regiões amarelo pálido não permitidas (HOVMÖLLER; ZHOU; OHLSON, 2002; RAMACHANDRAN, GOPALASAMUDRAM NARAYANA; RAMAKRISHNAN, CHANDRASEKHARAN; SASISEKHARAN, 1963).

Os dados apresentados pelos programas mostram que os peptídeos desenhados racionalmente se encaixam nos padrões de qualidade instituídos pelos métodos de validação apresentados com, pelo menos, 90% dos aminoácidos em regiões favorecidas e permitidas e *G-factor* maiores que -0,5, predizendo poucas chances de choques estéricos na cadeia de aminoácidos.

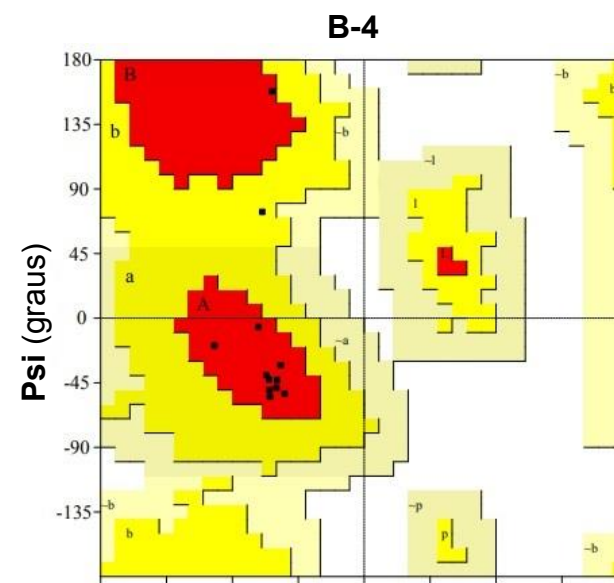
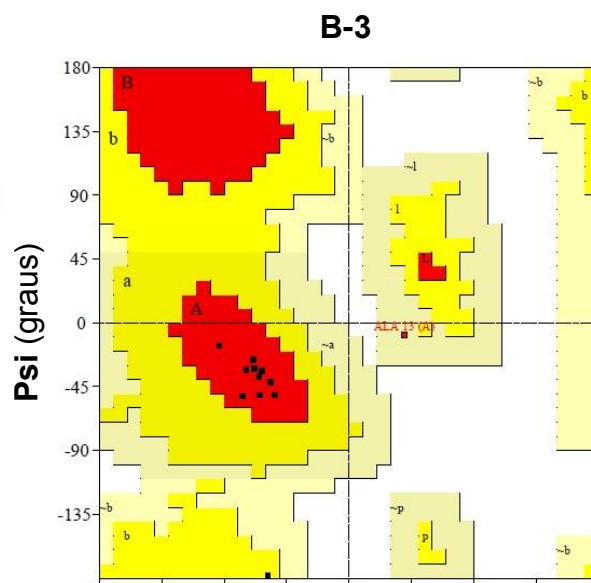
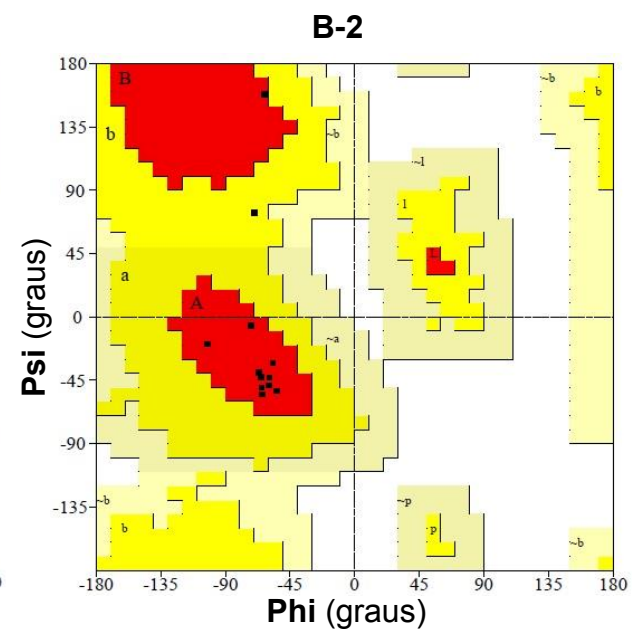
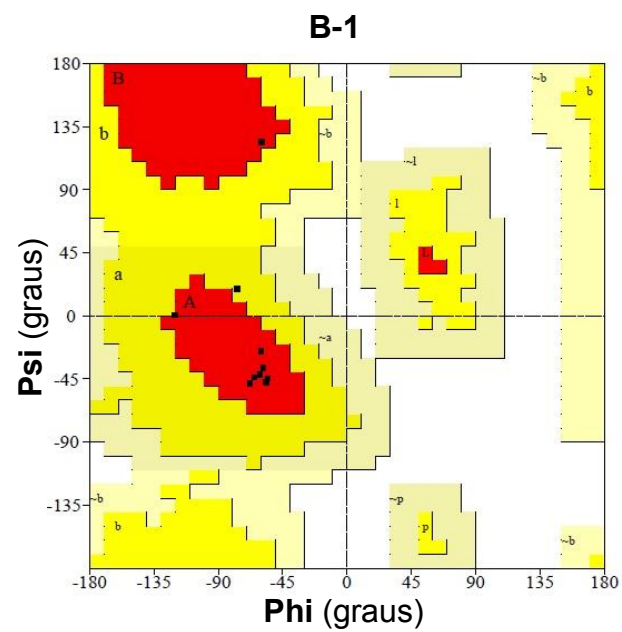
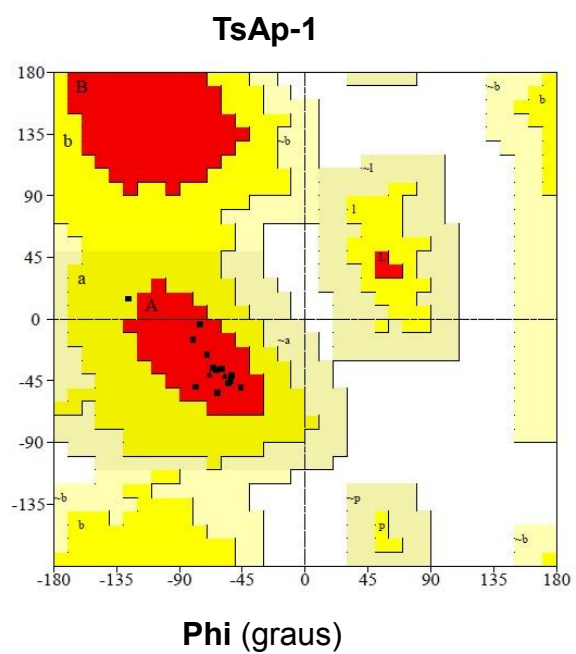


Figura 9 - Resultado do gráfico de Ramachandran para o TsAP-1 e os peptídeos B1, B2, B3 e B4 desenhados racionalmente. Os quadrados negros representam os aminoácidos comuns e os triângulos negros representam o aminoácido glicina e prolina. Legenda: Vermelho: Região favorecida; Amarelo forte: Amarelo pálido; RG: Região generosamente permitida; Branco: Região isolada.

Segundo análise por meio do servidor *on-line Prosa-web*, os valores de *Z-score* obtidos para o peptídeo controle TsAP-1, Butylatus-1, Butylatus-2, Butylatus-3 e Butylatus-4 foram de -0,16, -1,25, -1,31, -0,83 e -0,8, respectivamente. Estes resultados apontam que, comparado ao banco de dados do PDB, estes peptídeos apresentam um padrão levemente abaixo da média de 1, que é um padrão de qualidade do sistema. Contudo, isto não significa que os peptídeos são piores ou melhores que os do banco de dados, mas que apresentam um padrão diferente do inicialmente proposto pelo padrão do banco de dados consultado (ALTMAN, 2000; MARGULIES et al., 2005; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

4.3 Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

Os peptídeos Butylatus foram analisados quanto à sua interação com membranas bacterianas e estabilidade em α -hélice. Para tanto foi construída uma membrana composta de DPPE e DPPG, para simular a membrana bacteriana. Os peptídeos então foram atracados contra a membrana para permitir o contato do ligante ao alvo.

O *Docking Molecular* é um procedimento capaz de prever a melhor forma de interação entre uma molécula e um ligante. O *Docking* foi operacionalizado em duas etapas sendo a primeira a predição da estrutura e posicionamento e orientação do peptídeo com a membrana de acordo com a afinidade da molécula e o segundo com verificação de distâncias de ligação.

Neste trabalho propõe-se uma nova forma de análise da avaliação estatística por meio de média e desvio padrão, ponderando que esses dados, do ponto de vista da energia de maior frequência, tem maior probabilidade de levar a um melhor entendimento da interação receptor/membrana. Para isto foram observados as cinquenta simulações dos peptídeos com a membrana e observadas as energias de interação mais frequentes em cada simulação.

O *Docking* entre o peptídeo controle TsAP-1 e membrana aniônica (Figura 10) demonstrou média de $-5,1 \pm 0,7$ kcal/mol e energia mais frequente foi a de -5,2 kcal/mol. Já o *Docking* entre o peptídeo controle e membrana catiônica (Figura 11)

demonstrou média de energia livre de $-3,6 \pm 0,6$ kcal/mol de energia, sendo a energia mais frequente de -3,8 kcal/mol.

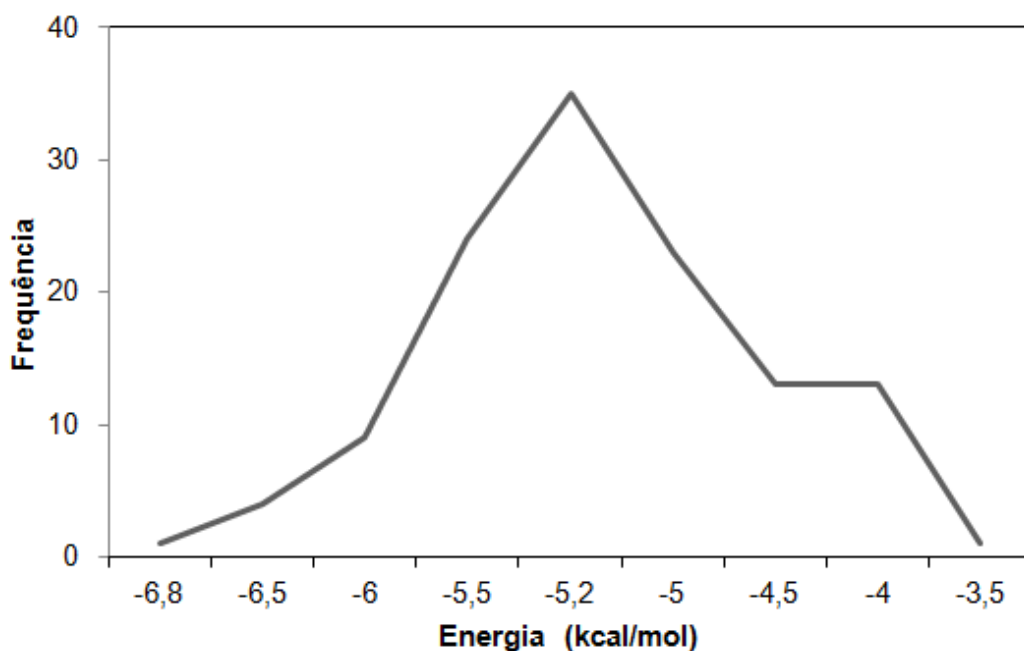


Figura 10- Interação entre o TsAP-1 e a membrana aniônica.

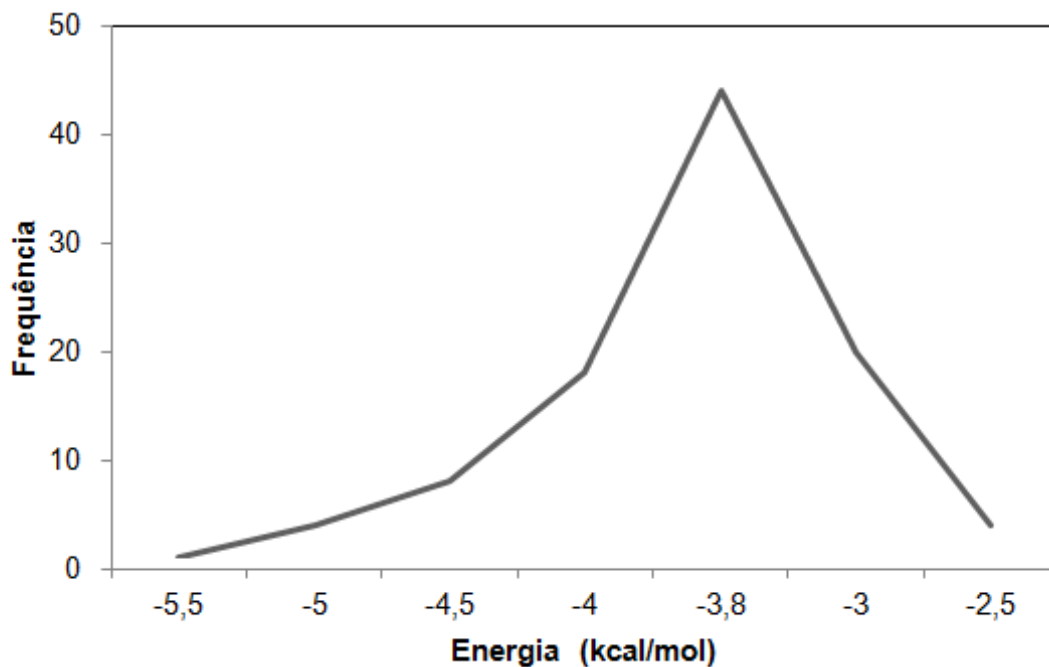


Figura 11 - Interação entre o TsAP-1 e a membrana catiônica.

A partir destes gráficos que representam os resultados das interações no *Docking*, é demonstrado que o peptídeo TsAP-1 possui afinidade por membranas

Gram-positiva e negativa, como já era esperado. Este peptídeo apresenta alta hidrofobicidade, mesmo possuindo carga líquida baixa para atividade antimicrobiana.

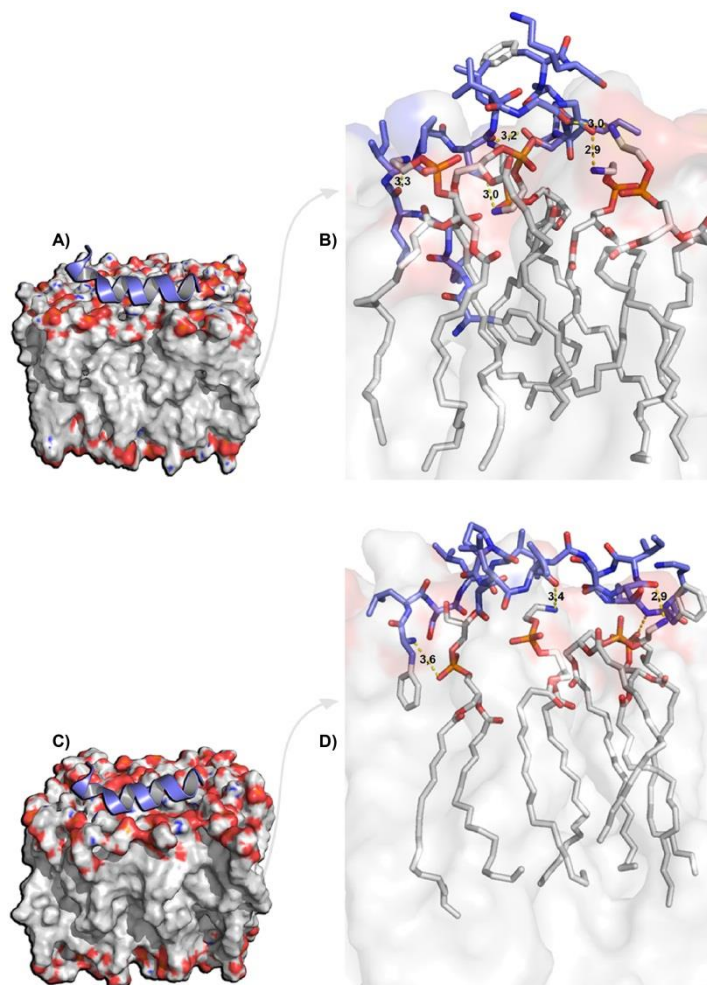


Figura 12 - Interação *in silico* entre TsAP-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,2 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-3,8 kcal/mol) (D).

Os testes *in silico* apresentados pelo *Docking* apresentam que seu primeiro contato com membranas aniônicas é de ordem eletrostática. Os resíduos hidrofílicos Ser⁷ e Ser¹⁴ interagiram com átomos de nitrogênio da cabeça polar dos fosfolipídios (DPPE² e DPPE¹), formando ligações de hidrogênio de distâncias 2,7 e 3,1 Å, respectivamente. Os resíduos apolares Gly¹⁰, Gly¹¹ e Leu⁴, realizaram interações de ligações de hidrogênio por meio de seus respectivos oxigênios com os fosfolipídios (DPPE⁸, DPPG⁴ e DPPE⁷) com distâncias de 3,0, 3,0 e 3,5 Å, respectivamente, à princípio, a Lys¹⁷ não formou interações neste estudo de *Docking*.

Quando analisa-se a interação entre o TsAP-1 e a membrana mimética catiônica, observa-se que seu primeiro contato foi por meio de uma Phe¹ utilizando nitrogênios (O14) em fosfolipídios (DPPG⁵) com distância de 3,6 Å, respectivamente. Além disso, a Val⁶ e a Ser¹² ligaram-se aos fosfolipídios DPPE⁷ e DPPE⁶, por ligações de hidrogênio, em distâncias de 3,4 e 2,9 Å, respectivamente. As interações e distâncias do *Docking* podem ser visualizadas na tabela 5.

O *Docking* entre o Butylatus-1 e membrana aniônica apresentou energia mais frequente de -5,9 kcal/mol (frequência de 41) com média de $6,0 \pm 0,5$ (Figura 13). Com a membrana catiônica observou-se energia mais frequente de -3,7 kcal/mol (frequência de 48) com média de $-3,9 \pm 0,5$ (Figura 14).

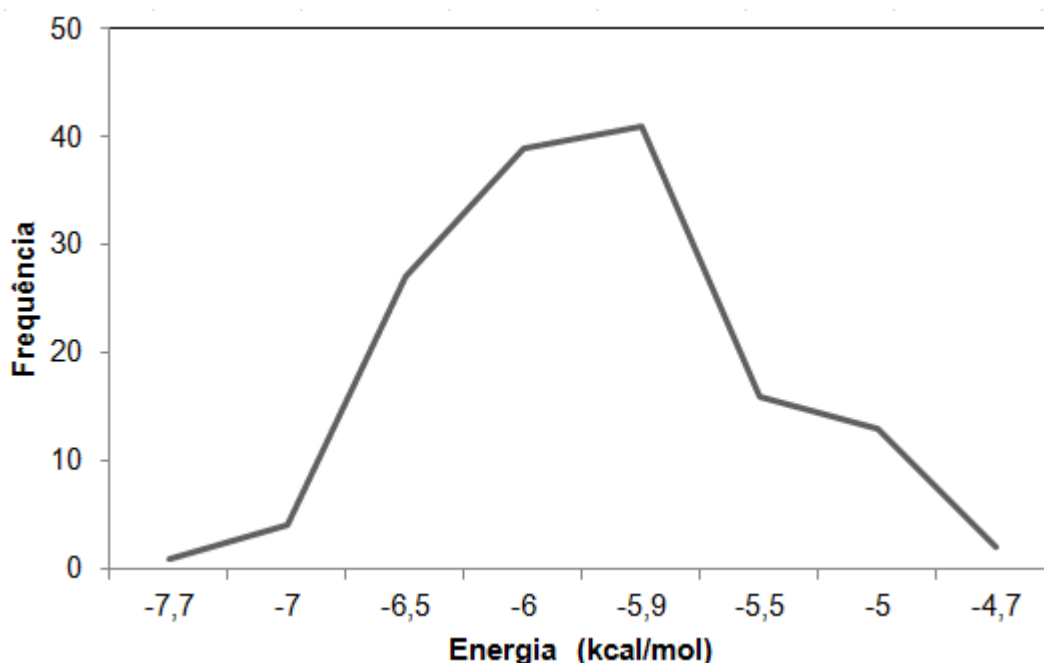


Figura 13 - Interação entre o Butylatus-1 e a membrana aniônica.

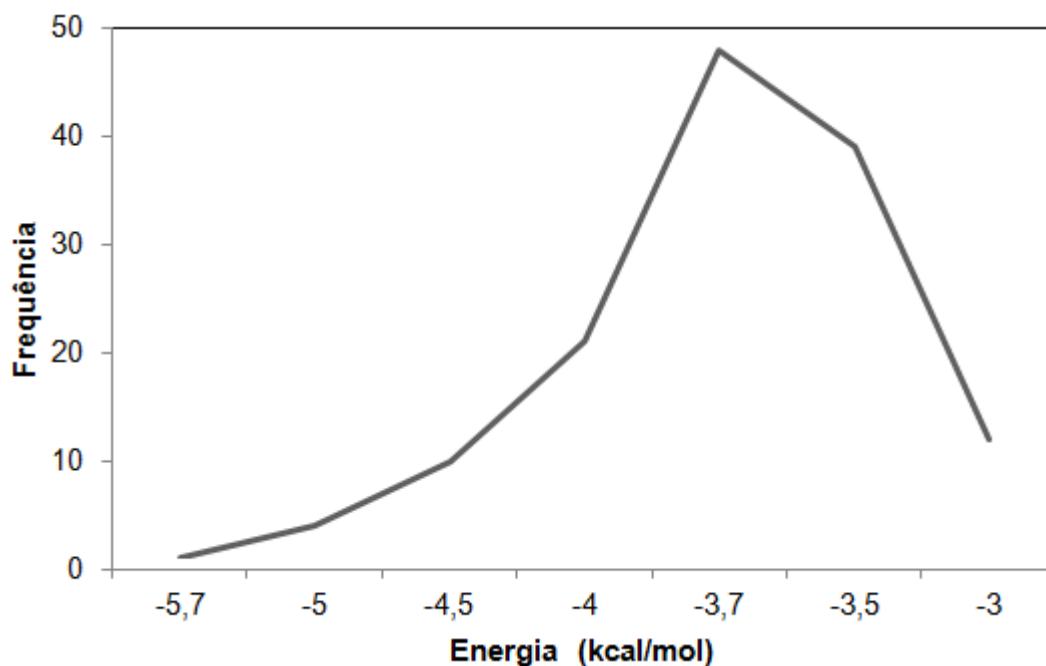


Figura 14 - Interação entre o Butylatus-1 e a membrana catiônica.

Pensando na melhor *performance* antimicrobiana, o peptídeo Butylatus-1 foi desenhado racionalmente para possuir uma face hidrofóbica e outra hidrofílica, de modo que aconteça interações em toda a extensão da membrana microbiana. Considerando sua característica catiônica (+3) e hidrofobicidade alta (relação hidrofóbica de 69%), pressupõe-se que suas primeiras interações com a membrana microbiana aconteçam por meio de interações eletrostáticas com a cabeça hidrofílica do fosfolípido.

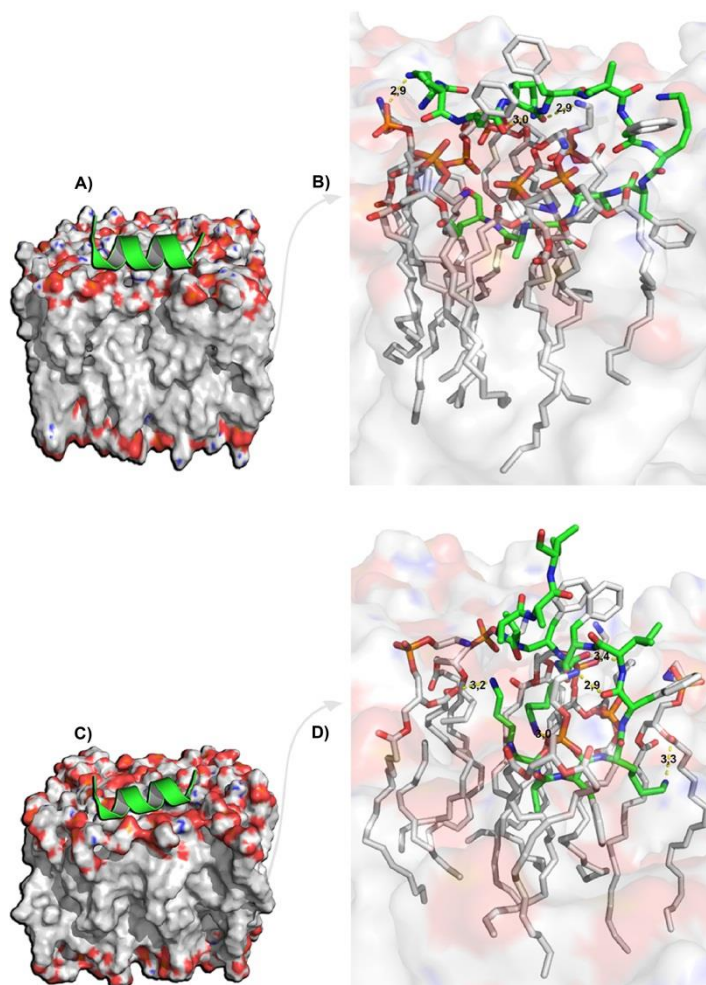


Figura 15 - Interação in silico entre Butylatus-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,9 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-3,7 kcal/mol) (D).

A partir do *Docking* entre o peptídeo Butylatus-1 e a membrana mimética aniônica, observou-se contatos eletrostáticos por meio dos resíduos Lys¹, Lys⁴, Phe⁹ e Ile¹³. A Lys⁸ não formou interações neste estudo.

Segundo as análises, as Lys¹ e Lys⁴ utilizam átomos de nitrogênio em suas cadeias laterais para interagir eletrostaticamente com oxigênios da cabeça polar dos fosfolipídios aniônicos (DPPE¹³ e DPPG¹), construindo ligações de hidrogênio com distancias de 2,9 e 2,9 e Å, respectivamente.

Quando observou-se o *Docking* entre o Butylatus-1 e a membrana bacteriana mimética Gram-positiva os possíveis contatos iniciais foram confeccionados por meio dos resíduos hidrofílicos Lys¹, Lys⁸ e Lys⁴.

Os átomos de nitrogênio da Lys¹ e Lys⁴ ligaram-se ao oxigênio dos fosfolipídios DPPE⁷ e DPPG¹⁵ com distâncias de 3,2 e 3,3 Å, respectivamente, e o oxigênio da Lys⁸ interagiu com o nitrogênio do DPPG³ com distância de 3,6 Å, todos por meio de ligações de hidrogênio e ligação iônica. Ademais, os resíduos hidrofóbicos Phe⁹ e Phe⁵ interagiram com os fosfolipídios (DPPE¹) por meio de ligações de hidrogênio com distancias de 3,0 e 2,9 Å. As interações e distancias do *Docking* podem ser visualizadas na tabela 5.

O *Docking* entre o Butylatus-2 e membrana aniônica apresentou energia mais frequente de -5,6 kcal/mol (frequência de 57) com média de $5,58 \pm 0,5$. Com a membrana catiônica observou-se energia mais frequente de -3,7 kcal/mol (frequência de 49) com média de $-4,0 \pm 0,4$.

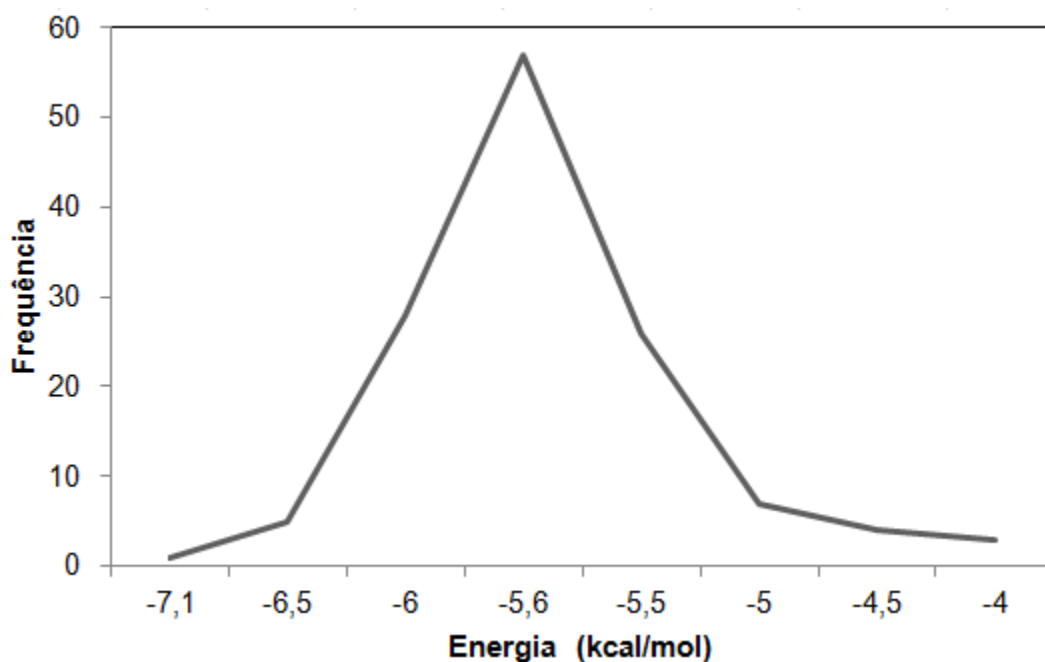


Figura 16- Interação entre o Butylatus-2 e a membrana aniônica.

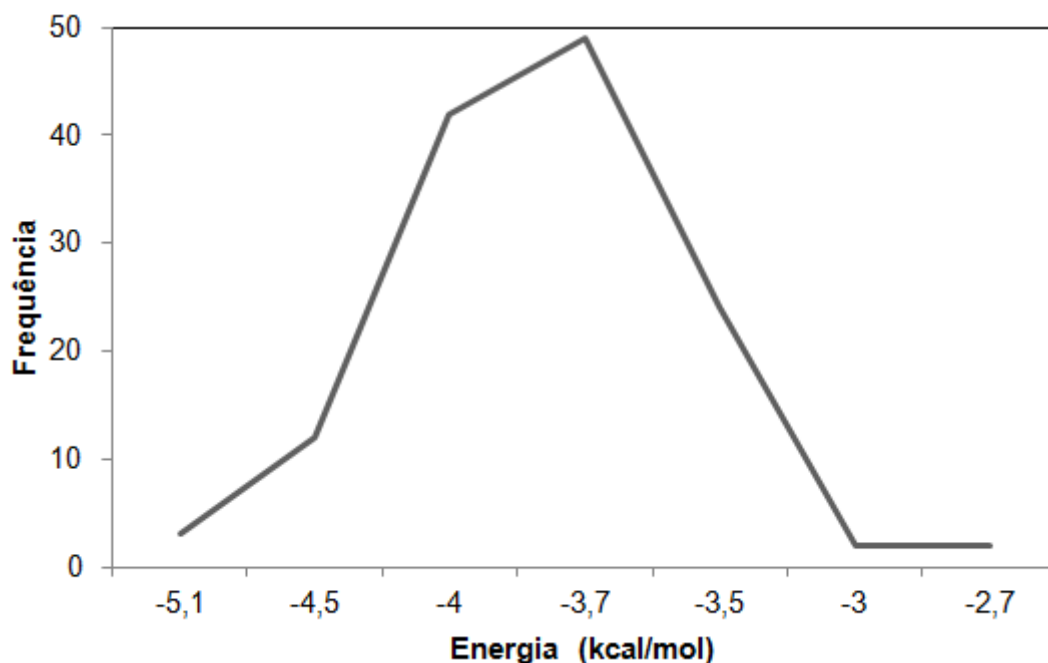


Figura 17- Interação entre o Butylatus-2 e a membrana catiônica.

O peptídeo Butylatus-2 foi racionalmente projetado para que tivesse menos resíduos, aumento da carga líquida com diminuição de sua hidrofobicidade em relação ao controle, além disso com duas argininas e duas lisinas a carga líquida para observar o comportamento deste peptídeo com estes dois resíduos catiônicos. Da mesma forma que os dois primeiros peptídeos analisados, as primeiras interações observadas no *Docking* sugerem que, tanto na membrana catiônica como na iônica, acontecem com os resíduos Lys e Arg com as cabeça hidrofílica das membranas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,6 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-3,7 kcal/mol) (D).

Quanto ao *Docking* entre o Butylatus-2 e a membrana bacteriana mimética Gram-positiva os possíveis contatos iniciais foram confeccionados por meio dos resíduos hidrofílicos Arg⁴, Arg⁷, por meio de ligações de hidrogênio, com seus nitrogênios aos fosfolipídios (DPPE², DPPE⁶) com distancias de 3,2 e 3,1 Å

respectivamente. A Lys¹ faz duas ligações utilizando dois nitrogênios, uma com o fosfolípido (DPPE¹⁵) com distância de 3,1 Å, e outra com o fosfolípido (DPPG⁵) com distância de 3,0 Å. Já a Lys⁸ utiliza um nitrogênio para ligar-se ao fosfolípido DPPE⁷ por meio de ligação iônica com distância de 3,1 Å. Além disso a Ala¹¹ e a Leu⁶, por ligações de hidrogênio e utilizando seus oxigênios, fazem ligações com fosfolípidos (DPPE¹⁵ e DPPE⁷) com distâncias de 2,8 e 3,1 Å, respectivamente. As interações e distâncias do *Docking* podem ser visualizadas na tabela 5.

Já o *Docking* entre o Butylatus-3 e membrana aniônica expôs que a energia mais frequente foi de -5,8 kcal/mol (frequência de 37) com média e desvio padrão da média de $-5,7 \pm 0,6$. Com a membrana catiônica observou-se energia mais frequente de -3,5 kcal/mol (frequência de 52) com média de $-3,6 \pm 0,5$.

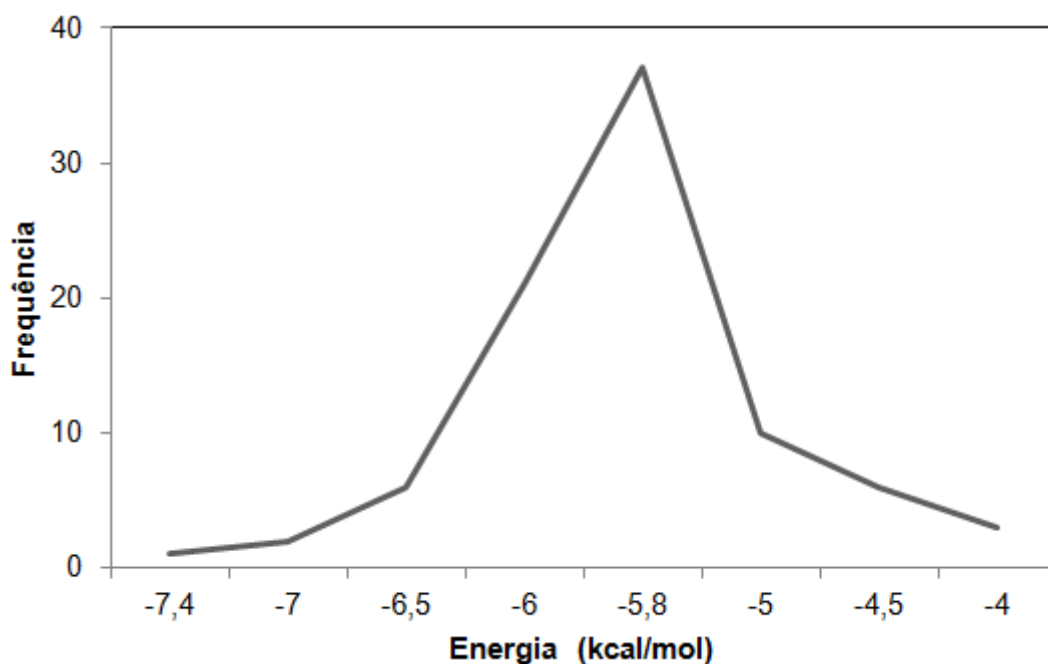


Figura 19 - Interação entre o Butylatus-3 e a membrana aniônica.

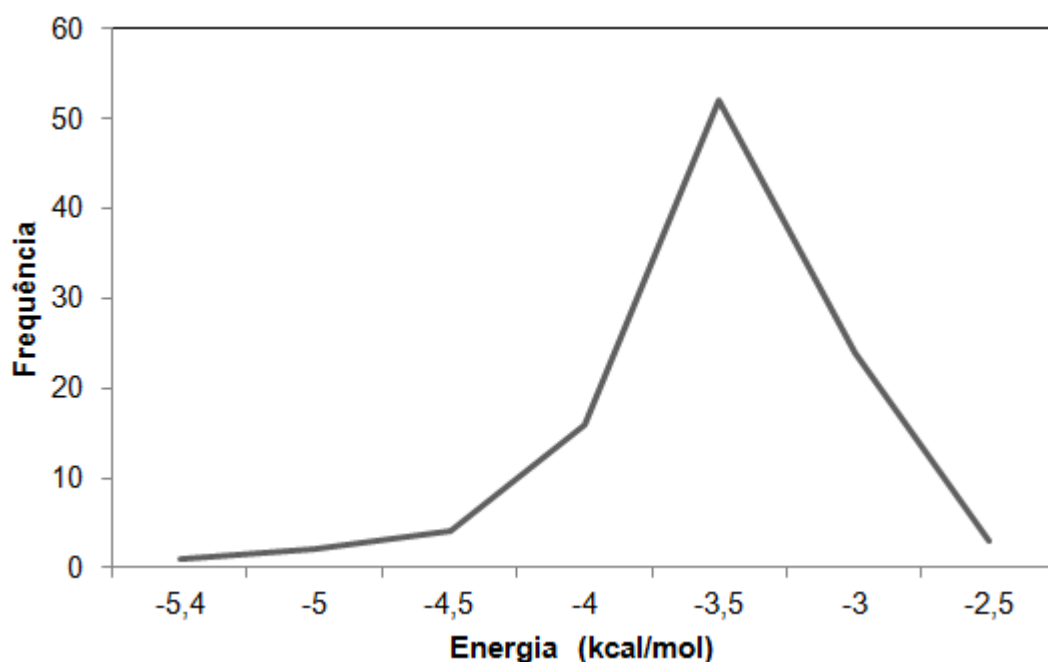


Figura 20- Interação entre o Butylatus-3 e a membrana catiônica.

Utilizando o mesmo pensamento de ser antimicrobiano, este peptídeo foi projetado para desempenhar a melhor *performance* antimicrobiana possível, o peptídeo Butylatus-3 possui uma face hidrofóbica composta por leucinas, fenilalaninas e isoleucina e outra hidrofílica com três lisinas, de modo que aconteça interações em toda a extensão da membrana microbiana. Considerando sua característica catiônica (+3) e alta hidrofobicidade (relação hidrofóbica de 76%), pressupõe-se que suas primeiras interações com a membrana microbiana aconteçam por meio de interações eletrostáticas com a cabeça hidrofílica do fosfolípido.

Seguindo a tendência dos peptídeos anteriormente analisados, o Butylatus-3 teve mais afinidade pela membrana mimética Gram-negativa do que pela Gram-positiva.

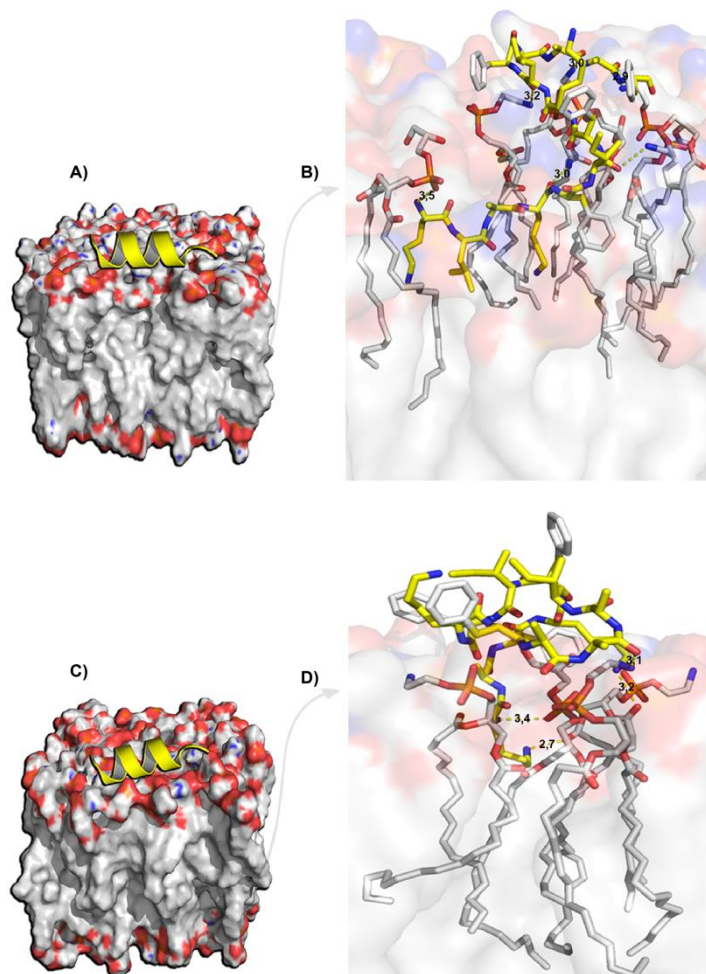


Figura 21 - Interação in silico entre Butylatus-3 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,8 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-3,5 kcal/mol) (D).

As interações na membrana mimética Gram-negativa se estabeleceram pelas Lys¹ e Lys⁴, com seus nitrogênios, aos oxigênios dos fosfolipídios (DPPG⁵ e DPPE²) com distâncias de 3,5 e 3,0 Å. Além disso, a Ala¹², Ala¹³ e Leu⁹, com seus respectivos oxigênios ligaram-se com os nitrogênios dos fosfolipídios (DPPE⁸, DPPE¹² e DPPE⁴), com distâncias de 3,0, 2,9 e 3,2 Å, respectivamente.

As interações na membrana mimética Gram-positiva se estabeleceram pela Lys¹, com seus nitrogênios, aos oxigênios dos fosfolipídios (DPPG² e DPPE⁵) com distâncias de 2,7 e 3,4 Å, respectivamente. A Lys⁴ proporcionou uma ligação de hidrogênio por meio de um nitrogênio ao oxigênio do fosfolipídio DPPE² com distância de 3,2 Å. Além das lisinas, a Ala¹¹, com seu oxigênio, ligou-se com o nitrogênio do fosfolipídio DPPE⁷, com distância de 3,1 Å.

Quando analisado o *Docking* entre o Butylatus-4 e a membrana aniônica, observou-se que a energia mais frequente foi de -5,4 kcal/mol (frequência de 36) com média e desvio padrão da média de $-5,5 \pm 0,8$. Com a membrana catiônica observou-se energia mais frequente de -4,4 kcal/mol (frequência de 47) com média de $-4,3 \pm 0,7$.

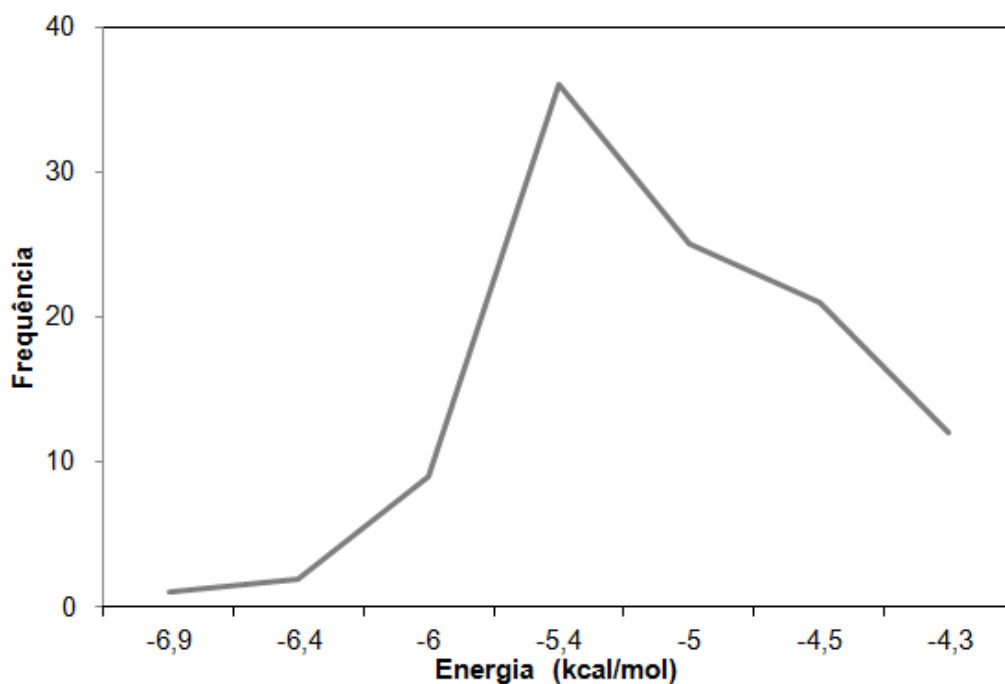


Figura 22 - Interação entre o Butylatus-4 e a membrana aniônica.

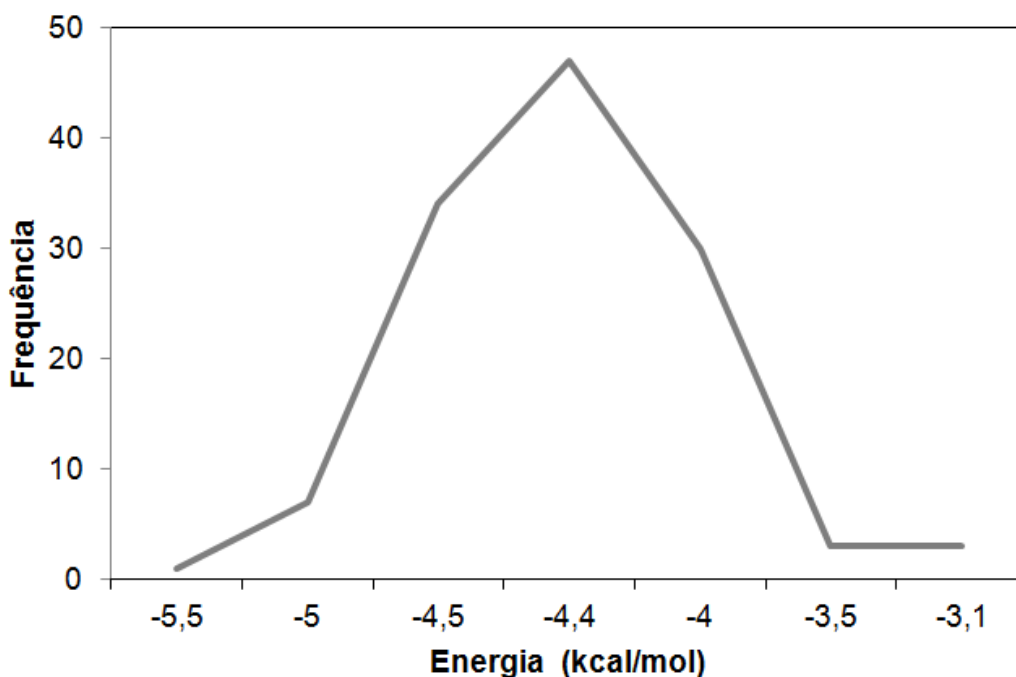


Figura 23 - Interação entre o Butylatus-4 e a membrana catiônica.

As interações na membrana mimética Gram-negativa se estabeleceram pelas Arg⁴ e Arg⁷, com seus nitrogênios e oxigênio, aos oxigênios e nitrogênio dos fosfolipídios (DPPG¹⁰, DPPE¹⁵, DPPE¹, DPPE¹, DPPE¹) com distancias de 3,1 Å. Além disso, a Ala¹¹ e Ala¹², com seus respectivos oxigênios ligaram-se com os nitrogênios dos fosfolipídios (DPPE¹⁴ e DPPE⁹), com distâncias de 3,1 e 3,2 Å, respectivamente.

As interações na membrana mimética Gram-positiva se estabeleceram pelas Arg 4 e 7, com seus nitrogênios, aos oxigênios dos fosfolipídios (DPPG³, DPPE³, DPPE², DPPE¹ e DPPE²⁵) com distancias de 3,2, 2,8, 3,1, 3,2 e 3,4 Å, respectivamente. Além das argininas, as Ala¹¹ e Ala¹² ligaram-se por meio de seus oxigênios ao o nitrogênio do fosfolipídio DPPE² e DPPE¹⁰, com distancia de 3,0 e 2,8 Å, respectivamente. As interações e distancias do *Docking* podem ser visualizadas na tabela 5.

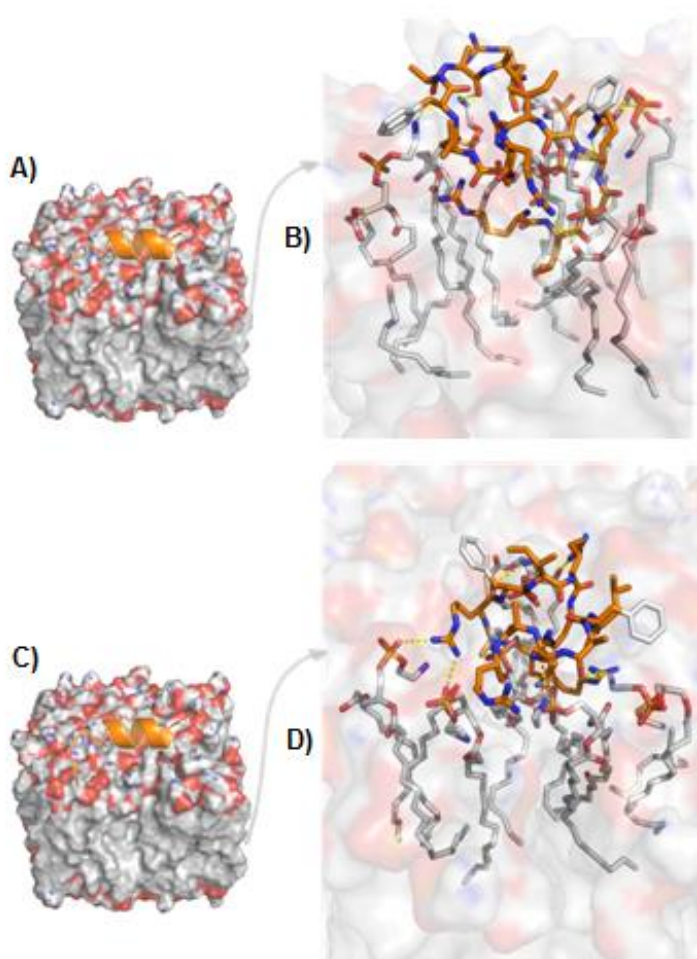


Figura 24 - Interação in silico entre Butylatus-4 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,4 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-4,4 kcal/mol) (D).

Os Butylatus obtiveram resultados parecidos quando se deparavam com membranas de Gram-negativas e -positivas, de forma que a energia média de contato para os Butylatus 1, 2, 3 e 4 foram parecidas para as Gram-negativas quando comparadas às Gram-positivas. Como já descrito neste trabalho, os peptídeos desenhados racionalmente apresentam hidrofobicidade entre 47 e 75,9%, e carga líquida entre 3 e 5, o que, em tese, contribuiu para os resultados obtidos. O primeiro contato dos peptídeos foi eletrostático, a partir das lisinas e argininas, possibilitando assim o *Docking* do restante do peptídeo. Na perspectiva dos resultados encontrados, os resíduos hidrofílicos Lys e Arg apresentaram o primeiro contato com a membrana por meio de interações de ligações de hidrogênio.

Outra observação importante a respeito dos peptídeos análogos desenhados racionalmente foram os valores de interação do *Docking*, que para membranas aniônicas apresentaram valores melhores que o controle. Padrão este que permaneceu para a membrana mimética Gram-positiva, com ressalva aos peptídeos Butylatus 1 e 4 que mesmo com frequência média um pouco abaixo que o controle ainda permanecem dentro do cálculo de desvio padrão da energia de interação. Este resultado pode ser explicado pelo maior número de resíduos Lys e Arg e a diminuição da hidrofobicidade dos análogos. Esta característica tornou os análogos mais catiônicos que seu precursor facilitando, assim, interações com membranas bacterianas.

Além disso, o posicionamento dos resíduos de aminoácidos dos Butylatus foi projetado para permitir uma distribuição mais eficiente de faces hidrofóbicas e positivamente carregadas, favorecendo a anfipaticidade da molécula, bem como distribuindo mais uniformemente os resíduos de alanina ao longo de todo o peptídeo, aumentando a probabilidade de estruturação helicoidal. Estas características dos Butylatus forneceriam uma força motriz importante para a inserção de α -hélice em bicamadas aniônicas, causando sua perturbação e morte celular.

Os resultados apresentados pelos peptídeos Butylatus no *Docking* são parecidos com o peptídeo Pa-MAP 1.9 (CARDOSO et al., 2016), o qual obteve várias interações do peptídeo com a membrana, principalmente com a membrana aniônica. Além disto, o Pa-MAP apresenta carga líquida de +4 e possui dez interações com membrana catiônica e seis interações com membrana aniônica e média de distância entre o peptídeo e a membrana de 3,2 Å. Números parecidos com os peptídeos Butylatus, contudo, os peptídeos Butylatus possuem número máximo de 14 resíduos, quanto o Pa-MAP 1.9 possui 24 resíduos. Os peptídeos Butylatus apresentam número de interações entre três e sete, sendo a média de distancias destas interações são de 3,1; 3,3; 3,1 e 3,3; dos Butylatus 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Estes resultados do Docking dos peptídeos Butylatus apresentam que mesmo com poucos resíduos, estes peptídeos são capazes de realizar interações com as membranas bacterianas. Além disso, as interações do peptídeo com a membrana se mostram como próximas, o que pode indicar que os peptídeos Butylatus ancoram bem nas membranas bacterianas. Ou seja, os peptídeos Butylatus conseguem ter varias interações com a membrana e com pouca distancia.

Tabela 5- Avaliação *in silico* das interações entre os peptídeos TsAP-1 e Butylatus-1, 2, 3 e 4 com membrana bacteriana mimética catiônica e aniônica.

	Resíduo	Átomo	Distancia (Å)	Fosfolipídio*	Átomo**	Interação
TsAP-1 (G-)	Gly-10	O	3,0	DPPE-8	N	LH
	Gly-11	O	3,0	DPPG-4	N	LH
	Ser-14	O _γ	3,2	DPPG-1	N	LH
	Ser-7	O _γ	2,7	DPPE-2	N	LH
	Leu-4	O	3,3	DPPE-7	N	LH
TsAP-1 (G+)	Phe-1	N	3,6	DPPE-5	O14	LH
	Val-9	O	3,4	DPPE-4	N	LH
	Ser-12	O	2,9	DPPE-6	N	LH
Butylatus-1 (G-)	Lys-1	NZ	2,9	DPPE-13	O14	LI
	Lys-4	NZ	3,0	DPPG-5	OC2	LI
	Ala-2	O	3,5	DPPE-16	N	LH
Butylatus-1 (G+)	Lys-8	O	3,2	DPPE-3	N	LH
	Lys-8	NZ	3,0	DPPG-3	O14	LI
	Lys-4	NZ	3,3	DPPG-15	O22	LI
	Lys-8	O	3,4	DPPE-3	N	LH
	Phe-5	O	2,9	DPPE-1	N	LH
Butylatus-2 (G-)	Arg-4	NH1	3,2	DPPE-15	O22	LI
	Lys-8	NZ	3,0	DPPG-7	O22	LH
	Lys-1	NZ	3,1	DPPG-4	O14	LH
	Arg-4	NH1	3,0	DPPE-2	O13	LI
	Phe-3	O	3,0	DPPE-1	N	LH
	Lys-8	NZ	3,5	DPPE-9	O22	LI
Butylatus-2 (G+)	Arg-4	NH2	3,2	DPPE-2	O14	LH
	Arg-7	NH1	3,1	DPPE-6	O22	LH
	Lys-1	N	3,1	DPPG-15	O22	LH
	Lys-1	NZ	3,0	DPPG-5	O14	LH
	Lys-8	N	3,1	DPPE-7	N	LH
	Ala-11	O	2,8	DPPE-15	N	LH
	Leu-6	O	3,1	DPPE-7	N	LH
Butylatus-3 (G-)	Lys-1	N	3,5	DPPE-5	O	LH
	Lys-4	N	3,0	DPPE-2	O	LH
	Ala-12	O	3,0	DPPE-8	N	LH
	Ala-13	O	2,9	DPPE-12	N	LH
	Leu-9	O	3,2	DPPE-4	N	LH
Butylatus-3 (G+)	Lys-4	N	3,2	DPPE-2	O	LH
	Lys-1	N	2,7	DPPE-2	O	LH
	Ala-11	O	3,1	DPPG-7	N	LH
	Lys-1	N	3,4	DPPE-5	O	LH
Butylatus-4 (G-)	Ala11	O	3,1	DPPE14	N	LH
	Ala12	O	3,2	DPPE9	N	LH
	Arg4	NH1	3,1	DPPE10	O14	LH
	Arg4	NH2	3,1	DPPE15	O22	LH
	Arg4	O	3,1	DPPE1	N	LH
	Arg7	NH2	3,1	DPPE1	O32	LH
Butylatus-4 (G+)	Arg4	NH2	2,8	DPPG3	OC3	LH
	Arg4	NH1	3,2	DPPG3	OC	LH
	Arg7	NH1	3,1	DPPE2	O22	LH

Ala12	O	2,8	DPPE10	N	LH
Arg14	NH1	3,4	DPPE25	O14	LH

Legenda: **LH**: ligações de hidrogênio, **LI**: ligação iônica; N: nitrogênio; O: oxigênio; Arg: arginina; Ala: alanina; Lys: lisina; Val: valina; Ser: serina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Gly: glicina; Z: átomo da cadeia principal, γ: nome da posição do átomo, H1: átomo da cadeia lateral.

*Posição do fosfolípido.

**Átomo do fosfolípido que fez a interação.

4.4 Síntese dos peptídeos

os Butylatus foram sintetizados pela empresa Aminotech. Os peptídeos foram sintetizados para realização dos testes antimicrobianos e hemolítico. A confirmação das purezas e massas moleculares observadas para os peptídeos controle e Butylatus determinada por MALDI-ToF, que apresentaram valores experimentais de 1736,1; 1501,9; 1483,8; 1615,0 e 1717,1. Valores estes que correspondem às predições dos programas de bioinformática.

4.5 Bioensaios com bactérias

Os microensaios foram realizados com o objetivo de determinar a ação dos peptídeos desenhados racionalmente e o controle em reduzir o crescimento bacteriano. Os resultados obtidos podem ser observados como apresenta a tabela 6.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com os peptídeos Butylatus e o controle sintéticos e atividade hemolítica.

	TsAP-1*	TsAP-1**	B1	B2	B3	B4
<i>E. coli</i>	160	147,5	42,6	43,1	79,3	4,7
<i>E. faecalis</i>	160	147,5	42,6	86,3	79,3	4,7
Hematócrito	160	147,5	170,5	172,5	158,5	18,6

Valores em µM

*Peptídeo purificado (GUO et al., 2013)

**Peptídeo sintetizado

Um dos objetivos deste trabalho foi, por meio do desenho racional, melhorar os atributos referentes à atividade antimicrobiana que são descritos na literatura. Quando comparados o peptídeo controle TsAP-1, observou que sua CIM foi superior àquelas observadas pelos peptídeos Butylatus. As CIM superiores são justificadas pelo aumento da carga líquida dos peptídeos desenhados racionalmente e alocação estratégica de resíduos. Quando à atividade hemolítica, foram observados que os peptídeos Butylatus tiveram melhor atividade em menor concentração que o peptídeo controle, atividade que pode ser explicada pelo fato das características mais catiônicas dos peptídeos desenhados.

Estes valores apresentados demonstram melhores atividades antibacterianas quando comparados a peptídeos análogos desenhados racionalmente como, por exemplo, o Pa-MAP2 (MIGLIOLO et al., 2016) que não obteve atividade contra estirpes Gram-positivas suscetível e resistente. Além disso, sua citotoxicidade frente a

hematócritos permaneceu muito próxima à sua ação antibacteriana, visto que a dose bactericida é muito próxima à de toxicidade. Quando comparados a outro peptídeo desenhado racionalmente, o Pexiganan (GE et al., 1999) observa-se atividade parecida com o B4, visto que este peptídeo apresentou atividade CIM de 4,7 μM para *E. coli* e 4,7 μM *E. faecalis*, as mesmas espécies testadas neste trabalho. Contudo os Butylatus são menos citotóxicos que este, e apresentaram, de forma geral, pouca atividade citotóxica em relação à atividade antibacteriana.

Ou seja, embora os peptídeos Butylatus não tenham atingido, de forma geral, limiares de ação de total destruição das bactérias nas menores concentrações, sua ação citotóxica não foi observada em altas concentrações. Além disso, podemos observar que os peptídeos desenhados racionalmente comparados, Pa-MAP2 e Pexiganan, apresentam mais que vinte resíduos de aminoácidos e massa maior que os dos peptídeos Butylatus, de forma que é possível afirmar que os Butylatus conseguem ser mais efetivos com menos resíduos de aminoácidos. Esta característica é fundamental para a produção em larga escala de fármacos, uma vez que peptídeos menores poderão ter menos custos à comercialização em grande escala.

Desta forma, há a possibilidade de correlacionar as informações obtidas por métodos *in silico* com os resultados obtidos com os resultados *in vitro*. A partir dos resultados obtidos *in silico*, observou-se que as energias de interação com membranas miméticas no *Docking* foi suficientemente baixas. Os artigos normalmente trazem os resultados do *Docking* na menor energia livre obtida nas simulações do *Docking*. A metodologia deste trabalho traz a maior frequência obtida (CARLSSON; BOUKHARTA; AQVIST, 2008; HAYES et al., 2018). Esta baixa energia de interação pode explicar a ação dos peptídeos, uma vez que em baixas concentrações foi possível observar atividade de inibição de crescimento bacteriano. Os resíduos carregados positivamente podem ter interagido com as membranas bacterianas e causado poros nela ou, ainda, enfraquecido a estrutura da membrana, impedindo que houvesse o crescimento bacteriano.

Mesmo que as interações apontem, de certa forma, para atividade para aquelas Gram-positivas, pode-se concluir que as perspectivas são que os peptídeos Butylatus apresentem ambivalência para atividade antimicrobiana. Tal perspectiva

se relaciona com os resultados *in vitro*, visto que houve inibição do crescimento de bactérias Gram-negativa e -positiva. Resultados estes que se relacionam, também, com as perspectivas da literatura, uma vez que peptídeos extraídos e remodelados de escorpiões são bioativos contra bactérias Gram-positivas e -negativas (HARRISON et al., 2014; OLIVEIRA; LACERDA, 2014; PERUMAL SAMY et al., 2017).

Mesmo que os peptídeos *Butylatus* não sejam de total aplicação na cura da saúde humana, principalmente por via intravenosa, ainda poderão ter relevância em outros cenários como por exemplo a atividade inibitória de crescimento de bactérias que são endêmicas em criação de animais para consumo humano, tratamento de feridas por meio de uso tópico, entre outras.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises dos resultados obtidos por meio de métodos de bioinformática, considerando o comportamento físico-químico dos peptídeos desenhados racionalmente e sua relação com as atividades *in vitro* é possível afirmar que estes peptídeos estudados são candidatos a futuros produtos antibacterianos, principalmente os peptídeos B1 e B4 por apresentarem os melhores resultados nos testes *in silico* e *in vitro*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 2013.

ALMAAYTAH, A. et al. Enhanced Antimicrobial Activity of AamAP1-Lysine, a Novel Synthetic Peptide Analog Derived from the Scorpion Venom Peptide AamAP1. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. May 2016, p. 502–516, 2014.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.

ALTMAN, E. I. Predicting financial distress of companies: Revisiting the Z-Score and ZETA® models. **Handbook of Research Methods and Applications in Empirical Finance**, v. 53, n. July, p. 428–456, 2000.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BRASIL. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 44, DE 17 DE AGOSTO DE 2009. **Dou**, p. 4, 2009.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

CALISKAN, F. et al. Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 76, p. 350–361, 2013a.

CALISKAN, F. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1216–1222, 2013b.

CARDOSO, M. H. et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

CARLSSON, J.; BOUKHARTA, L.; AQVIST, J. Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. **J Med Chem**, v. 51, n. 9, p. 2648–

56, 2008.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

COHEN, N. C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**. 1st Editio ed. [s.l.] Academic Press, 1996.

CONWELL, M. et al. Interspecies transfer of vancomycin, erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.

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 - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, 1999.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DAVY, P. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. v. 86, p. 77–89, 1993.

DE MELO, E. T. et al. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Peptides**, v. 68, p. 3–10, 2015.

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

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

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números - 2015: Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. p. 43, 2016.

DU, Q. et al. AaeAP1 and AaeAP2: Novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion, *Androctonus aeneas*: Structural characterisation, molecular cloning of biosynthetic precursor-encoding cDNAs and engineering of analogues with enhanced antimicrobial and antica. **Toxins**, v. 7, n. 2, p. 219–237, 2015.

ESWAR, N. et al. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 426, p. 145–59, 2008.

FALCAO, L. L. et al. Peptides Antimicrobial properties of two novel peptides derived from Theobroma cacao osmotin. **Peptides**, v. 79, p. 75–82, 2016.

FAN, Z. et al. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus peptide from the venom of the scorpion Chaerilus tricoatus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5220–5229, 2011.

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

GE, Y. et al. In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan , an Analog of Magainin In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan , an Analog of Magainin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 782–788, 1999.

GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **Journal of biomolecular NMR**, v. 9, n. 2, p. 127–35, 1997.

GONZÁLEZ-CANDELAS, F. et al. The Evolution of Antibiotic resistance. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**, n. December, p. 305–337, 2011.

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

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A Assistência Farmacêutica e o Aumento da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos. **Am. J. Pharm**, v. 27, n. 1, p. 118–23, 2008.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, dez. 2006.

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

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

HAYES, J. M. et al. Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase

ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined. **J Med Chem**, v. 51, n. January, p. 703–719, 2018.

HEINEN, T. E. et al. Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 63–74, 2014.

HERSHBERGER, E. et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 127–130, 2005.

HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. 2003.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, n. 1, p. 1–10, 2014.

HOVMÖLLER, S.; ZHOU, T.; OHLSON, T. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 5, p. 768–776, 2002.

HUIJBERS, P. M. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 1–2, p. 120–125, 2015.

HWANG, I. et al. Synergistic Effect and Antibiofilm Activity Between the Antimicrobial Peptide Coprisin and Conventional Antibiotics Against Opportunistic Bacteria. **Current Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 56–60, 30 jan. 2013.

KING, G. F.; HARDY, M. C. Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 475–496, 2013.

KITAGAWA, H. et al. Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry**, v. 47, p. 18–22, 2016.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Homology Modeling. v. 857, p. 231–257, 2012.

LADRAM, A. P. N. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. v. 21, p. 1341–1371, 2016.

LEE, J.-K. et al. Antibacterial Efficacy of a Human β -Defensin-3 Peptide on Multispecies Biofilms. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1625–1629, dez. 2013.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–380, 2005.

MICHAEL T. MADIGAN, JOHN M. MARTINKO, KELLY S. BENDER, DANIEL H. BUCKLEY, D. A. S. **Microbiologia de Brock**. 14^o ed. [s.l: s.n.].

MIGLIOLO, L. et al. Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p. 1488–1498, 2016.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 45, p. 382–384, 1960.

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.

OHMORI, N. et al. Interaction of α -helical peptides with phospholipid membrane: effects of chain length and hydrophobicity of peptides. **The Journal of Peptide Research**, v. 51, n. 2, p. 103–109, 2009.

OLIVEIRA, D. M. DE; LACERDA, A. F. Peptídeos antimicrobianos: biotecnologia aplicada a saúde. **Revista de Saúde da Fiaciplac**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2014.

PEDRON, C. N. et al. Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 456–463, 2017.

PEREIRA, M. S. et al. A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto contexto enferm**, v. 14, n. 2, p. 250–257, 2005.

PERUMAL SAMY, R. et al. **Animal venoms as antimicrobial agents**. [s.l: s.n.]. v. 134

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, 2003.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, n. July 2013, p. 328–342, 2013.

RAMACHANDRAN, GOPALASAMUDRAM NARAYANA; RAMAKRISHNAN, CHANDRASEKHARAN; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of molecular biology**, v. 7, p. 95–99, 1963.

RAMÍREZ-CARRETO, S. et al. Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. **Peptides**, v. 34, n. 2, p. 290–295, 2012.

RATES, B. et al. Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.

ROBERTS, LARRY S., 1935-; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004: Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004, 2004.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

ROZEK, A. et al. Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability. **Biochemistry**, v. 42, n. 48, p. 14130–14138, 2003.

RTIMI, S. et al. Duality in the Escherichia coli and methicillin resistant Staphylococcus aureus reduction mechanism under actinic light on innovative co-sputtered surfaces. **Applied Catalysis A: General**, v. 498, p. 185–191, 2015.

SADREDINAMIN, M. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs). **Novelty in Biomedicine**, v. 4, p. 70–76, 2016.

SAROJINI, V. Peptides: From Emil Fischer to Psa. **Chemistry in New Zealand**, v. 1142, n. July, p. 79–86, 2013.

SAÚDE, M. DA. **Manual de controle de escorpiões manual de controle de escorpiões**. [s.l: s.n.].

SCHAFFERHANS, A.; KLEBE, G. Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 407–427, 2001.

SEO, M.-D. et al. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 12276–12286, 2012.

SHEN, Y. et al. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. **Journal of biomolecular NMR**, v. 44, n. 4, p. 213–23, 23 ago. 2009.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

STRYJEWSKI, M. E.; JONES, R. N.; COREY, G. R. Ceftaroline: Clinical and microbiology experience with focus on methicillin-resistant Staphylococcus aureus after regulatory approval in the USA. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 81, n. 3, p. 183–188, 2015.

TARAZI, S. Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article. **The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1–9, 2015.

THOMAS, S. et al. CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL.1, p. 774–780, 2009.

TRINDADE, B. et al. Evaluation of antimicrobial susceptibility of facultative anaerobic bacteria isolated in root-filled teeth with persistent infection front to use of systemic antibiotics. **Rev Odontol UNESP**, v. 44, n. 4, p. 200–206, 2015.

USACHEV, K. S. et al. High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 61, n. 3–4, p. 227–234, 2015.

VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

VAN HOEK, M. L. Antimicrobial peptides in reptiles. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 6, p. 723–753, 2014.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: A peer-reviewed journal for formulary management (2015)**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [s.l: s.n.]. v. 53

VIANNA, J. S. et al. Drug Resistance in *Helicobacter Pylori*. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 4, p. 215–223, 2016.

VRIENS, K. et al. Synergistic Activity of the Plant Defensin HsAFP1 and Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms and Planktonic Cultures. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0132701, 6 ago. 2015.

WAGHU, F. H. et al. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.

WANG, G. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 728–758, 2013.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Issn 1810-0791**, v. 1, n. 4, p. 1–5, 2004.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 407–410, 2007.

XU, X. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii*. **Journal of Proteomics**, v. 106, p. 162–180, 2014.

YEAMAN, M. R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YUAN, W. et al. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 22–26, 2010.

ZAMBRANO, R. et al. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. v. 43, n. April 2015, p. 306–313, 2018.

ZENG, X. C. et al. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides**, v. 45, p. 28–34, 2013.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1–8, 2008.