



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOTECNOLOGIA

**Avaliação microbiológica *in vitro* e *in silico* de peptídeos
bioinspirados na temporina-PTa da secreção cutânea de
*Hylarana picturata***

Autora: Patricia Souza e Silva

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

Campo Grande- Mato Grosso do Sul

Maio-2020

PATRICIA SOUZA E SILVA

Avaliação microbiológica *in vitro* e *in silico* de peptídeos bioinspirados na temporina-PTa da secreção cutânea de *Hylarana picturata*

Autora: Patricia Souza e Silva

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

"Tese 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 "

Campo Grande- Mato Grosso do Sul

Maio-2020

S586a Silva, Patrícia Souza e

Avaliação microbiológica in vitro e in silico de peptídeos bioinspirados na temporina-PTa da secreção cutânea de *Hylarana picturata*/ Patrícia Souza e Silva, sob orientação do Prof. Dr. Ludovico Migliolo

76 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, 2020

Bibliografia: p. 70 a 76

1. Bactérias - Doenças. 2. Peptídeos antimicrobiano.
3. Estudos - Simulação computadorizada. I. Migliolo, Ludovico. II. Título.

CDD: 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

“Avaliação microbiológica *in vitro* e *in silico* de peptídeos bioinspirados na temporina-PTa da secreção cutânea de *Hylarana picturata*”

Autora: Patrícia Souza e Silva

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 24 de abril de 2020.

Ludovico Migliolo

Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB

Octávio Luiz Franco

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco - UCDB

Sergio Leonardo Espindola Preza

Prof. Dr. Sergio Leonardo Espindola Preza - UFMS

AGRADEIMENTO

Meus agradecimentos primeiramente a Deus por me sustentar me dando sabedoria para lidar com as adversidades diárias e nunca me abandonar.

Ao meu orientador Ludovico Migliolo por me orientar com sabedoria e paciência me deixando livre para expor a minha ciência, e por ser um amigo nos momentos difíceis me aconselhando do jeito dele, mas que fez muita diferença nos meus momentos difíceis.

Ao Samuel Ricardo Souza meu filho que veio inesperadamente no meio de tudo e me ensinou a ter calma, paciência e saber que existe um amor imensurável, hoje em dia não vejo minha vida sem você meu filho te amo muito.

A minha mãe Maria do Carmo e meu pai Roger Eleutério por me apoiar e me ajudar, os concelhos foram fundamentais para que eu não desistisse dos meus sonhos e objetivos, por me ensinarem a ser essa pessoa determinada, obrigada por estarem comigo em todos os momentos, amo vocês.

A todos que participaram direta ou indiretamente do meu trabalho, ajuda de vocês foi imprescindível para que eu finalizasse meus resultados. Aos meus Bamigos que estiveram comigo me apoiando e me aconselhando meu muito obrigada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Patrícia Souza e Silva nasceu em 19 de maio de 1993 é segunda de filha da Maria do Carmo Souza e Valdivino de Souza e Silva, estudou em colégios públicos durante toda a formação do fundamental ao ensino médio, cursou a graduação em Biologia Licenciatura na Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), tem como área de conhecimento da proteômica voltada para a biotecnologia.

SUMÁRIO

Pagina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
LISTA DE ABREVIACÕES.....	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.2. BACTÉRIAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES NOSOCOMIAIS.....	23
1.3. BIOFILME BACTERIANO.....	24
1.4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	27
1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS.....	28
1.6. AS TEMPORINAS	32
1.7. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL.....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.2. SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO.....	36
3.3. ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	36
3.3.1. ATIVIDADE FRENTE AS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	36
3.3.2. ATIVIDADE FRENTE ÀS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	37
3.3.4. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	38
3.3.5. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE BIOFILME (CIMB)	38
3.3.6. ENSAIO HEMOLÍTICO.....	38
3.3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM CÉLULAS VERO.....	39
3.4. ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	39
3.4.1. MODELAGEM MOLECULAR	39
3.4.3. DINÂMICA MOLECULAR EM BICAMADAS DE DPPE/DPPG	41

4.	RESULTADOS	42
4.1.	MODIFICAÇÃO RACIONAL DA TEMPORINA-PTA	42
4.2.	SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO.....	43
4.3.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	44
4.4.	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	47
4.4.1.	MODELAGEM MOLECULAR	47
4.4.2.	ANÁLISE ESTRUTURAL EM ÁGUA, TFE E SDS	48
4.4.3.	DINÂMICA MOLECULAR EM BICAMADAS DE DPPE /DPPG	51
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÃO.....	69
7.	BIBLIOGRAFIA	70

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Pagina

Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1. Inseto triatomíneo se alimenta do sangue de mamífero: tripomastigotas metacíclicos são secretados pelas fezes e invadem o organismo hospedeiro pelo local da picada ou via mucosa; 2. Tripomastigotas metacíclicos são altamente infectivos e penetram em diversas células próximas ao local da invasão; 3. Uma vez dentro das células do tecido infectado, tripomastigotas transformam-se em amastigotas, estágio no qual multiplicam-se por fissão binária; 4. Após alguns ciclos de divisão, amastigotas transformam-se em tripomastigotas que rompem as células, uma vez na corrente sanguínea os tripomastigotas podem invadir outras células (transformando-se novamente em amastigotas) ou eventualmente são ingeridos pelo inseto triatomíneo 5.; 6. Tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor; 7. Epimastigotas multiplicam-se no intestino médio do barbeiro; 8. Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos na região do reto do inseto, completando o ciclo biológico do *T. cruzi*. Fonte: Autora criado no biorender..... 22

Figura 2: Mapa Mundi destacando a previsão de mortalidade anual atribuível a resistência bacteriana em 2050. Fonte: (FERNANDES et al., 2016). 24

Figura 3: Esquema do desenvolvimento de biofilmes bacterianos destacando cinco estágios. (1) Adesão das células planctônicas a uma superfície sólida ou líquida; (2) crescimento sésil; (3) - expansão e maturação da estrutura produzindo a matriz extracelular (EPS); (4) dispersão celular e indução de fatores de dissociação; (5) colonização de outras superfícies por células livres-nadantes. Fonte: Autoral feita no biorender 25

Figura 4: Infecções relacionadas a dispositivos (azul) e aos tecidos (vermelho) causados por biofilmes bacteriano. Fonte: adaptado de (HØIBY et al., 2015). 26

Figura 5: Estrutura dos PAMs mostrando as regiões hidrofílicas (em azul) e hidrofóbicas (em vermelho). (A) Magainina (GESELL; ZASLOFF; OPELLA, 1997); (B) Protegrin-2 (USACHEV et al., 2015), (C) Indolicidina (ROZEK et al., 2003) (ROZEK, 2003); (D) Defensina- 2 (VRIENS et al., 2015); Código PDB respectivamente 2MAG; 1IJV; 1G89 2MUH..... 28

Figura 6: Alinhamento comparando a sequência análogas com o parental. (A) alinhamento entre as sequências parental temporina-PTa e análoga temphylarata-1. (B) alinhamento entre as sequências parental temporina-PTa e análoga temphylarata-2. A projeção em hélice dos peptídeos apresenta uma seta onde está representada o momento hidrofóbico. (C) na projeção de temporina-PTa os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos e verde são apolares e os em cinza e roxo polares não-carregados. (D) na projeção de temphylarata-1 os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos são apolares e os em cinzas polares não-carregados. (E) na projeção de temphylarata-2 os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos são apolares e os em cinzas polares não-carregados..... 43

Figura 7: Espectrometria de electrospray dos peptídeos. (A) temporina-PTa com a massa molecular de 1465,1 com $[M+H]^+$. (B) temphylarata-1 com a massa molecular de 1394,6 com $[M+H]^+$. (C) temphylarata-2 com a massa molecular de 1466,1 com $[M+H]^+$ 44

Figura 8: Modelagem molecular dos peptídeos. (A) modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temporina-PTa. (B) representação da energia livre do temporina-PTa. (C) modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temphylarata-1. (D) representação da energia livre

do temphylarata-1. **(E)** modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temphylarta-2. **(E)** representação da energia livre do temphylarata-2. Em azul energia positiva, em vermelho energia negativa e em branco a energia é zero. 48

Figura 9: Conformação em α -hélice dos peptídeos frente a diferentes ambientes. **(A)** água. **(B)** 50% de TFE e **(C)** micelas de SDS. 50

Figura 10: Representação do RMSD é o valor médio para o desvio médio dos átomos dos peptídeos frente aos fosfolipídios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. **(A)** RMSD do peptídeo parental temporina-PTa em membrana aniônica. **(B)** RMSF do temporina-PTa em membrana catiônica. **(C)** RMSD do temphylarata-1 em membrana aniônica. **(D)** RMSD do temphylarata-2 em membrana catiônica. **(E)** RMSD do temphylarata-2 membrana aniônica. **(F)** RMSD do temphylarata-2 em membrana catiônica..... 52

Figura 11: Representação do Rg (raio de giro), dos peptídeos frente aos fosfolipídios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. e **(B)** Temporina-PTa, em **(A)** membrana aniônica. e **(B)** membrana catiônica. Temphylarata-1 em **(C)** membrana aniônica e **(D)** membrana catiônica. Temphylarata-2 em **(E)** membrana catiônica e **(F)** membrana catiônica. 54

Figura 12: Representação do RMSF, dos peptídeos frente aos fosfolipídios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. e **(B)** Temporina-PTa, em **(A)** membrana aniônica. e **(B)** membrana catiônica. Temphylarata-1 em **(C)** membrana aniônica e **(D)** membrana catiônica. Temphylarata-2 em **(E)** membrana catiônica e **(F)** membrana catiônica..... 56

Figura 13: Interações in silico dos peptídeos com os fosfolipídios aniônicos e catiônicos. **(A)** resíduos de aminoácidos de temporina-PTa em interação com fosfolipídios aniônicos e em **(B)** resíduos de aminoácidos de interação com fosfolipídios catiônicos. Em **(C)** resíduos de aminoácidos de temphylarata-1 em interação com os fosfolipídios aniônicos e em **(D)** interação com fosfolipídios catiônica. **(E)** resíduos de aminoácidos de temphylarata-2 em interação com os fosfolipídios aniônicos e em **(F)** interação com fosfolipídios catiônica..... 58

Figura 14: Posicionamento aos centros das membranas, peptídeos (roxo) frente à os fosfolípidos DPPE (preto) e DPPG (verde) na interface entre a água (azul). **(A)** temporina-PTa em interação com fosfolipídios aniônicos **(B)** temporina-PTa em interação com fosfolipídios catiônicos. **(C)** temphylarata-1 em interação com os fosfolipídios aniônicos. **(D)** temphylarata-1 em interação com fosfolipídios catiônica. **(E)** temphylarata-2 em interação com os fosfolipídios aniônicos. **(F)** temphylarata-2 em interação com fosfolipídios catiônica. 64

Tabela 1: Alguns PAMs com ação antimicrobiana encontrados em secreções de anfíbios. 30

Tabela 2: temporinas sintéticas de amplo espectro de ação..... 33

Tabela 3: Ação dos peptídeos frente a protozoário *T. cruzi* nas fases inicial e final de desenvolvimento..... 45

Tabela 4: Toxicidade para células bacterianas, eritrócitos, células veras, concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações inibitórias e biofilme mínimas (CIMB) dos peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2..... 46

Tabela 5: Avaliação in silico das interações entre temporina-Pta em membrana bacteriana Gram-negativa..... 59

Tabela 6: Avaliação in silico das interações entre temporina-Pta em membrana bacteriana Gram-positiva. 60

Tabela 7: Avaliação in silico das interações entre temphylarata-1 em membrana bacteriana Gram-negativa..... 60

Tabela 8: Avaliação in silico das interações entre temphylarta-1 em membrana bacteriana Gram-positiva. 61

Tabela 9: Avaliação in silico das interações entre temphylarata-1 em membrana bacteriana Gram-negativa..... 62

Tabela 10: Avaliação in silico das interações entre temphylarta-2 em membrana bacteriana Gram-positiva. 62

LISTA DE ABREVIACÕES

APD - *Antimicrobial Peptide Database*

CBM - Concentração bactericida mínima

CIM - Concentração inibitória mínima

CIMB - Concentração inibitória mínima de biofilme

DM - Dinâmica Molecular

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

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

DTS - Doenças tropicais negligenciadas

MM - Modelagem Molecular

OMS - Organização Mundial de Saúde

P&D - Pesquisa e Desenvolvimento

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

PCDH - Peptídeos catiônico de defesa do hospedeiro

QS - *Quorum sensing*

Rg - Raio de giro

RMSD - Desvio médio da raiz quadrada

RMSF - Desvio da Flutuação Mdia

RESUMO

Dos novos fármacos que chegaram ao mercado, apenas 3,1%, tinham como alvo doenças tropicais negligenciadas (DNTs), por exemplo Doença de Chagas. Assim como as DNTs as infecções nosocomiais são um problema mundial com medicamentos antibacterianos cada vez mais ineficientes levando a resistência e formação de biofilmes cada vez mais comuns nos ambientes hospitalares. Diante deste panorama, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) sintéticos bioinspirados em toxinas têm apresentado potencial para se tornarem alternativas para essa problemática. Os PAMs podem ser encontrados praticamente em todos os reinos desde bactérias a vertebrados. Em anuros, na secreção cutânea já foram descritas e caracterizadas diversas moléculas antimicrobianas, como por exemplo a temporina PTa. Portanto, este trabalho propõe a avaliação de peptídeos análogos a temporina-PTa de *Hylarana picturata* contra protozoário *Trypanosoma cruzi* e bactérias resistentes, formadoras de biofilme. A metodologia usada no trabalho foi o planejamento racional com base na temporina-PTa (controle) mantendo 70% das características físico-químicas. Após a síntese do controle e análogos foi realizada a quantificação por meio de absorvância. As análises *in vitro* sobre o efeito antiprotozoa foram realizadas frente as formas epimastigota e tripomastigota em cultura. Já os testes *para determinação da* concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) e a hemolítica foram realizadas em meio Muller Hinton. Além disso, em adição, estudos *in silico* de modelagem e dinâmica molecular foram realizados frente as membranas miméticas biológicas Gram-negativa e -positiva. sequências análogas foi a substituição pontual de resíduos de aminoácidos no peptídeo parental com a intenção de aumentar a carga líquida total, ajustar a hidrofobicidade, anfipacidade e reorganizar o momento hidrofóbico mantendo 69% e 77% da característica original. O parental temporina-PTa e os seus análogos temphylarata-1 e temphylarta-2 foram tóxicos para as células do *T. cruzi* na forma tripomastigota com atividade chegando a 84, 48 e 83 %. O peptídeo parental temporina-PTa eliminou as células bacterianas na concentração mínima de 43,4 µM. Os análogos O temphylarata-1 e temphylarata-2 eliminaram em 99,9 % as células bacterianas testadas nas concentrações 3 a 23 µM. A temporina-PTa não apresentou atividade significativa contra a interrupção da formação de biofilme, os análogos interromperam o biofilme nas concentrações 92 a 43,6 µM. Os peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2 não foram hemolíticos e nem tóxicos para células Vero. Em *in silico* os peptídeos parentais perdem sua conformação em água, em contrapartida os análogos permanecem com a conformação helicoidal. Frente a interação peptídeo-membrana temporina-PTa atração entre 2,7 a 3 Å, temphylarata-1 com atrações variando em 2,6 a 3,2 Å e temphylarata-2 de 2,6 a 3,4 Å. Por fim, os peptídeos se mostraram excelentes candidatos para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para combater patógenos.

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

ABSTRACT

Of the new drugs that arrived on the market, only 3.1%, targeted neglected tropical diseases (NCDs), for example Chagas disease. Like NCDs, nosocomial infections are a worldwide problem with increasingly inefficient antibacterial drugs leading to resistance and the formation of biofilms increasingly common in hospital environments. Given this scenario, synthetic antimicrobial peptides (PAMs) bioinspired in toxins have shown the potential to become alternatives to this problem. PAMs can be found in virtually every kingdom from bacteria to vertebrates. In anurans, in skin secretion, several antimicrobial molecules have been described and characterized, such as the temporin-PTa. Therefore, this work proposes the evaluation of peptides analogous to *Hylarana picturata* temporin-PTa against protozoan *Trypanosoma cruzi* and resistant biofilm-forming bacteria. The methodology used in the work was rational planning based on temporin-PTa (control) maintaining 70% of the physical-chemical characteristics. After synthesis of the control and analogues, quantification was performed by means of absorbance. In vitro analyses of the antiprotozoa effect were performed against the epimastigote and trypomastigote in culture. The tests to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), minimum inhibitory concentration of biofilm (MICB) and hemolytic were performed in Muller Hinton medium. In addition, in silico studies of modeling and molecular dynamics were performed against the biological mimetic membranes Gram-negative and positive. analogous sequences were the point substitution of amino acid residues in the parental peptide with the intention of increasing the total net load, adjusting the hydrophobicity, amphipacity and reorganizing the hydrophobic moment keeping 69% e 77% of the original characteristic. The parental temporin-PTa and its analogs temphylarata-1 and temphylarta-2 were toxic to *T. cruzi* cells in the trypomastigote form with activity reaching 84, 48 and 83%. The parental peptide temporin-PTa eliminated bacterial cells at a minimum concentration of 43.4 μM . The temphylarata-1 and temphylarata-2 analogues eliminated 99.9% of the bacterial cells tested at concentrations 3 to 23 μM . The temporin-PTa did not show any significant activity against the interruption of biofilm formation, the analogs interrupted the biofilm in concentrations 92 to 43.6 μM . The peptides temporin-PTa, temphylarata-1 and temphylarata-2 were neither hemolytic nor toxic to Vero cells. In silico, the parental peptides lose their conformation in water, in contrast, the analogues remain with the helical conformation. Faced with the interaction of peptide-membrane temporin-PTa attraction between 2.7 to 3 Å, temphylarata-1 with attractions ranging from 2.6 to 3.2 Å and temphylarata-2 from 2.6 to 3.4 Å. Finally, the peptides proved to be excellent candidates for the development of biotechnological products to fight pathogens.

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

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são drogas anti-infectivas amplamente usadas por todo o mundo e se mostraram eficazes no tratamento da maioria das doenças promovidas por diferentes tipos de microrganismos. Entretanto, a facilidade de acesso a estas drogas e seu uso indiscriminado promoveram a seleção de agentes patogênicos multiresistentes os quais representam hoje um desafio para a medicina. Os problemas gerados por esta seleção agravam casos de infecções hospitalares e se espalham para outras comunidades infectando pacientes anteriormente saudáveis (Spellberg et al., 2004; Alanis, 2005; Ventola, 2015).

Diante desse cenário, iniciou-se a busca por novos agentes antimicrobianos, sendo a secreção cutânea de anuros uma rica fonte de compostos farmacologicamente ativos, merecendo destaque os compostos com atividade antimicrobiana. Dentre eles, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) caracterizam-se por uma notável variedade estruturas moleculares que podem representar opções terapêuticas no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias (Guimarães et al., 2016; Dehghan Esmatabadi et al., 2017).

No entanto para tornar esses peptídeos mais eficientes e menos citotóxicos para humanos existem metodologias que buscam melhorar as propriedades desses PAMs e torná-los antimicrobianos ainda mais potentes (POLANCO et al., 2012). Para que as melhorias tenham sucesso, alguns requisitos funcionalmente importantes são destacados nos peptídeos antimicrobianos, a carga líquida geralmente catiônica e a capacidade de assumir uma estrutura anfipática onde as porções hidrofílicas e hidrofóbicas são orientadas em direções opostas permitindo assim uma melhor interação com a membrana fosfolipídica de bactérias Gram-positivas e -negativas (BECHINGER; LOHNER, 2006).

1.1. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS (DTNS)

São grupos de doenças infecciosas que afetam cerca de 149 países e territórios, eliminadas das partes mais desenvolvidas, mas ainda persistentes em áreas pobres como em comunidades sem acesso a condições sanitárias adequadas (WATTS, 2017). Entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, 256 novos fármacos

chegaram ao mercado, mas apenas oito, ou seja 3,1%, tinham como alvo doenças negligenciadas. A marca atual supera a do período entre 1975 e 1999, quando só 1,1% foi direcionado a elas, mas é menor que a do período de 2000 a 2011 em que 4,3% dos medicamentos novos eram voltados para estas doenças (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; PEDRIQUE et al., 2013). Mesmo havendo estratégias viáveis para o desenvolvimento de novos fármacos com retorno econômico para seus investidores ainda existem muitos problemas referentes ao investimento nesta área e que são causados normalmente pela displicência política em relação aos programas de saúde, agravando ainda mais o cenário socioeconômico dessas regiões (Hotez et al., 2009). As DNTs são agrupadas em 17 doenças infecciosas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), algumas delas são classificadas como tripanossomíases causadas por protozoários com maior ocorrência em países da África e na América Latina com grande importância clínica, tanto médica quanto veterinária, sendo a doença de Chagas ou 13 tripanossomíase americana e a leishmaniose duas das mais significativas no contexto brasileiro (DNDi, 2020).

Chagas é uma doença tropical causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* e sua transmissão para seres humanos e outros mamíferos ocorre principalmente pelo inseto vetor conhecido como barbeiro (VALENZUELA; AKSOY, 2018). Essa doença tropical negligenciada atingiu regiões não endêmicas, afetando 8 milhões de pessoas em todo o mundo e colocando outros 25 milhões em risco de infecção (ARNAL et al., 2019a). Além disso, a doença de Chagas é uma das principais causadoras de cardiomiopatia infecciosa em todo o mundo, contribuindo substancialmente para a carga global de doenças cardiovasculares (BERN, 2015; CUCUNUBÁ et al., 2016). A mortalidade e a redução da produtividade das populações infectadas impactam significativamente na economia das regiões endêmicas. Esses encargos econômicos e sociais podem ser traduzidos em números que estimam perdas de mais de R\$ 7,2 bilhões por ano (ARNAL et al., 2019b; KASSEBAUM et al., 2016).

Inicialmente a infecção por *T. cruzi* era preferencialmente de áreas rurais, no entanto, o panorama foi modificado pelos movimentos migratórios rurais para as regiões urbanas ocorridos na América Latina nas décadas de 70 e 80. O transporte do vetor junto aos pertences pessoais, durante o êxodo rural, também favoreceu a formação do ciclo urbano, uma vez que o vetor é capaz de se adaptar a novos ambientes (CARRASCO et al., 1990). O conjunto destes dois fatos mudou o padrão

epidemiológico estabelecido para a doença que passou de uma condição rural, para uma doença urbana. Além da transmissão vetorial há outras vias como: transmissão congênita, por transfusão de sangue, transplantes de órgãos, alimentos contaminados e acidente de laboratório (DIAS; NETO, 2011).

A contaminação no hospedeiro acontece de forma por triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Figura 1). Esses insetos sugam o sangue de vertebrados infectados com tripomastigotas, e isso inicia o ciclo de vida do parasita. Uma vez ingeridos pelo vetor, as tripomastigotas são transformadas no intestino anterior, em formas esferomastigotas ou epimastigotas. As epimastigotas se multiplicam no intestino médio e se ligam às membranas perimicrovilares das células intestinais dos triatomíneos. Na região mais posterior do intestino do vetor e no reto, muitas epimastigotas se desprendem da superfície intestinal e se tornam tripomastigotas metacíclicas infecciosas, que são liberadas com fezes e urina durante as refeições de sangue. No entanto, os tripomastigotas metacíclicos não são capazes de penetrar na pele intacta do hospedeiro e entrar através do atrito ou arranhão da ferida da mordida, ou através de superfícies permissivas da mucosa ou conjuntival no local da inoculação (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; NOGUEIRA et al., 2015). Posteriormente, o parasita promove a lise enzimática da membrana do vacúolo, diferenciando-se em amastigotas intracelulares, que após nove ciclos de divisão binária tornam-se tripomastigotas que são liberadas na circulação (DVORAK; HYDE, 1973).

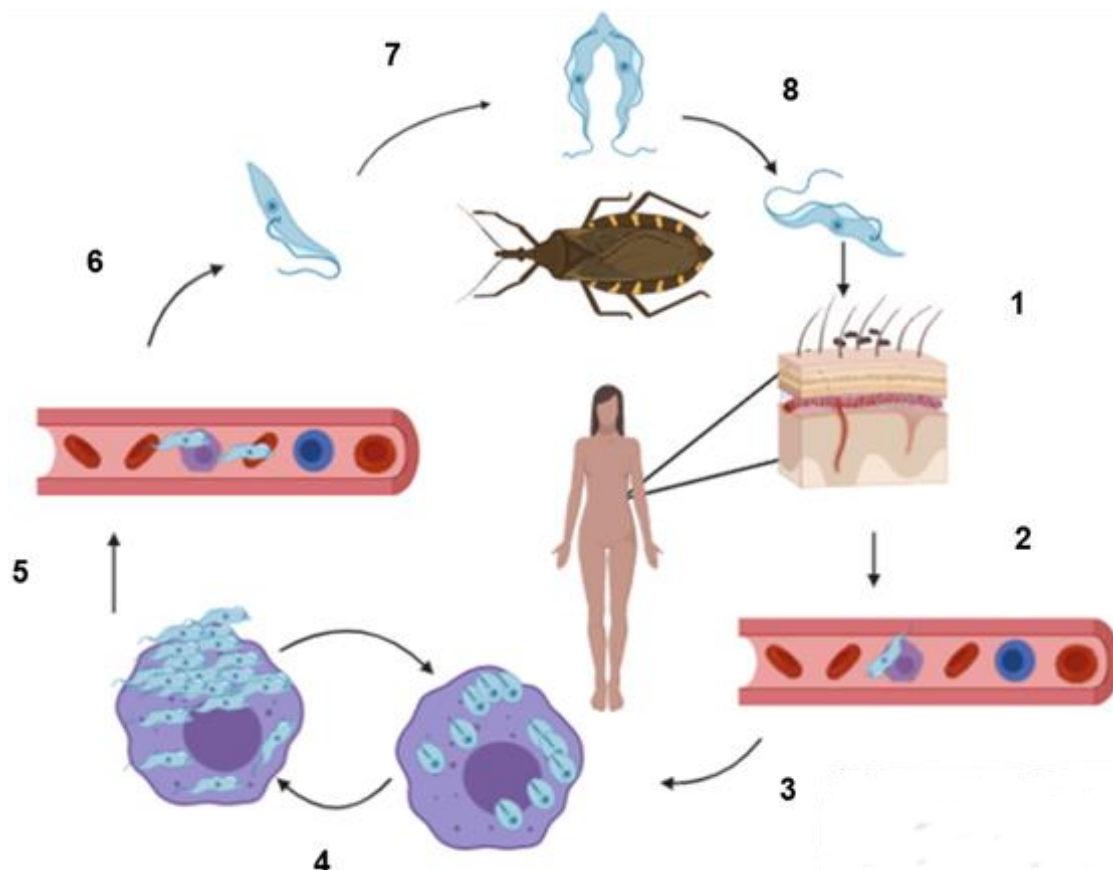


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1. Inseto triatomíneo se alimenta do sangue de mamífero: tripomastigotas metacíclicos são secretados pelas fezes e invadem o organismo hospedeiro pelo local da picada ou via mucosa; 2. Tripomastigotas metacíclicos são altamente infectivos e penetram em diversas células próximas ao local da invasão; 3. Uma vez dentro das células do tecido infectado, tripomastigotas transformam-se em amastigotas, estágio no qual multiplicam-se por fissão binária; 4. Após alguns ciclos de divisão, amastigotas transformam-se em tripomastigotas que rompem as células, uma vez na corrente sanguínea os tripomastigotas podem invadir outras células (transformando-se novamente em amastigotas) ou eventualmente são ingeridos pelo inseto triatomíneo 5.; 6. Tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor; 7. Epimastigotas multiplicam-se no intestino médio do barbeiro; 8. Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos na região do reto do inseto, completando o ciclo biológico do *T. cruzi*. Fonte: Autora criado no biorender.

A Doença de Chagas frequentemente pode ser assintomática ou se manifestar com sinais e sintomas pouco evidentes ou inespecíficos, como febre, mal-estar e cefaleia. A presença de febre de maior intensidade, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningite, adenomegalia, caracteriza um quadro grave da doença, que pode evoluir para o óbito. Devido a sua forma de manifestação ser assintomática na maioria dos casos, a fase aguda da doença muitas vezes passa despercebida e o diagnóstico só é feito na fase crônica que muitas vezes deixa o paciente internado para o tratamento aumentando a chance desse

paciente ter infecções nosocomiais (DIAS; COURA, 1997; PEREIRA et al., 2017; SILVA; AVIZ; MONTEIRO, 2019; VARGAS et al., 2018).

1.2. BACTÉRIAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

O problema das infecções hospitalares é tão antigo quanto a hospitalização. No entanto, é um problema contínuo da medicina moderna e representa um perigo permanente até para pacientes hospitalizados. As consequências médicas, legais e econômicas das infecções nosocomiais começaram a enfatizar a importância do seu controle. Os agentes causadores de infecções nosocomiais podem ser quase todos os organismos, mas na maioria das vezes envolvem bactérias (FRIEDRICH, 2019; WHO, 2002). Entre as bactérias envolvidas nas infecções hospitalares estão *Acinetobacter spp.*, *Escherichia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.* e *Staphylococcus sp.* Estes patógenos possuem alta adaptabilidade a estresses ambientais e podem facilmente sobreviver fora do hospedeiro, sendo essa uma das maiores causas de infecções nosocomiais (MARSHALL & ARENAS, 2003).

No ambiente hospitalar essas bactérias podem adquirir resistência aos medicamentos, que é um fenômeno natural quando as bactérias são expostas as drogas antimicrobianas (DRAGO, 2007). Com isso, a resistência bacteriana se torna uma ameaça emergente para a saúde pública global uma vez que o declínio substancial na investigação e desenvolvimento de agentes antibacterianos agravam a situação. Enfatizando a importância de uma estratégia antibiótica adequada e a implementação de um monitoramento rigoroso das medidas para o controle de infecções hospitalares (FRIEDRICH, 2019; HÖGBERG; HEDDINI; CARS, 2010). Segundo Fernandes et al., (2016) projeções internacionais apontam que se nada for feito, mais efetivo do que até agora, por volta de 2050 morrerão anualmente 10 milhões de pessoas em todo o Mundo, em consequência direta da resistência aos antimicrobianos (Figura 2).

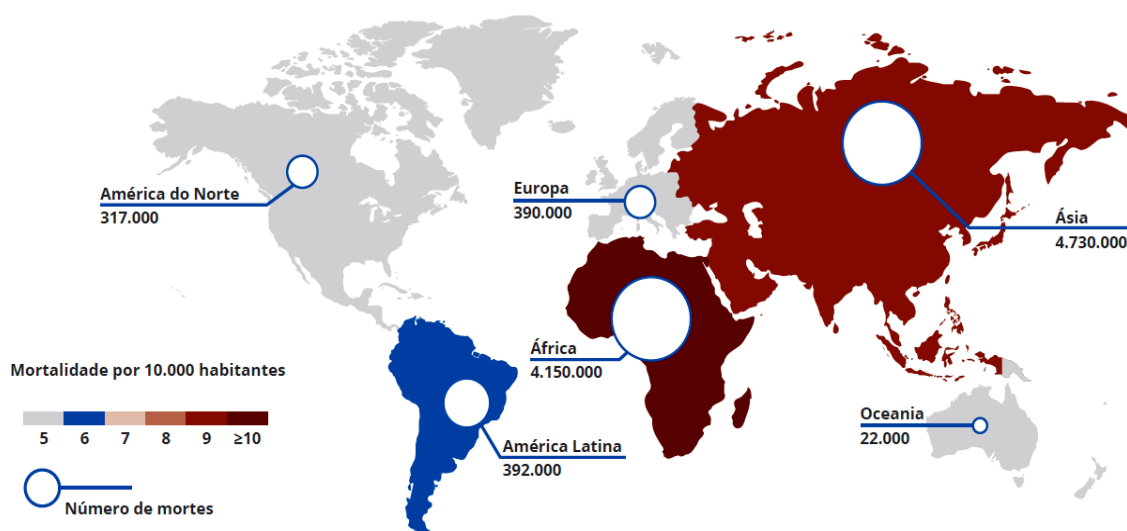


Figura 2:. Mapa Mundi destacando a previsão de mortalidade anual atribuível a resistência bacteriana em 2050. Fonte: (FERNANDES et al., 2016).

Os mecanismos para burlar a ação dos antibióticos são os mais variados e já caracterizado na literatura como: efluxo de multidroga, a produção enzimática, a modificação genética do alvo ou modificação dos locais de ligação ao medicamento e a capacidade das bactérias em formar biofilmes (BUSH; JACOBY, 2010; HASSAN et al., 2013, 2015; WALSH, 2000; WRIGHT, 2005).

1.3. BIOFILME BACTERIANO

Bactérias resistentes a antimicrobianos e com capacidade de formar o biofilme vem sendo cada vez mais estudadas pois representam um grande problema na saúde pública pela dificuldade de se tratar, consequentemente, aumentam a taxa de mortalidade (LOPES, 2018). Essa dificuldade no tratamento é pelo fato que os biofilmes são formados por comunidades bacterianas incorporadas em uma matriz extracelular auto produzida que compreende uma mistura complexa de polissacarídeos, lipídeos, DNA extracelulares (DNAe) e proteínas, que protegem as bactérias do estresse ambiental, exposição a antibióticos e ataques imunológicos (TOLKER-NIELSEN, 2015; VACCA, 2017).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que engloba etapas como a adesão reversível e irreversível (Figura 3). O processo se inicia com o transporte de células planctônicas do meio circundante à superfície, logo em seguida ocorre a adesão inicial em uma superfície biótica ou abiótica, a partir desta etapa ocorre a

migração de células formando colônias com a sinalização molecular (sistema *quorum sensing*) o que permite a adesão irreversível, após esse biofilme produz uma matriz exopolimérica e tem a maturação e desenvolvimento, com internalização de nutrientes, metabolismo dos mesmos, transporte de resíduos e após a liberação de células planctônicas dos agregados bacterianos das camadas mais externas, subsequente dispersão, multiplicação e colonização de novas superfícies, assim, estabelecendo um equilíbrio dinâmico do biofilme (BARROS, 2017; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

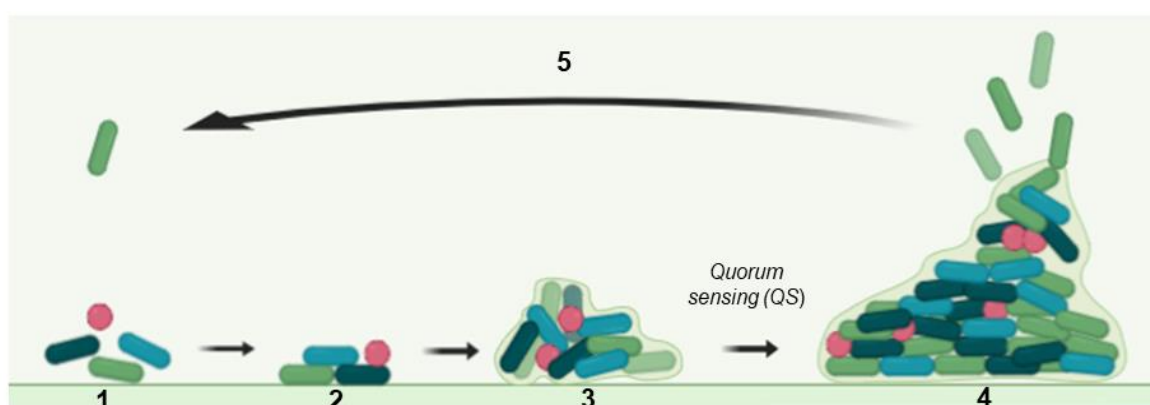


Figura 3: Esquema do desenvolvimento de biofilmes bacterianos destacando cinco estágios. **(1)** Adesão das células planctônicas a uma superfície sólida ou líquida; **(2)** crescimento sésil; **(3)** - expansão e maturação da estrutura produzindo a matriz extracelular (EPS); **(4)** dispersão celular e indução de fatores de dissociação; **(5)** colonização de outras superfícies por células livres-nadantes. Fonte: Autoral feita no biorender

Isso é preocupante porque a formação de biofilmes microbianos pode ocorrer tanto em superfícies naturais como artificiais (Figura 3), como dentes, lentes de contato, válvulas cardíacas nativas e artificiais (causando endocardite), pulmões de pacientes com fibrose cística (causando broncopneumonia crônica), ouvido médio em pacientes com otite média crônica, próteses articulares, cateteres intravenosos e em feridas crônicas (HØIBY et al., 2010).

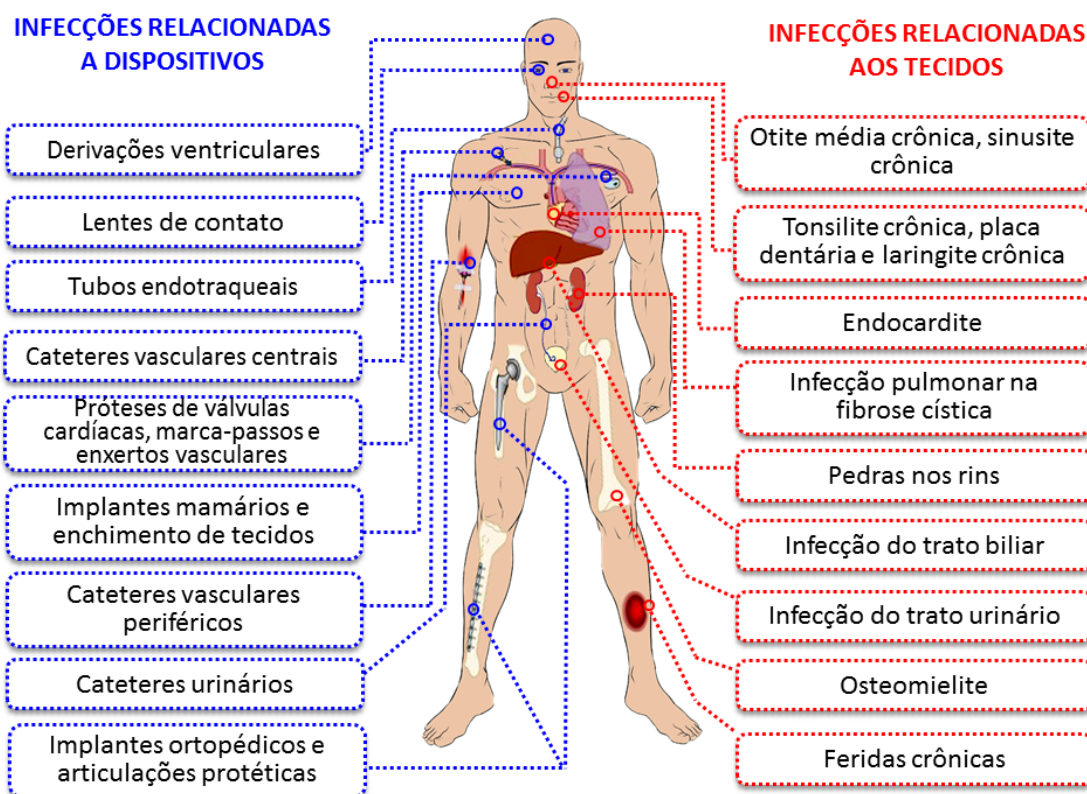


Figura 4: Infecções relacionadas a dispositivos (azul) e aos tecidos (vermelho) causados por biofilmes bacteriano. Fonte: adaptado de (HØIBY et al., 2015).

Biofilmes tipicamente causam infecções crônicas, o que significa que as infecções persistem apesar da terapia antibiótica aparentemente adequada e dos mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro (HØIBY et al., 2010). Essas infecções são geralmente tratadas com combinações de antibióticos em altas doses (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). No entanto, a administração de múltiplos antibióticos para controlar infecções tende a induzir a resistência bacteriana e a formação de biofilmes recalcitrantes além de gerar intolerância tóxica (CUMMINS et al., 2009), (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

A atual ameaça global de patógenos multirresistentes e juntamente com um declínio constante na descoberta de novos medicamentos ressalta a necessidade urgente de novas terapias para controlar doenças infecciosas (ROCA et al., 2015). Uma abordagem promissora surgiu na identificação de peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro (PCDH), que podem controlar infecções por suas propriedades antimicrobianas (MOOKHERJEE et al., 2020).

1.4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

São amplamente encontrados em plantas, insetos, anfíbios e mamíferos, desempenhando um papel importante no sistema imunológico inato e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (KOEHBACH; CRAIK, 2019; WANG; LI; ZHE WANG, 2015). Os PCDH foram descritos pela primeira vez na década de 1960 por Kiss e Michl com a descrição do peptídeo bombinina da rã salpicada *Bombina variegata*. No entanto foi somente na década de 80 teve um crescimento nas pesquisa com PAMs, com a descoberta da cecropina isolada de mariposa por STEINER et al (1981), defensinas isoladas de neutrófilos humanos por GANZ et al (1985) e magaininas isolados de anfíbios por ZASLOFF (1987).

Desde então os estudos só vem aumentando, e atualmente em bancos de dados como *Antimicrobial Peptide Database* (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) já existe catalogado mais de 3.175 peptídeos antimicrobianos naturais (WANG; LI; ZHE WANG, 2015). PAMs apresentam em suas características físico-químicas de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, carga líquida positiva entre +2 a +9 em pH fisiológico e estrutura anfipática com aproximadamente 50% dos resíduos de aminoácidos sendo hidrofóbicos (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017; WANG, 2010; ZASLOFF, 2002). As estruturas tridimensionais influenciam nas atividades biológicas dos PAMs e são classificadas em quatro famílias (Figura 5) com base em seu dobramento sendo classificadas em α -hélice, β -folha, estruturas mistas e *random coil* (WANG; GUANGSHUN, 2013). O grupo dos peptídeos α -hélices são compostos por aqueles que formam hélices anfipáticas em membranas ou em locais semelhantes. Já os do grupo com folhas β geralmente são estabilizados por pontes dissulfeto, apresentando estrutura rígida, como as estruturas mistas que apresenta as estruturas α -hélices e folhas- β (SEO et al., 2012).

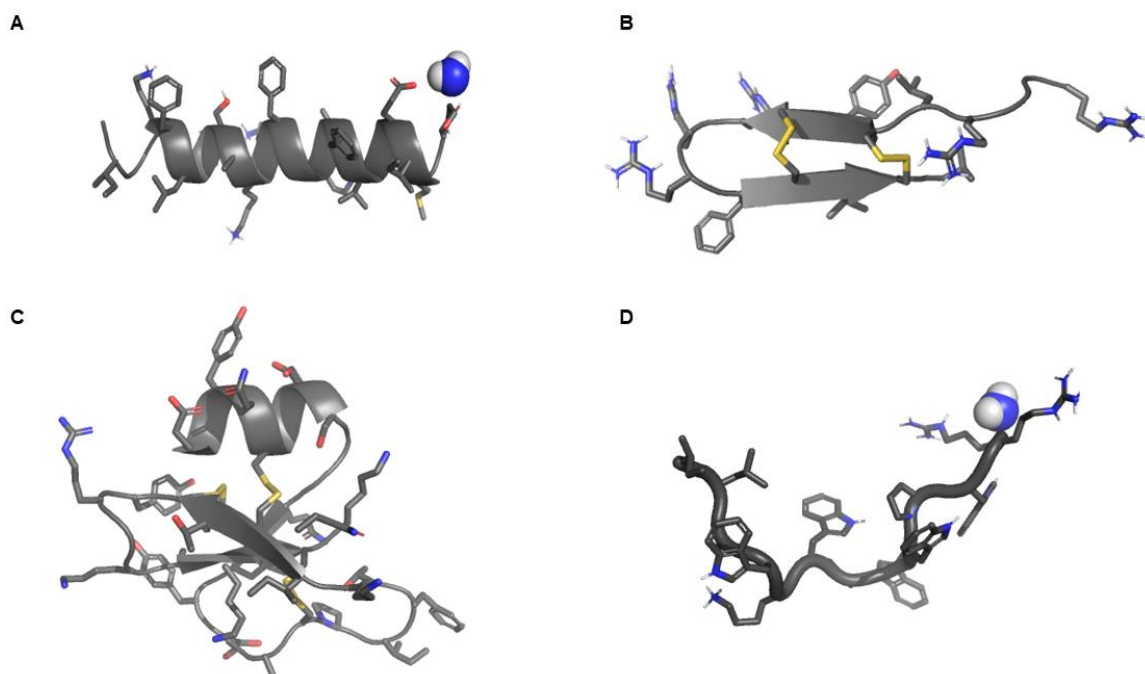


Figura 5: As diferentes estruturas encontradas em PAMs. **(A)** Magainina (GESELL; ZASLOFF; OPELLA, 1997); **(B)** Protegrin-2 (USACHEV et al., 2015), **(C)** Indolicidina (ROZEK et al., 2003) (ROZEK, 2003); **(D)** Defensina- 2 (VRIENS et al., 2015); Código PDB respectivamente 2MAG; 1IJV; 1G89 2MUH.

Os PAMs atuam sobre as membranas dos microorganismos rompendo ou tirando pedaços, esses métodos que diferem dos antibióticos convencionais são favoráveis à área farmacêutica, uma vez que dificulta o desenvolvimento de resistência microbiana (ROSCIA et al., 2013; AOKI; UEDA, 2013). Os modelos mais comumente reportados são os modelos barril, poro toroidal e carpete (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Apesar da proposição destes três modelos, o modo de ação dos PAMs não é completamente compreendido. Já foi observado que alguns PAMs podem apresentar mais de um mecanismo de ação dependendo da relação peptídeo-lipídio. Estudos argumentam que são raros os PAMs que podem formar poro estável e além disso, todos os modelos propostos apresentam um aspecto comum: a adsorção do peptídeo na bicamada (WIMLEY; HRISTOVA, 2011).

1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS

O sistema imunológico dos anfíbios é evoluído para enfrentar os desafios dos ambientes terrestres e aquáticos através do desenvolvimento de peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) na secreção da pele (KÖNIG; BININDA-EMONDS;

SHAW, 2015). O estudo da composição das secreções glandulares de anfíbios não é recente. Segundo HABERMEHL (1981), desde a década de 80 que esses compostos vêm sendo estudados. De acordo com CLARKE (2007), TYLER (1992) e colaboradores, a diversidade de substâncias bioativas encontradas nas secreções cutâneas dos anfíbios inclui além de peptídeos com propriedades antimicrobianas esteroides e alcaloides. Estão presentes também as aminas biogênicas: adrenalina, noradrenalina e dopamina (JARED et al., 2009). Além da atividade antimicrobiana, do ponto vista farmacológico, esses compostos podem também ter efeitos: miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos, colinomiméticos ou simpatomiméticos e vasoconstritores (HABERMEHL, 1981; JARED; ANTONIAZZI, 2009). Esses PAMs encontrados nas secreções de pele de anfíbios são capazes de causar a lise celular de muitas bactérias patogênicas, vírus, protozoários, leveduras e fungos (SIMMACO; KREIL; BARRA, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1: Alguns PAMs com ação antimicrobiana encontrados em secreções de anfíbios.

PEPTÍDEO	ANUROS	ATIVIDADE	MIC (µM)	REFERÊNCIA
Bombinina	<i>Bombina sp.</i>	AG ⁺ , AF, AC	50-25	(ROZEK et al.,2000)
Brevinina	<i>Rana brevipoda</i>	AG ⁺ , AG ⁻ ,AV,AF, AH,AC	50-100	(ROZEK et al.,2000)
Buforina	<i>Bufo bufo</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ ,AF, AH,AC	6-50	(ROZEK et al.,2000)
Caerina	<i>Litoria sp.</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , CM	3.8-2.1	(MIGNOGNA et al.,1993)
Ceruleína	<i>L. cerúlea</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , CM	11.3-0.6	(MIGNOGNA et al.,1993)
Ceruleína	<i>Xenopus laevis</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , AF	12.5-2.	(MIELE et al., 2000)
Dermaseptina	<i>Phyllomedusa sp.</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , AF, CM	1.8- 30.6	(SIMMACO et al., 1994)
Esculentina	<i>Rana esculenta</i>	AG ⁺ , AG ⁻ ,AV,CM	2-34	(MORIKAWA et al., 1992)
Frenatina	<i>L. infrafrenata</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ , AC, AH,AP,	1.5-50	(WONG, 1997)
Gaegurina	<i>Rana rugosa</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ ,AV, AH,AC	1.5-50	(STONE, et al.,1993)
Levitídeo	<i>X. laevis</i>	AG ⁺ , AF, AB, AC	6-50	(WEGENER et al.,1999)
Maculatina	<i>L. genimaculata</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ ,AV, AF,AP,ESP, AC,AH	6-50	(MOR, et al., 1999)
Magainina	<i>Xenopus sp.</i>	AG ⁺ , AG ⁻ ,AC	1.3-5	(ZASLOFF.,1987)
PGLa	<i>X. laevis</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ , AV,AF,AH, AC,CM	3-35	(LAI, et al., 2002)
Pipinina	<i>R. pipiens</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ ,AV, AF,AP,ESP, AC,CF,AM	5-100	(ZASLOFF, 1987)

Ranalexina	<i>R. catesbeiana</i>	AG ⁺ ,AG ⁻ ,AF,AH, AC	3-25	(ROZEK,et al.,1998)
Rugosina	<i>R. rugosa</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , AF, IE	1.8-6	(LI et al.,2007)
Temporina	<i>R. temporária</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , AF, AB	5-80	(ZHANG et al.,2010)
Xenoxina	<i>Xenopus sp.</i>	AG ⁺ , AG ⁻ , AF	80-2.5	(OLSON et al.,2001)
Xenopsina	<i>X. laevis</i>	AG ⁺ , AG ⁻	10-100	(SAI,et al., 2001)

AB: anti biofilme; **AC:** anticâncer; **AF:** antifúngico; **AG⁻:** anti gram-negativa; **AG⁺:** anti gram-positiva; **AH:** anti-HIV; **ESP:** espermicida; **AP:** antiparasitário; **AV:** antiviral; **CF:** cicatrização de feridas; **CM:** células de mamíferos; **IE:** inibidor enzimático; **QM:** quimiotático.

Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs), fazem parte de um mecanismo imune inato, tornando-se o foco principal para o desenvolvimento de drogas devido ao seu peculiar modo de ação que pode impedir os microrganismos de desenvolver resistências (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2011). Como as temporinas que podem ser uma nova geração de antibióticos com amplo potencial de uso contra surgimento de patógenos (MANGONI et al., 2015).

1.6. AS TEMPORINAS

Os peptídeos do tipo temporina foram inicialmente identificados nos extratos de metanol das peles do sapo asiático *Rana erythraea* e do sapo híbrido europeu *Rana esculenta* (reclassificado como *Pelophylax lessonae* / *ridibundus*). Eles foram descritos como peptídeos do tipo *Vespa*, devido à sua semelhança de sequência com peptídeos quimiotáticos isolados do veneno de vespas do gênero *Vespa* (CONLON, 2008b; SIMMACO et al., 1990; WEI et al., 1994). Posteriormente, em 1996, 10 peptídeos estruturalmente relacionados, dotados de propriedades antimicrobianas, foram descobertos por Simmaco et al. (1996). Eles foram isolados de secreções da pele do sapo vermelho europeu *Rana temporaria* e foram designados adequadamente como temporinas, de A a L (agora denominada temporina 1Ta – 1Tl, de acordo com a nova nomenclatura proposta por Conlon (2008).

Atualmente a família de temporinas tem mais de 121 isoformas diferentes (MANGONI, 2006). Embora alguns deles contenham até 17 aminoácidos, as temporinas estão entre os menores PAMs (10 a 14 resíduos) encontrados na natureza até hoje e com uma carga líquida positiva baixa em pH neutro (0 a + 3), devido à presença de apenas 1 ou 2 resíduos básicos em sua sequência. Esse caráter catiônico baixo é exclusivo para eles, uma exceção em comparação aos PAMs conhecidos de outras fontes. As temporinas são sintetizadas como precursores contendo um domínio N-terminal estritamente conservado que termina em lisina ou arginina (MANGONI, 2006).

Em geral, as temporinas apresentam atividade somente contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *Enterococcus faecium*, com valores de CIM entre 1 a >100 µM. No entanto, existe temporinas que são ativas contra espécies Gram-

negativas, como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e poucos são os estudos avaliando a atividade antiparasitária ou com várias atividades (Tabela 2).

Tabela 2: Família de temporinas com amplo espectro de ação.

Peptídeos	Sequências	Atividade	MIC (µM)	Referências
temporina-A	FLPLIGRVLSGIL	AG+, AG- e AP	1-24	(SIMONETTI et al., 2008)
temporina-B	LLPIVGNLLKSLL	AG+, AG-, AP, AB e H	3-50	(SIMMACO et al., 1996)
temporina-F	FLPLIGKVLSGIL	AG+ e AG-, AP,	1-100	(SIMMACO et al., 1996)
temporina- L	FVQWFSKFLGRIL	AG+ e AG-, AP e H	1-100	(SIMMACO et al., 1996)
temporina-SHa	FLSGIVGMLGKLF	AG+ e AG-, AP e H	2-31	(RAJA et al., 2017)
temporina-SHd	FLPAALAGIGGILGKLF	AG+ e AG-, AP e H	1.5-66	(ABBASSI et al., 2010)

AG+ anti gram-positiva, **AG-** anti gram-negativa, **AP-** anti-parasito, **AB-** atibiofilme e **H-** Hemolítico.

O peptídeo temporina-PTa foi isolado da pele do sapo de fogo malaio *Hylarana picturata* por Conlon, (2008b). Essa é a única temporina encontrada nessa espécie de anfíbio, apresenta em sua sequência 13 resíduos de aminoácidos, amidação no C-terminal, estrutura alfa-hélice, com carga de +3 e hidrofobicidade de 61%, sua atividade está voltada para bactéria *S. aureus* (MISHRA; WANG, 2012). Sendo assim esse peptídeo é um ótimo candidato para sofrer alterações de planejamento racional para deixá-lo com ampla atividade.

1.7. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

O planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é uma área da Química Farmacêutica Medicinal, ciência que engloba inovação, descoberta, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas, bem como suas respectivas relações entre estrutura química e atividade biológica (PEIXOTO, 2013).

Os custos financeiros e temporais associados à descoberta de novos fármacos pelo método clássico são muitas vezes proibitivos, envolvendo o investimento de milhões a bilhões de dólares e mais de uma década de estudos (AVORN, 2015) podendo durar de 10 a 15 anos e para cada 5.000-10.000 compostos que entram no *pipeline* de pesquisa e desenvolvimentos (P&D) apenas 1 recebe a aprovação (IFPMA, 2007 *apud* URSO, 2014). No entanto, a bioinformática, juntamente com a química computacional, têm oferecido um excelente direcionamento no planejamento racional de fármacos (MARSHALL, 2004) de forma a auxiliar na diminuição desses custos (XIANG et al., 2012)

Esse planejamento racional de fármacos baseado em estrutura e no mecanismo de ação é a estratégia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “compostos de partida” ou *lead compounds*), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e toxicidade), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos (SILVA & SILVA, 2007). As estratégias atuais de planejamento de fármacos fundamentam-se no conhecimento prévio dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo fisiopatológico e a definição do mecanismo de intervenção terapêutico, ou eleição do alvo terapêutico adequado (PATRICK, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os peptídeos análogos sintéticos da temporina PTa frente as formas epimastigotas e tripomastigotas em cultura *in vitro* de *T. cruzi*, bactérias resistentes e formadoras de biofilmes Gram-positivas e -negativas e *in silico*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade dos peptídeos frente a protozoário *T. cruzi*;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos peptídeos por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM)
- Concentração bactericida mínima (CBM);
- Avaliar a atividade antibiofilme dos peptídeos por meio da determinação da concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB);
- Avaliar a citotoxicidade frente a heritrócitos e células Vero;
- Realizar estudos *in silico* por meio de dinâmica molecular;

3. METODOLOGIA

3.1. DESENHO RACIONAL

Os peptídeos análogos foram construídos com base no peptídeo antimicrobiano temporina-PTa de uma rã *H. picturata*. Os critérios utilizados para obtenção da sequência de análogos foram manter no mínimo 69% de similaridade assim como a substituição pontual de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos em relação ao peptídeo parental. A hidrofobicidade foi mantida sendo modificado somente o momento hidrofóbico e definindo assim hélices anfipáticas. O alinhamento das sequências primárias foram realizados utilizando o programa *Clustal Omega* versão 1.2.4 (HIGGINS; SHARP, 1988). Os diagramas de hélice foram construídos usando o programa *HeliQuest* (GAUTIER et al., 2008).

3.2. SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO

Os peptídeos foram sintetizados por fase química sólida pela empresa Aminotec por carbonila 9-fluoretentilmetoxi (Fmoc) e purificação por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com 95% de pureza. As massas dos peptídeos foram confirmadas no espectrômetro de massas por ionização por *spray* (ESI, *electrospray ionization*). Os peptídeos foram solubilizados em água ultrapura (*MiliQ*) e quantificados de acordo com Murphy and Kies (1960) por absorção de UV com seguindo os comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm.

3.3. ANALISE *IN VITRO*

3.3.1. ATIVIDADE FRENTE AS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Os parasitas em fase exponencial de crescimento foram incubados a 28 °C durante 72h, na presença de diversas concentrações dos peptídeos 3 a 120 µg.mL⁻¹ diluídos em PBS 1X (Salina tamponada com fosfato). Para o controle foi utilizado PBS 1X. Após o período de incubação, foi adicionado MTS/PMS e as placas foram novamente incubadas por quatro horas. A leitura foi realizada a 490 nm em espectrofotômetro (*Bio-Tek Instruments*). O valor da concentração capaz de inibir o

crescimento do parasita em 50% (IC 50 /72h) foi obtido por meio da análise de curva de regressão não linear no GraphPad Prism 7.04[®]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2. ATIVIDADE FRENTE ÀS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

As formas tripomastigotas foram incubadas a 37 °C durante 04h, na presença de diversas concentrações dos peptídeos 3 a 120 µg.mL⁻¹ diluídos em meio DMEM. Para o controle positivo foi utilizado meio DMEM. Em seguida, os parasitas foram fixados com paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X, e contados em câmara de Neubauer. Os dados das contagens foram analisados no *Graph Pad Prism 7.04*[®]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os ensaios de CIM foram realizados com cepas de *A. baumannii* (isolado clínico-003326263), *E. coli* (ATCC 25922 e KpC + 001812446), *E. faecalis*, *K. pneumonia* (ATCC 13883 e KpC + 002210477) *S. aureus* MRSA. As bactérias foram plaqueadas em placas de ágar *Mueller Hinton* (MHA) e incubadas a 37 °C, durante a noite. Após esse período, três colônias isoladas de cada bactéria foram inoculadas em 5 mL de caldo *Mueller Hinton* (MHB) e incubadas a 200 rpm, a 37 °C, durante a noite. O crescimento bacteriano foi monitorado por espectrofotômetro a 600 nm. Os testes de CIM foram realizados pelo método de diluição de microplaca de 96 poços em uma concentração bacteriana final de 2-5 x 10⁵ UFC.mL⁻¹, como descrito anteriormente (WAYNE, 2012). Os peptídeos foram testados em concentrações variando de 4 a 128 µg. mL⁻¹. A Ciprofloxacina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações dos peptídeos, enquanto a suspensão bacteriana no MHB foi usada como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e as leituras foram realizadas em um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Estados Unidos) a 600 nm após o tempo de incubação. CIM foi determinada como a menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.4. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A avaliação da concentração bactericida mínima (MBC) foi dependente dos resultados da CIM. Três repetições de 10 µL foram retiradas dos poços da microplaca, plaqueadas em MHA e incubadas a 37 ° C por 24 h. O MBC foi determinado como a menor concentração de peptídeo em que nenhum crescimento bacteriano foi detectado (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.5. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE BIOFILME (CIMB)

A formação de biofilme foi obtida usando o Meio Basal 2 (BM2) [fosfato de potássio 62 mM, NH₄ 2 SO₄ 7 mM, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 M e 0,4% de glicose]. Culturas bacterianas de *A. baumannii* (isolado clínico-003326263), *E. coli* (KpC + 001812446) e *K. pneumoniae* (KpC + 002210477) foram cultivadas por 18 h em MHB foram diluídas 1: 100 (v: v) em BM2. As suspensões bacterianas foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo redondo contendo os peptídeos em diluições seriadas de 4 a 128 µg.mL⁻¹ (volume final: 100 µL). As microplacas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O controle de crescimento negativo continha apenas células bacterianas, enquanto a ciprofloxacina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações dos peptídeos. O crescimento das células planctônicas foi avaliado utilizando a absorvência a 600 nm. Para avaliar a formação de biofilme, o meio foi removido das microplacas e os poços foram lavados duas vezes com água deionizada. As células aderentes foram coradas com 0,01% de violeta de cristal durante 20 min, após os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada, secos ao ar e o cristal violeta aderido às células foi solubilizado com 110 µL de etanol a 60%. A formação de biofilme foi medida usando absorbância a 595 nm. Todas as leituras de absorbância foram realizadas com o leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Estados Unidos). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.6. ENSAIO HEMOLÍTICO

O ensaio hemolítico foi desenvolvido de acordo com (KIM et al., 2005), com modificações. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato 50 mM (PBS), pH 7,4. As soluções peptídicas foram adicionadas à suspensão eritrocitária (1% por volume) em uma concentração final variando de 4 a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 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 415 nm. A hemólise zero (em branco) foi determinada com eritrócitos suspensos na presença de 50 mM PBS, pH 7,4, enquanto uma solução aquosa de 1% (em volume) de triton X-100 foi utilizada como controlo positivo (100% de lise de eritrócitos). Esse experimento foi aprovado pelo CEUA com o número 014/2018. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM CÉLULAS VERO

Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado uma cultura com 70% de confluência do tapete celular. Inicialmente, foi ajustado o inóculo para 2×10^5 que em placa o inóculo fica em 2×10^4 com um volume final de 100 μL e incubado por 24 horas a 37°C (em estufa de CO₂ 5%). Posteriormente, foi retirado o meio e aplicado 200 μL dos peptídeos diluídos em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e novamente foi incubado por 24 horas a 37°C (em estufa de CO₂ 5%). Após foi retirando o meio e colocado 50 μL de MTT diluído em meio DMEM com uma concentração de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi incubado por 4 horas a 37°C e posteriormente, posteriormente retirado o líquido e adicionado 50 μL de DMSO. A leitura foi feita a 570nm. Esse experimento foi aprovado pelo CEUA com o número 014/2018. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. ESTUDOS *IN SILICO*

3.4.1. MODELAGEM MOLECULAR

Modelos teóricos tridimensionais foram construídos para as sequências primárias dos peptídeos usando o servidor *I-TASSER*. O PDB2PQR v2.0.0 foi usado para gerar a superfície eletrostática e todos os modelos foram visualizados pelo programa *PyMOL* v1.7.

3.4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL EM ÁGUA, TFE E SDS

Simulações de dinâmica molecular para os peptídeos foram realizadas em água, usando o modelo de água de carga pontual única (SPC). As simulações foram realizadas utilizando o campo de força GROMOS96 43A1 do pacote computacional GROMACS v.5.0.4 (ABRAHAM et al., 2015). Os modelos teóricos tridimensionais validados para os peptídeos foram utilizados como estrutura inicial nas simulações e posteriormente imersos em moléculas de água em caixas cúbicas. Íons cloreto foram adicionados para neutralizar a carga do sistema. As simulações foram feitas sob força iônica de NaCl 0,15 M. As simulações em 50% 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) também foram realizadas em caixas cúbicas, os peptídeos imersos em moléculas de água de SPC, seguido da inserção de moléculas de TFE até que a concentração ideal fosse atingida (razão molar 1: 4 TFE : água), de acordo com (ROCCATANO et al., 2002) quanto às simulações em água, foram utilizados íons cloreto para neutralizar o sistema. Simulações de análise estrutural em SDS foram realizadas em caixas de dodecaedro, onde os peptídeos foram colocados em contato com uma micela de dodecil sulfato de sódio (SDS) constituída de 100 detergentes. As micelas SDS foram construídas e suas topologias geradas usando o servidor CHARMM-GUI (WU et al., 2014). Geometria das moléculas de água foi restringida usando o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992). Além disso, o algoritmo LINCS foi usado para ligar todo o comprimento de ligação do átomo. *Particle Mesh Ewald* (PME) foi utilizado para correções eletrostáticas com um raio de corte de 1,4 nm para minimizar o tempo de simulação computacional. O mesmo raio de corte foi usado para as interações de van der Waals. A lista de vizinhos de cada átomo foi atualizada a cada 10 etapas de simulação de 2 fs cada. O algoritmo de descida mais íngreme (50.000 passos) foi aplicado para minimizar a energia. O sistema passou por uma normalização de temperatura e pressão para 310 K e 1 bar usando o termostato de redimensionamento de velocidade (NVT) e o *barostat Parrinello-Rahman* (NPT), respectivamente, para 100 ps. O sistema com energia minimizada e temperatura e pressão balanceadas foi submetido à simulação de dinâmica molecular durante 100 ns.

3.4.3. DINÂMICA MOLECULAR EM BICAMADAS DE DPPE/DPPG

A dinâmica molecular (MD) de Temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2 foi feita com membranas construídas pelo servidor CHARMM-GUI (JO et al., 2009). A bicamada Gram-negativa (9:1) compõe 90% de 1,2-dipalmitoil-sneccero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) e 10% de 1,2-dipalmitoil-glicerol-3-fosfatidilglicerol (DPPG). Os Gram-positivos apresentaram uma proporção de (1:1) com 50% PE e PG. Todos os três peptídeos foram colocados a 50 Å da superfície da membrana e foram adicionadas 50 moléculas de água por lipídeo.

Os parâmetros usuais retirados do campo de força ff14SB foram utilizados para modelar os pépticos e fosfolípidos. O modelo de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) foi usado em todas as simulações. Durante as simulações, fosfolípidos e solventes (contra-íons e água) foram mantidos a uma temperatura constante de 310 K usando o termostato *Langevin* (DAVIDCHACK; OULDRIDGE; TRETYAKOV, 2015) com uma frequência de colisão de $1,0 \text{ ps}^{-1}$. Estas temperaturas foram escolhidas porque estão acima das temperaturas de transição de fase do gel para o cristal líquido de todos os lipídeos usados nas simulações. As interações de *Van der Waals* foram truncadas a 1,2 nm com uma correção de dispersão de longo alcance aplicada à energia e à pressão. Uma pressão de 1 bar foi mantida usando acoplamento de pressão semi-isotrópica com o barostato de Monte Carlo e uma constante de tempo de 1 ps. As interações eletrostáticas foram tratadas usando o algoritmo *Ewald Soft Particle Mesh* (PME) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993a) com um intervalo de curto alcance de 1,2 nm. Todas as ligações envolvendo hidrogênio foram controladas usando o algoritmo SHAKE (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993b) permitindo que uma etapa de tempo de 2 fs seja aplicada a 200 ns MD. Todos os sistemas de membrana / peptídeo foram neutralizados com íons Na^+ . Nós monitoramos a estabilidade conformacional dos peptídeos através dos quadrados médios quadráticos (RMSF), desvio do quadrado médio (RMSD) e raio de rotação (R_g) do peptídeo. A localização dos peptídeos foi monitorizada utilizando os gráficos do perfil de densidade de massa e a distância ao plano da superfície da membrana.

4. RESULTADOS

4.1. MODIFICAÇÃO RACIONAL DA TEMPORINA-PTA

A nomenclatura para as sequências análogas obedece ao seguinte critério: **Temp**=prefixo do “controle” (Temporina-PTa); **Hyla**=prefixo do nome do gênero da espécie de anuro produtor do peptídeo natural (*Hylarana*) e **Rata**= sufixo do nome da espécie detentora do peptídeo natural (*Hylarana picturata*).

O critério utilizado para a obtenção das novas sequências análogas foi a substituição pontual de resíduos de aminoácidos no peptídeo parental com a intenção de aumentar a carga líquida total, ajustar a hidrofobicidade, e reorganizar o momento hidrofóbico. Além disso, o diagrama de hélice do parental foi usado como suporte para segregar os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, que foram dispostos em uma α -hélices levando aos novos peptídeos.

No alinhamento entre as sequências peptídicas primárias, foi demonstrado que o peptídeo temphylarata-1 permaneceu com 54% de identidade e 23% de similaridade com a sequência do parental e se manteve com 77% das características originais (Figura 6A). Em contra partida o temphylarata-2 permaneceu com 46% de identidade e 23% de similaridade, e manteve com 69% das características originais (Figura 6B).

A sequência controle **FFGSVLKLIPKIL** (temporina-PTa) apresenta carga líquida +3, hidrofobicidade 0,61 e tem seu momento hidrofóbico em 0,72 (Figura 6C). Para projeção da primeira sequência **AAGKVLKLLKKLL** (temphylarata-1), as modificações feitas foram a troca de Phe¹ e Phe² por alaninas aminoácido apolar, Ser⁴, Iso⁹, Pro¹⁰ e Iso¹² foram substituídos por lisina, leucina, lisina, leucina, respectivamente carregadas positivas e não polares. Isso fez com que a carga nessa nova sequência aumentasse passando a ser +4 a hidrofobicidade fosse mantida, 0,61 e o momento hidrofóbico passou a ser 0,66 (Figura 6D).

O segundo análogo **AAKVLKLLKKLL** (temphylarata-2) foi projetado seguindo os mesmos procedimentos para obtenção da sequência 1 (temphylarata-1) com exceção da substituição da Glu³ por uma Lis⁷. Isso aumentou a carga para +5 e manteve a hidrofobicidade e momento hidrofóbico em 0,61 e 0,72 respectivamente (Figura 6E).

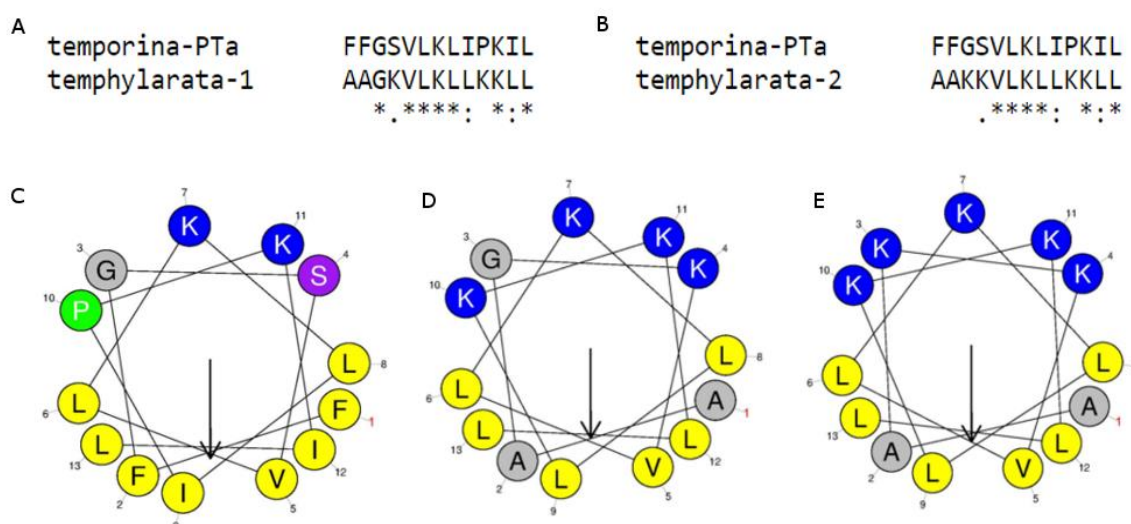


Figura 6: Alinhamento comparando a sequência análogas com o parental. **(A)** alinhamento entre as sequências parental temporina-PTa e análoga temphylarata-1. **(B)** alinhamento entre as sequências parental temporina-PTa e análoga temphylarata-2. A projeção em hélice dos peptídeos apresenta uma seta onde está representada o momento hidrofóbico. **(C)** na projeção de temporina-PTa os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos e verde são apolares e os em cinza e roxo polares não-carregados. **(D)** na projeção de temphylarata-1 os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos são apolares e os em cinzas polares não-carregados. **(E)** na projeção de temphylarata-2 os aminoácidos em azul são carregados positivamente, os amarelos são apolares e os em cinzas polares não-carregados.

4.2. SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO

A espectro de massa foi o registro da intensidade, abundância e razão da massa sobre a carga dos peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2. O equipamento detecta a intensidade (*I*) dos peptídeos. E *m/z* foi chamado de relação massa-carga. A intensidade está associada à quantidade de íons de mesma massa-carga que foram ionizados em $[M+H]^+$. A trajetória do peptídeo temporina-PTa em espectrometria mostra que a massa é 1.475 Da (Figura 7A). Temphylarata-1 espectrometria mostra a massa de 1.395 Da (Figura 7B). Temphylarata-2 tem massa de 1.466 Da (Figura 7C). Com isso mostra que os peptídeos tem 95% de pureza.

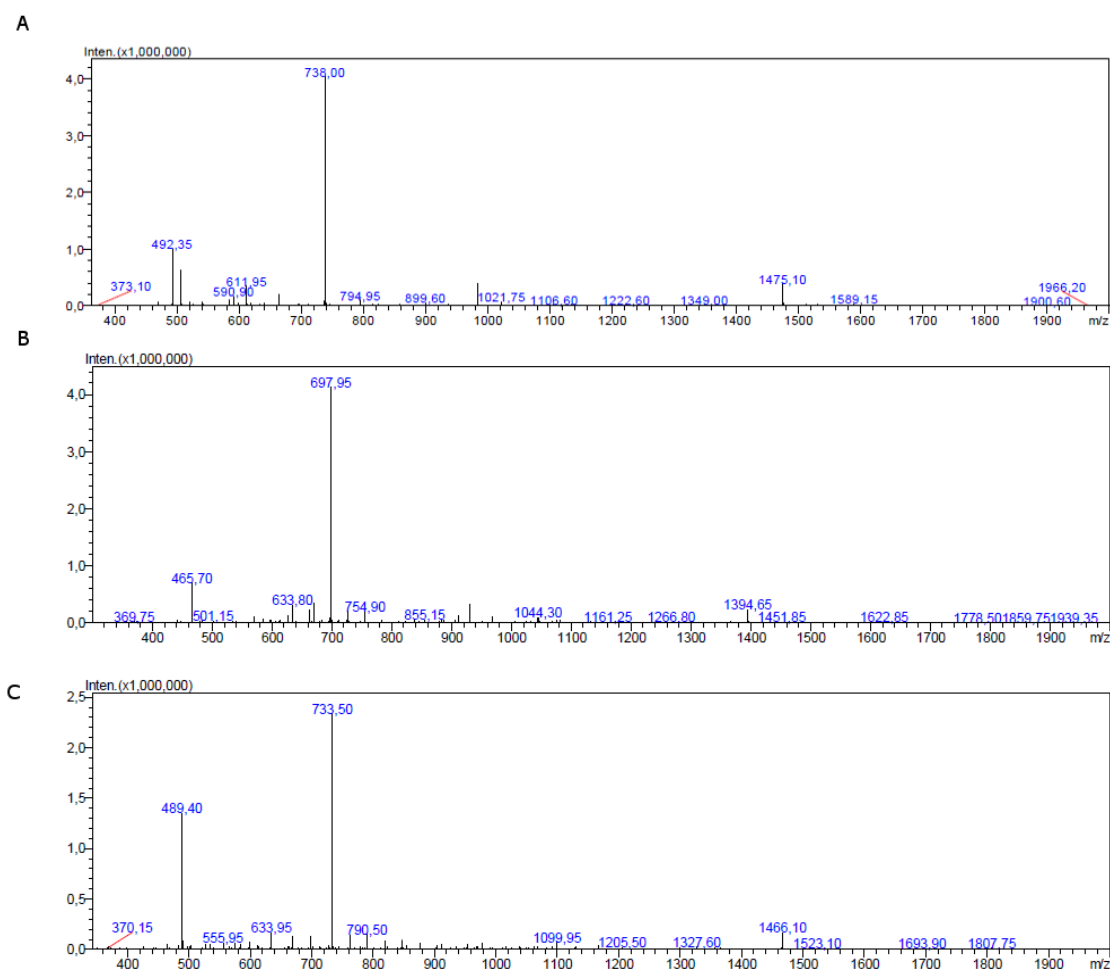


Figura 7: Espectrometria de *electrospray* dos peptídeos. **(A)** temporina-PTa com a massa molecular de 1465,1 com $[M+H]^+$. **(B)** temphylarata-1 com a massa molecular de 1394,6 com $[M+H]^+$. **(C)** temphylarata-2 com a massa molecular de 1466,1 com $[M+H]^+$.

4.3. ENSAIOS *IN VITRO*

4.3.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COM PROTOZOÁRIO

Os resultados dos peptídeos frente as fases epimastigota e tripomastigota do protozoário *T. cruzi* estão demonstrados na (Tabela 3). O parental temporina-PTa e os seus análogos temphylarata-1 e temphylarta-2 foram tóxicos para as células do *T. cruzi* na forma tripomastigota com atividade chegando a 84, 48 e 83 % respectivamente, em concentração de 12, 77 e 13 μ M. O índice de seletividade (IS) de temporina-PTa foi de 1,32, e temphylarta-2 teve o índice próximo do parental com 1,18. Os mesmos não foram tóxicos para as células na forma epimastigota, mesmo em concentrações mais altas de 89 92, 89 μ M respectivamente.

Tabela 3: Ação dos peptídeos frente a protozoário *T. cruzi* nas fases inicial e final de desenvolvimento

Peptídeos	Epimastigota	IS	Tripomastigota	IS
	EC ₅₀ 24h(μM) / R ²		EC ₅₀ 04h(μM) / R ²	
temporina-PTa	>81,4/0,978	0,62	12/ 0,973	1,32
temphylarata-1	>86/0,980	0,60	77/ 0,924	0,66
temphylarata-2	>86/0,972	0,60	1/ 0,976	1,18

IS: índice de seletividade

4.3.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os ensaios foram realizados para todos os peptídeos com objetivo de determinar a habilidade deles em reduzir ou eliminar o crescimento bacteriano. O peptídeo parental temporina-PTa eliminou em 100 % as células bacterianas de *E. coli*, *E. coli* resistente a carbapenemase e *S. aureus* MRSA, na concentração mínima de 43,4 μM. O temphylarata-1 apresentou atividade bactericida sobre o crescimento de *E. coli*, *E. coli* resistente a carbapenemase e *E. faecalis*, nas concentrações de 3, 3 e 23 μM, o temphylarata-2 evitou o crescimento de *A. baumannii*, *E. coli* ATCC, *E. coli* resistente a carbapenemase, *K. pneumoniae* ATCC, *E. faecalis* e *S. aureus* MRSA nas concentrações de 22, 3, 3, 3, 5.4 e 22 μM respectivamente (Tabela 4).

4.3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

O ensaio antibiofilme foi realizado para analisar o potencial dos peptídeos em inibir a formação inicial de biofilmes. A temporina-PTa não apresentou atividade significativa contra a interrupção da formação de biofilme. Em contra partida o temphylarata-1 interrompe a formação de biofilme de *A. baumannii*, *E. coli* a resistente carbapenemase e *K. pneumoniae* resistente carbapenemase nas respectivas concentrações de 92; 23 e 46 μM, e o temphylarata-2 interrompeu a formação de biofilme de *A. baumannii*, *E. coli* resistente carbapenemase e *K. pneumoniae* resistente carbapenemase nas respectivas concentrações 87; 43,6 e 43,6 μM respectivamente (Tabela 4).

4.3.4. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios foram realizados para todos os peptídeos com objetivo de determinar a citotoxicidade frente a eritrócitos e células vero de mamífero. Os peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2 não foram hemolíticos e nem tóxicos para células vero, até as concentrações máximas testadas de 89; 92 e 89 μM respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Toxicidade para células bacterianas, eritrócitos, células veras, concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações inibitórias e biofilme mínimas (CIMB) dos peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2.

Organismos	CIM μM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	temporina-PTa	temphylarata-1	temphylarata-2
Mamífero			
Eritrócitos	nt**	nt	nt
Célula vero	Nd	nd	nd
Bactérias Gram-negativa			
<i>A. baumannii</i> (isolado clínico -003326263)	22 (32)	23 (32)	22* (32)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	43,4* (64)	3* (4)	3* (4)
<i>E. coli</i> (resistente a carbapenemase KpC+ 001812446)	43,4* (64)	3* (4)	3* (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	Nd	11,5 (16)	3* (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KpC+ 002210477)	Nd	46 (64)	11 (16)
Bactérias Gram-positiva			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	Nd	23* (32)	5,4* (8)
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	43,4* (64)	23 (32)	22* (34)
Gram-negative bacteria	CIMB (μM)		

Acinetobacter baumannii

(Isolado clínico - 003326263)	Nd	92 (128)	87 (128)
----------------------------------	----	----------	----------

Escherichia coli (KpC+
001812446)

Nd	23 (32)	43,6 (64)
----	---------	-----------

*Klebsiella**pneumoniae* (KpC+
002210477)

Nd	46 (64)	43,6 (64)
----	---------	-----------

*Concentração mínima bactericida.

** nt: concentração não-tóxica até concentração máxima de 128µg.mL⁻¹

nd: não determinado.

4.4. ESTUDOS *IN SILICO*

4.4.1. MODELAGEM MOLECULAR

Para obter estrutura tridimensional dos peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarta-2, foram realizadas simulações de modelagem molecular onde é possível ver as regiões das cadeias laterais, e mostra as propriedades dos átomos apresentam assim podemos saber o nível de energia dos peptídeos (Figura 8). Modelo teórico da conformação em α -hélice de temporina-PTa, o N-terminal e o C-terminal estão com marcação (Figura 8A). No modelo em nuvem o peptídeo não tem as cadeias laterais bem salientes e as cargas estão em suas extremidades (Figura 8B).

O análogo temphylarata-1 tem sua α -hélice representada na (Figura 8C). O modelo teórico de energia livre do peptídeo mostra suas extremidades da cadeia lateral mais salientes e bem expostas, sua carga está distribuída em uma face (Figura 8D). Em contra partida o temphylarata-2 tem sua α -hélice representada na (Figura 8E). O modelo teórico de energia livre do peptídeo é parecido com o temphylarata-1 (Figura 8F).

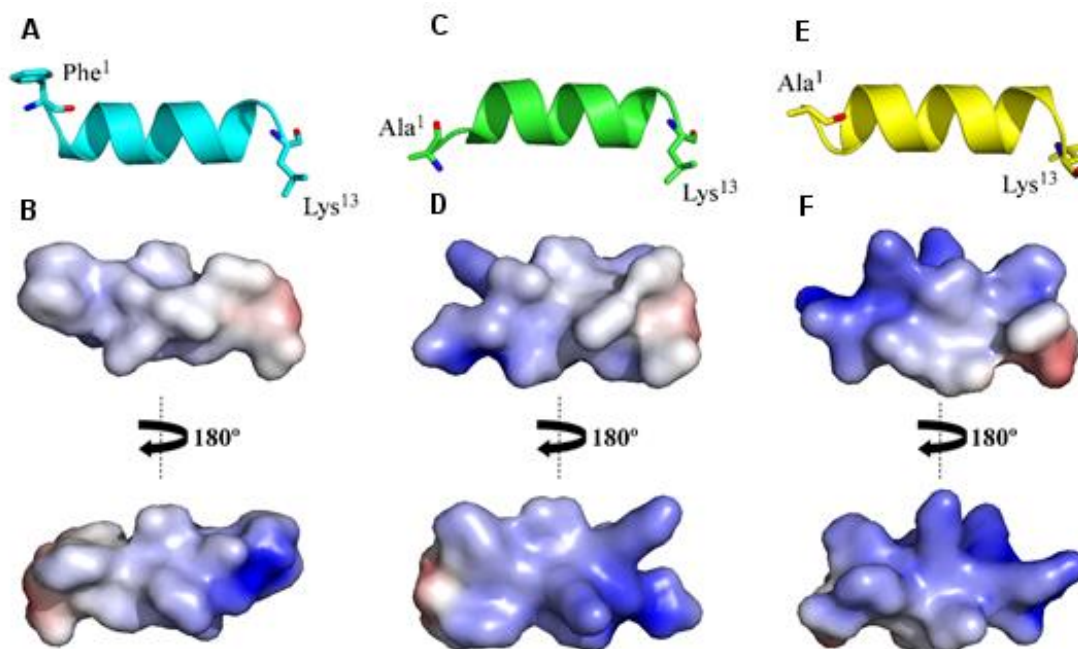


Figura 8: Modelagem molecular dos peptídeos. **(A)** modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temporina-PTa. **(B)** representação da energia livre do temporina-PTa. **(C)** modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temphylarata-1. **(D)** representação da energia livre do temphylarata-1. **(E)** modelo teórico em α -hélice do peptídeo parental temphylarata-2. **(F)** representação da energia livre do temphylarata-2. Em azul energia positiva, em vermelho energia negativa e em branco a energia é zero.

4.4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL EM ÁGUA, TFE E SDS

Foram realizadas as avaliações das estruturas conformacionais *in silico* para os peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2 em água, TFE a 50% e em micelas de SDS (Figura 9). Na água, ficou evidente que a modificação conformacional do controle temporina-PTa ocorreu definitivamente após 50 ns da corrida e perdeu sua conformação α -helicoidal em 100 ns. Análogo temphylarata-1, teve sua modificação estrutural após 50 ns perdendo parte da estrutura e α -hélice no C-terminal e permaneceu a mesma conformação até o fim em 100 ns. No caso do temphylarata-2, a modificação de sua estrutura ocorreu após 50 ns e a conformação da α -hélice se perde no N-terminal e C-terminal em 100 ns (Figura 9A).

Nas simulações com TFE e SDS, não foram observadas modificações extremas na conformação de α -hélice. Em TFE, os peptídeos permaneceram em α -hélice como estrutura secundária durante toda a simulação (Figura 9B). No SDS, observou-se que o temporina-PTa permaneceu com sua estrutura nos primeiros 50 ns, em 100ns sua estrutura perde levemente a conformação N-terminal. Em contra

partida temphylarata-1 perdeu a conformação no C-terminal em 50 e 100 ns. O temphylarata-2 perde levemente a conformação no N-terminal em 50 ns e em 100 ns retorna à formação inicial (Figura 9C).

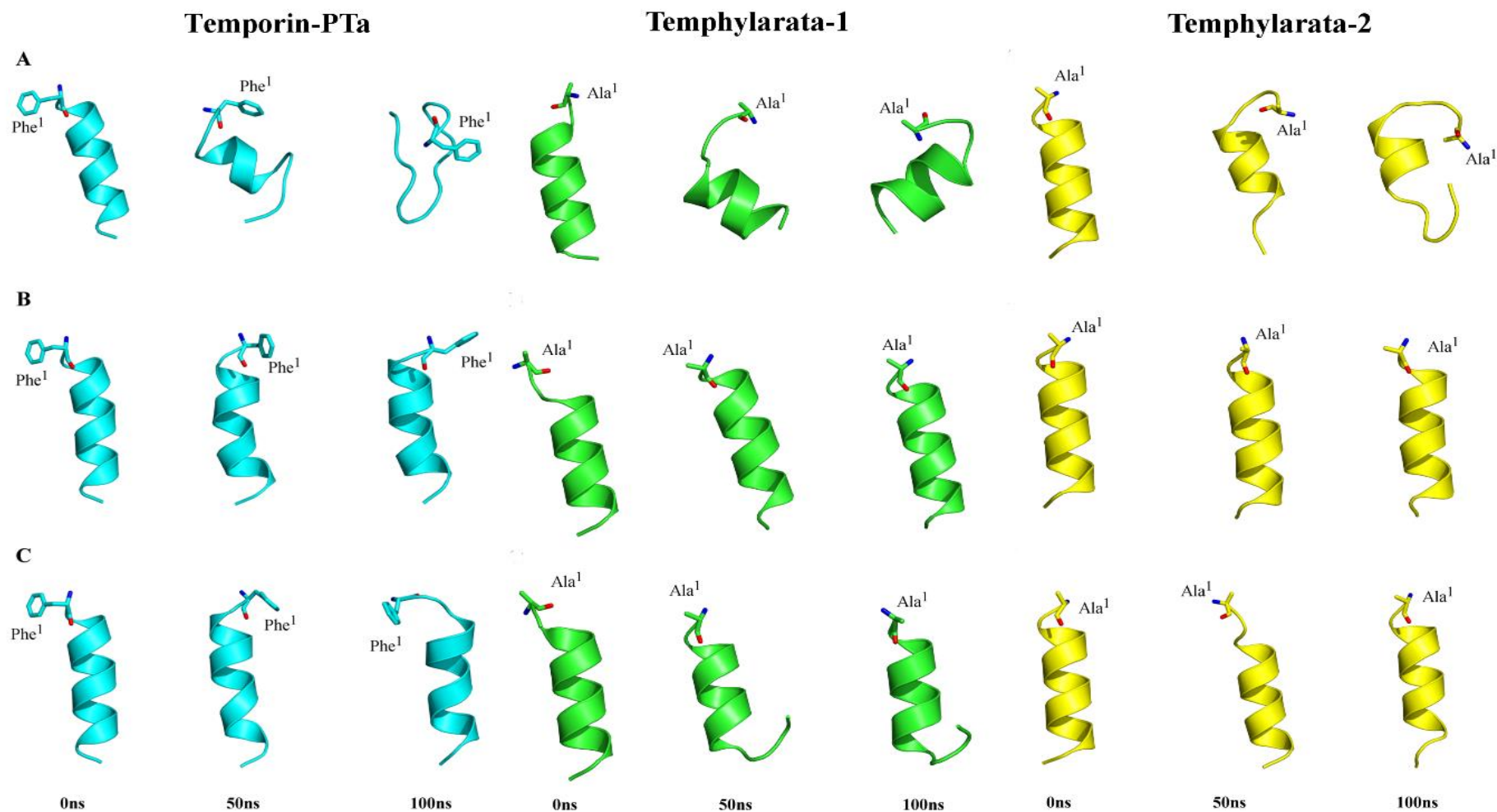


Figura 9: Conformação em α -hélice dos peptídeos frente a diferentes ambientes. (A) água. (B) 50% de TFE e (C) micelas de SDS.

4.4.3. DINÂMICA MOLECULAR EM BICAMADAS DE DPPE /DPPG

A predição de afinidade e as interações atômicas dos modelos teóricos com membranas miméticas bacterianas composta numa proporção de 9:1 de DPPE e DPPG para Gram-negativa 1:1 de DPPE e DPPG para Gram-positiva foram realizadas. A dinâmica molecular de aproximadamente 200 ns mostra o modo de ligação do complexo peptídeo-fosfolipídio. A (Figura 10A) mostra o RMSD do temporina-PTa com relação estrutura inicial frente a membrana mimética aniônica. O RMSD mostra uma oscilação inicialmente de 1 a 5 Å nos primeiros 40 ns, após esse tempo o peptídeo teve poucas variações entre 5,5 a 6,5 Å de 40 a 80 ns, entre os 80 ns até o final 200 ns o peptídeo mostrou variações entre 2,5 a 6 Å na sua aproximação com a membrana. Em membrana catiônica o RMSD de temporina-PTa mostra variações em distâncias de 1,5 a 3,5 Å nos primeiros 40ns, após foi instável com variações de 1,5 a 5 Å até 120 ns, após volta a ficar estável até o fim da corrida com pequenas modificações dentro de 2,5 Å até o fim da corrida (Figura 10B).

Em contrapartida em aproximação a membrana aniônica o RMSD de temphylarata-1 mantém em uma distância de 4 a 6 Å durante toda a corrida de 200 ns (Figura 10C). RMSD em catiônica mostra que nos tempos iniciais de 0 a 80 ns o peptídeo variou sua entre 2 a 3,4 Å, após se mantém estável 3,5 Å até o fim da corrida (Figura 10D)

O RMSD de temphylarata-2 mostra variações de distância da membrana entre 4,5 a 6 Å até 80 ns, após esse tempo o peptídeo permanece estável em uma distância de 4,5 Å (Figura 10E). Em membrana catiônica se mantém estável no tempo de 0 a 100 ns mantendo uma distância 1 a 3 Å, após tem uma subida para 3 Å e assim mantém até o fim da corrida (figura 10F).

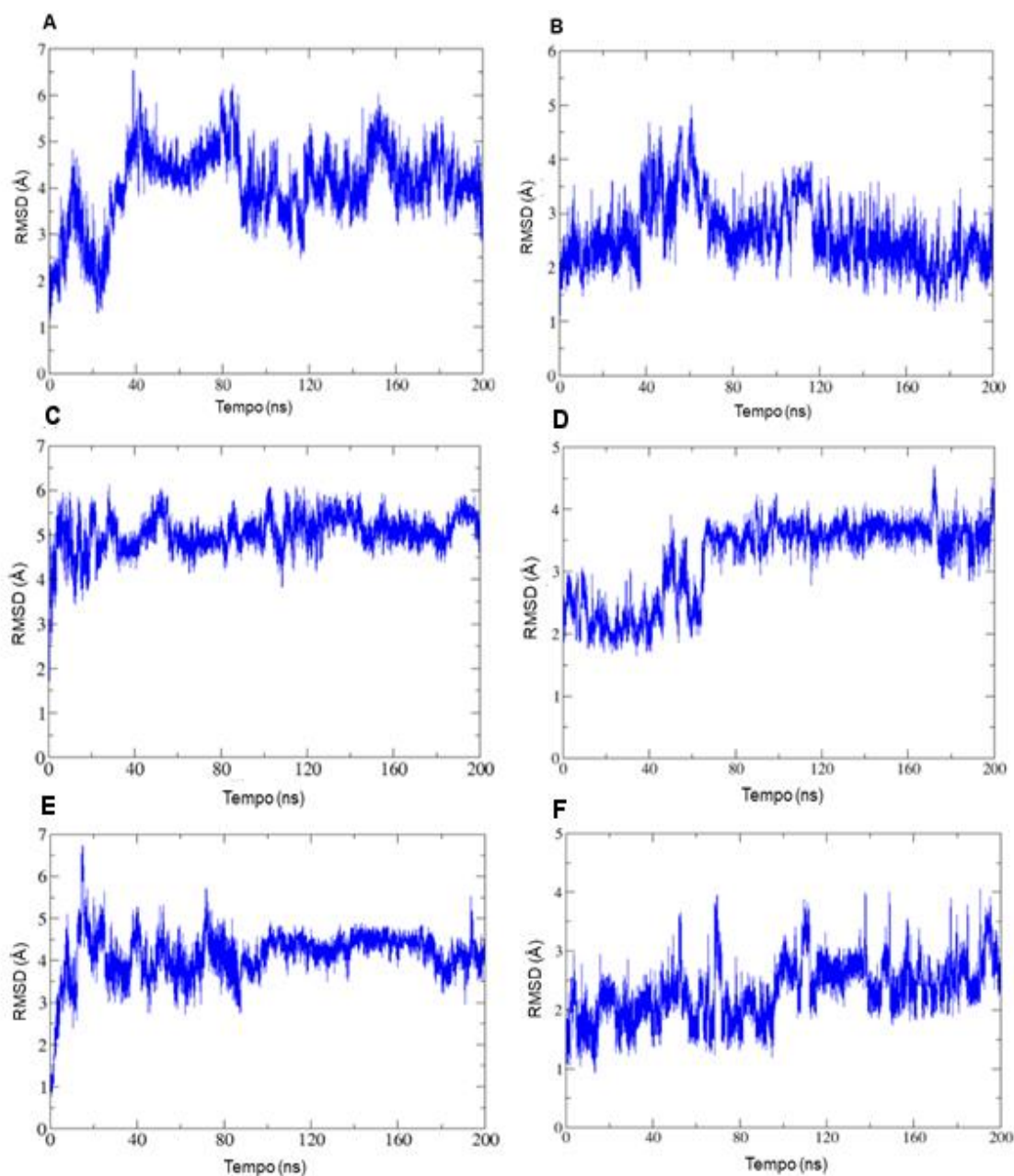


Figura 10: Representação do RMSD é o valor médio para o desvio médio dos átomos dos peptídeos frente aos fosfolipídios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. **(A)** RMSD do peptídeo parental temporina-PTa em membrana aniônica. **(B)** RMSF do temporina-PTa em membrana catiônica. **(C)** RMSD do temphylarata-1 em membrana aniônica. **(D)** RMSD do temphylarata-2 em membrana catiônica. **(E)** RMSD do temphylarata-2 membrana aniônica. **(F)** RMSD do temphylarata-2 em membrana catiônica.

Os valores iniciais dos Rgs são de aproximadamente 8 Å para os três peptídeos. Na aproximação da bicamada aniônica e catiônica, os peptídeos tiveram

grandes modificações nos Rgs, como pode ser observado na (Figura 11). O peptídeo temporina-PTa sofre as maiores modificações frente a membrana aniônica no tamanho do Rg após 30 ns variando entre 7 a 10 Å (Figura 11A). Em membrana catiônica os peptídeos sofreram menores transformações no seu tamanho. O valor de Rg de temporina-PTa não sofre modificações com relações no centro de sua massa permanece em 8 Å durante toda a simulação (Figura 11B).

O análogo temphylarata-1 sofrem menores transformações no seu tamanho em membrana aniônica onde os valores do Rg se estabilizam em 7,5 Å após 140 ns (Figura 11C). Em contrapartida teve modificações estruturais do Rg de 6,5 a 8 Å até 100 ns após esse momento houve uma estabilidade conformacional em 6,5 Å até 170 ns, depois volta a sofrer alterações estrutural entre 6,5 a 7,5 Å até o fim da corrida (Figura 11D).

O análogo temphylarata-2 frente a membrana aniônica foi estável após 100 ns mantendo a estrutura em 7 Å respectivamente (Figura 11E). em membrana catiônica se manteve estruturalmente estável em 7,5 Å durante toda a corrida de 200 ns (figura 11F).

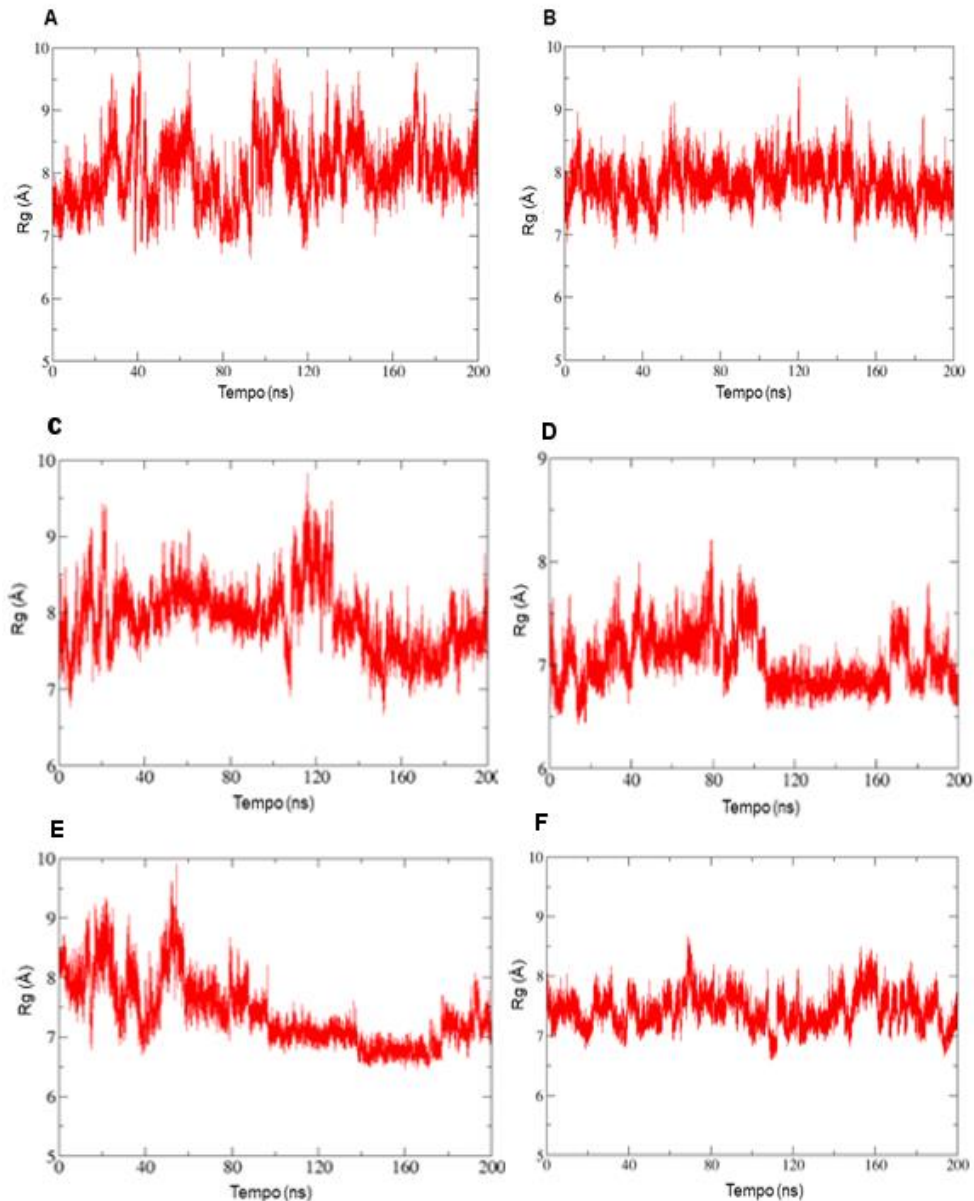


Figura 11: Representação do R_g (raio de giro), dos peptídeos frente aos fosfolípidios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. e **(B)** Temporina-PTa, em **(A)** membrana aniônica. e **(B)** membrana catiônica. Temphylarata-1 em **(C)** membrana aniônica e **(D)** membrana catiônica. Temphylarata-2 em **(E)** membrana catiônica e **(F)** membrana catiônica.

Durante as simulações, um ou mais aminoácidos podem flutuar em relação a sua conformação média em um determinado intervalo de tempo. A flutuação dos aminoácidos é mostrada pelo RMSF que traz a ideia de estabilidade do aminoácido na conformação no período observado. O RMSF de temporina-PTa em membrana

aniônica inicialmente apresentou uma flutuação dos dois primeiros aminoácidos Phe¹ e Phe² em uma distância de 4 a 5 Å. Do quarto ao décimo primeiro resíduo, as variações de RMSF, estão no sentido de recompor a conformação helicoidal, porém, a partir do décimo segundo resíduo observa-se um aumento considerável e o Leu¹³ para 4,5 Å (Figura 12A). Em membrana catiônica teve a flutuação dos seus aminoácidos nos primeiros Phe¹ e Phe² variando em 1,8 a 2,4 Å aproximadamente e nos últimos Iso¹² e Leu¹³ flutuaram a uma distância de 2,5 a 3 Å (Figura 12B).

O RMSF do temphylarata-1 em membrana aniônica mostra a flutuação dos aminoácidos Ala¹, Lys¹⁰, Leu¹² e Leu¹³ com uma distância de aproximadamente 4,5 Å (Figura 12C). Em contra partida os em membrana catiônica a flutuação maiores foi apenas na Ala¹ e Leu¹³ em uma distância de 3 a 4 Å (figura 12D), os demais manteve a flutuações baixas no sentido de recompor a conformação helicoidal.

O temphylarata-2 teve o RMSF frente a membrana aniônica mostrou o seu primeiro aminoácido Ala¹ teve uma flutuação próxima de 3,5 Å, já após o segundo aminoácido em diante teve flutuações baixas no sentido de recompor a conformação helicoidal, a Leu¹³ teve uma flutuação mais altas chegando a 5 Å (Figura 12E). Em catiônica teve a flutuação de Ala¹ e Leu¹³ em distancias de 3 e 3,5 respectivamente, os demais manteve a flutuações baixas recompondo a conformação helicoidal (Figura 12F).

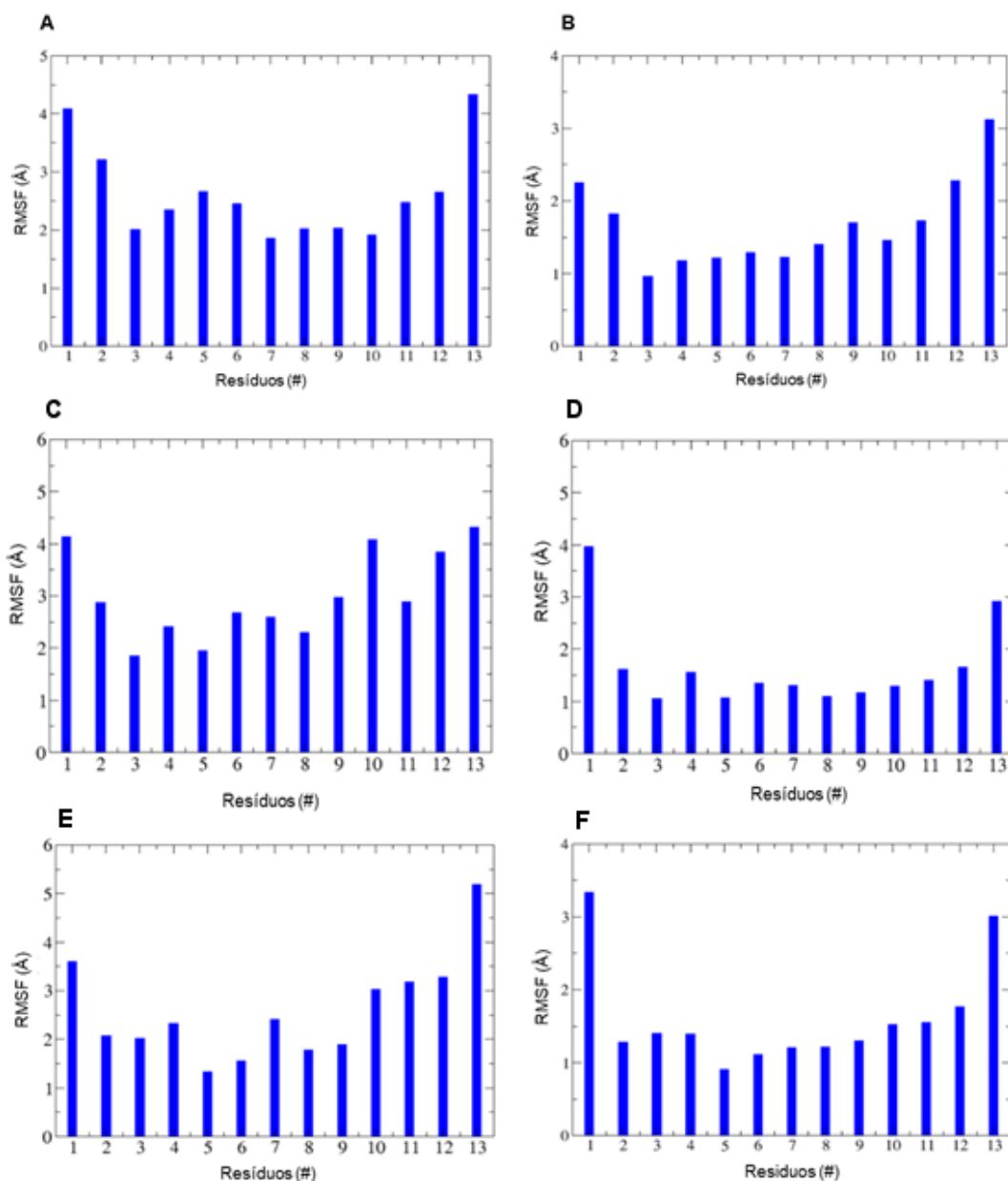


Figura 12: Representação do RMSF, dos peptídeos frente aos fosfolipídios das membranas miméticas aniônicas e catiônicas. e **(B)** Temporina-PTa, em **(A)** membrana aniônica. e **(B)** membrana catiônica. Temphylarata-1 em **(C)** membrana aniônica e **(D)** membrana catiônica. Temphylarata-2 em **(E)** membrana catiônica e **(F)** membrana catiônica.

A conformação estrutural dos peptídeos frente à interação dos fosfolipídios de membranas aniônica e catiônica em 200 ns estão representados na (Figura 13). O peptídeo parental temporina-PTa ao se interagir com membrana mimética aniônica, perde a sua conformação em α -hélice inicialmente, iniciando o contato com o N-terminal e cadeia lateral (Figura 13A). Em relação a interações com os fosfolipídios de

membrana catiônica o peptídeo temporina-PTa não perde a conformação helicoidal e tem sua interação com os aminoácidos do N-terminal e da cadeia lateral (Figura 13B).

O análogo temphylarta-1 não perde a conformação de helicoidal e faz a interação inicial com membrana aniônica com o N-terminal (Figura 13C). Em contra partida em membrana aniônica o peptídeo faz interações com os fosfolipídios com sua cadeia lateral (Figura 13D). O temphylarata-2 se acopla a membrana com o N-terminal, C-terminal verticalmente (Figura 13E). Em contra partida em membrana catiônica o peptídeo interage com N-terminal e com alguns aminoácidos da cadeia lateral (Figura 13F).

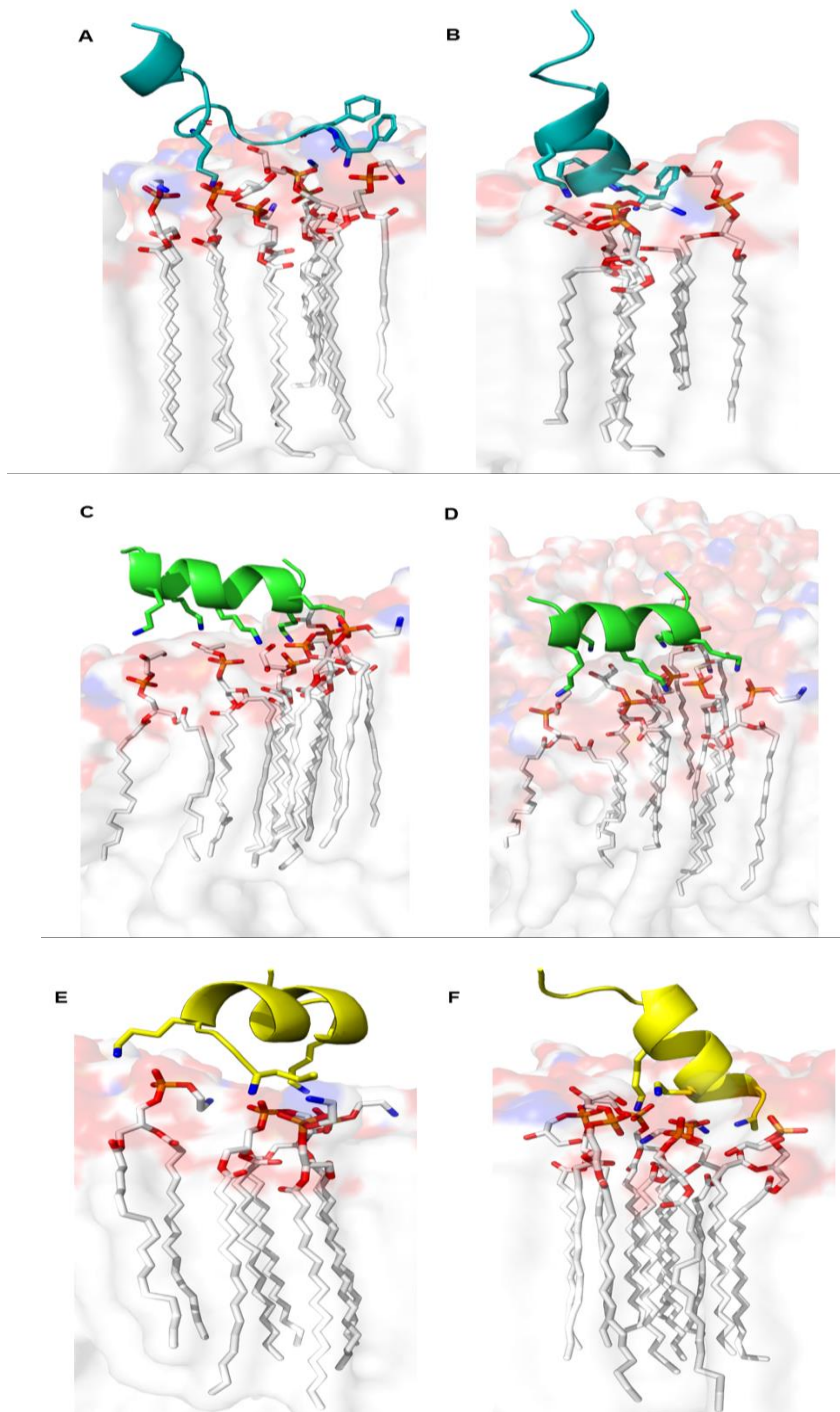


Figura 13: Interações *in silico* dos peptídeos com os fosfolípidos aniônicos e catiônicos. (A) resíduos de aminoácidos de temporina-PTa em interação com fosfolípidos aniônicos e em (B) resíduos de aminoácidos de interação com fosfolípidos catiônicos. Em (C) resíduos de aminoácidos de temphylarata-1 em interação com os fosfolípidos aniônicos e em (D) interação com fosfolípidos catiônica. (E) resíduos de aminoácidos de temphylarata-2 em interação com os fosfolípidos aniônicos e em (F) interação com fosfolípidos catiônica.

As interações de temporina-PTa nos fosfolipídios de membranas aniônicas bacteriana é mostrado na (Tabela 5). O resíduo hidrofílico Phe¹ e Phe² usa átomos de nitrogênio (N) e oxigênio (O) da cadeia principal para interagir com os átomos de oxigênio e nitrogênio da cabeça polar dos diferentes fosfolipídios (DPPG¹⁷², DPPE¹⁷⁹ e DPPE¹⁹⁴) formando pontes de hidrogênio em distâncias 2,6 a 2,9 Å respectivamente. Lis⁷ usa átomos de nitrogênio (NZ) da cadeia lateral para interagir com átomos de oxigênio dos fosfolipídios (DPPG¹⁹², DPPE¹⁹⁹ e DPPE¹⁸⁹) formando ponte salina em uma distância de 2,7 a 2,8 Å. Os outros aminoácidos não fizeram interações.

Tabela 5: Avaliação *in silico* das interações entre temporina-Pta em membrana bacteriana Gram-negativa.

Temporina-Pta		Distância (Å)	Gram-Negativa		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolipídeo	Átomo	
Phe-1	N	2,6	DPPG-172	O13'D	PH
Phe-1	N	2,9	DPPE-179	O14'D	PH
Phe-1	O	2,8	DPPE-194	N'D	PH
Phe-2	O	2,9	DPPE-194	N'D	PH
Lis-7	NZ	2,7	DPPG-192	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,7	DPPE-199	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,8	DPPE-189	O13'D	PS

PS: Ponte Salina **PH:** Ponte de Hidrogeno

Em membrana catiônica temporina-TPa usa os resíduos hidrofílicos Phe¹ e Phe² usa átomos de nitrogênio (N) da cadeia principal para interagir com os átomos de oxigênio e nitrogênio da cabeça polar dos diferentes fosfolipídios (DPPG¹¹⁹ e DPPE¹¹⁴) formando pontes de hidrogênio em distância 2,7 Å respectivamente. Ser⁴ usa o nitrogênio e oxigênio da sua cadeia lateral para interagir com os oxigênios dos fosfolipídios (DPPE¹¹⁴ e DPPG¹²⁶) formando pontes de hidrogênio 2,7 e 3 Å, a Lis⁷ usa átomos de nitrogênio (N) da cadeia lateral para interagir com átomos de oxigênio dos fosfolipídios (DPPE¹¹⁴, DPPG¹¹⁵, DPPG¹¹⁸), formando ponte de hidrogênio em uma distância de 2,8 a 3 Å. Os outros aminoácidos não fizeram interações (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação *in silico* das interações entre temporina-Pta em membrana bacteriana Gram-positiva.

Temporina-Pta		Distância (Å)	Gram-Positiva		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolípídeo	Átomo	
Phe-1	N	2,7	DPPG-119	O13'D	PH
Phe-1	N	2,7	DPPE-114	O13'D	PH
Phe-2	N	2,7	DPPG-119	O13'D	PH
Ser-4	N	3	DPPE -114	O13'D	PH
Ser-4	OG	2,7	DPPG-126	OC3	PH
Lis-7	NZ	2,8	DPPE-114	O14'D	PS
Lis-7	NZ	2,9	DPPG-115	OC2'D	PS
Lis-7	NZ	3	DPPG-118	OC3'D	PS

PS: Ponte Salina **PH:** Ponte de Hidrogeno

O análogo temphylarata-1 mostrou interação apenas de dois aminoácidos alanina apolar e lisina polar em membrana aniônica, a Ala¹ fez interações com nitrogênio da sua cadeia lateral nos oxigênios dos fosfolipídios (DPPG¹²² e DPPG¹³⁷) fazendo ponte de hidrogeno com distancias de 2,7 a 3,2 Å, Lys³ fez interações com nitrogênio da cadeia lateral nos oxigênios dos fosfolipídios (DPPE¹²⁸ e DPPG¹²²) fazendo ligações eletrostática com distâncias de 2,6 a 3 Å (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação *in silico* das interações entre temphylarata-1 em membrana bacteriana Gram-negativa.

Temphylarata-1		Distância (Å)	Gram-Negativa		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolípídeo	Átomo	
Ala-1	N	2,7	DPPG-122	O14'D	PH
Ala-1	N	2,8	DPPG-137	O13'D	PH
Ala-1	N	3,2	DPPG-137	O14'D	PH
Lis-3	NZ	2,6	DPPE-128	O13'D	PS
Lis-3	NZ	3	DPPG-122	OC3'D	PS

PS: Ponte Salina **PH:** Ponte de Hidrogeno

Encontra partida em membrana catiônica temphylarata-1 teve interações apenas pelos aminoácidos carregados positivamente da sequência, a Lis³ fez interações com nitrogênio da cadeia lateral com o oxigênio dos fosfolipídios (DPPG¹⁶³ DPPG¹⁵⁹) com ligações salinas em distancias de 2,7 e 2,9 Å, Lis⁴ fez interações de

nitrogênio com oxigênio dos fosfolipídios (DPPE¹¹⁹, DPPE¹²⁶ e DPPE¹³⁰) com ligação salina em uma distância de 2,6 a 3,2 Å. Lis⁷ fez interações com nitrogênio da cadeia no oxigênio dos fosfolipídios (DPPE¹²⁶ e DPPG¹³⁸) com ponte salinas com distâncias 2,7 e 2,9 Å. Lis¹⁰ e Lis¹¹ interações parecida com Lis⁷ (Tabela 8)

Tabela 8: Avaliação *in silico* das interações entre temphylarta-1 em membrana bacteriana Gram-positiva.

Temphylarata-1		Distância (Å)	Gram-Positiva		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolipídeo	Átomo	
Lis-3	NZ	2,7	DPPG-163	O13'D	PS
Lis-3	NZ	2,9	DPPG-159	O14'D	PS
Lis-4	NZ	2,6	DPPE-119	O13'D	PS
Lis-4	NZ	2,6	DPPE-126	O14'D	PS
Lis-4	NZ	3,2	DPPE-130	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,7	DPPE-126	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,9	DPPG-138	O14'D	PS
Lis-10	NZ	2,9	DPPG-138	OC2'D	PS
Lis-10	NZ	2,9	DPPG-138	OC3'D	PS
Lis-11	NZ	3,0	DPPG-136	OC2'D	PS

PS: Ponte Salina

O segundo análogo temphylarata-2 teve resultados parecidos com o temphylarata-1, em membrana mimética aniônica o peptídeo a dinâmica mostrou que o nitrogênio interage com o átomo de oxigênio dos fosfolipídios (DPPE¹³⁹ e DPPE¹²⁶) com ligações de hidrogênio em distancias de 2,6 e 2,7 Å, Lis³ e Lis¹⁰ usa o nitrogênio da cadeia lateral (NZ) para interagir com o oxigênio dos fosfolipídios (DPPE¹¹⁸ e DPPE¹⁴⁴) com ligações eletrostática em distancias de 2,6 e 2,7 Å (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação *in silico* das interações entre temphylarata-1 em membrana bacteriana Gram-negativa.

Temphylarata-2		Distância (Å)	Gram-Negativa		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolípídeo	Átomo	
Ala-1	N	2,6	DPPE-139	O14'D	PH
Ala-1	N	2,7	DPPE-126	O14'D	PH
Lis-3	NZ	2,7	DPPE-118	O14'D	PS
Lis-10	NZ	2,6	DPPE-144	O13'D	PS

PS: Ponte Salina **PH:** Ponte de Hidrogênio

Em membrana mimética catiônica o temphylarata-2 interagiu com nitrogênios da cadeia lateral de Ala¹ com oxigênios dos fosfolípides (DPPE¹¹⁸ e DPPG¹¹⁴) com ligações de hidrogênio em distâncias entre 2,7 a 3,3 Å. Lis⁴ faz interações com os nitrogênios da cadeia lateral nos oxigênios dos fosfolípidios (DPPE¹¹⁸ DPPG¹⁴⁵ DPPE¹²¹ e DPPG¹²⁶) usando ponte salina variando em distâncias de 2,8 a 3,3 Å. Lis⁷ faz interações com os nitrogênios da cadeia lateral nos oxigênios dos fosfolípidios (DPPE¹²⁰ DPPG¹²⁹ e DPPE¹¹⁸) usando ponte salina variando em distâncias de 2,5 a 2,8Å (Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação *in silico* das interações entre temphylarta-2 em membrana bacteriana Gram-positiva.

Temphylarata-2		Distância (Å)	Gram-Positiva		Interação
Resíduo	Átomo		Fosfolípídeo	Átomo	
Ala-1	N	2,7	DPPE-118	O14'D	PH
Ala-1	N	2,7	DPPG-114	O22'D	PH
Ala-1	N	3	DPPG-114	O14'D	PH
Ala-1	N	3,3	DPPG-114	O11'D	PH
Lis-4	N	3,3	DPPE-118	O14'D	PH
Lis-4	NZ	2,8	DPPG-145	O13'D	PS
Lis-4	NZ	2,8	DPPE-121	O13'D	PS
Lis-4	NZ	3,2	DPPG-126	OC3'D	PS
Lis-4	NZ	3,4	DPPG-126	OC2'D	PS
Lis-7	NZ	2,5	DPPE-120	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,7	DPPG-129	O13'D	PS
Lis-7	NZ	2,8	DPPE-118	O13'D	PS

PS: Ponte Salina **PH:** Ponte de Hidrogeno

A (Figura 14) mostra a o quanto os peptídeos estão posicionados no centro das membranas aniônica e catiônica. A temporina-PTa está com o seu N-terminal a uma distância de 25 Å do centro em uma interface de fosfolípido e água (Figura 14A). O peptídeo temphylarata-1 em membrana aniônica tem a interação na interface entre DPPE, DPPG e água em distância de 25 Å do centro da membrana, demonstrando que apenas os aminoácidos iniciais estão em contato com a membrana e o restante interagindo com a água (Figura 14B). Nessa demonstração o peptídeo temphylarata-2 mostrou ser parecido com o controle temporina-PTa, iniciando a entrada na membrana aniônica e chega em uma distância de 25 Å do centro da membrana permanecendo na interface dos fosfolípidios e água (Figura 14C).

Em membrana catiônica demonstra a mesma distância da aniônica de 25 Å do centro da membrana fosfolípido e água (Figura 14D). Em membrana catiônica o peptídeo está em uma distância de 10 Å do centro da membrana, demonstrando que o mesmo passou a interface de DPPE e DPPG, interagindo apenas com a água no interior da membrana mimética (Figura 14E). A temphylarata-2 em membrana catiônica demonstra a mesma distância da aniônica de 25 Å, na interface dos fosfolípidios e água (Figura 14F).

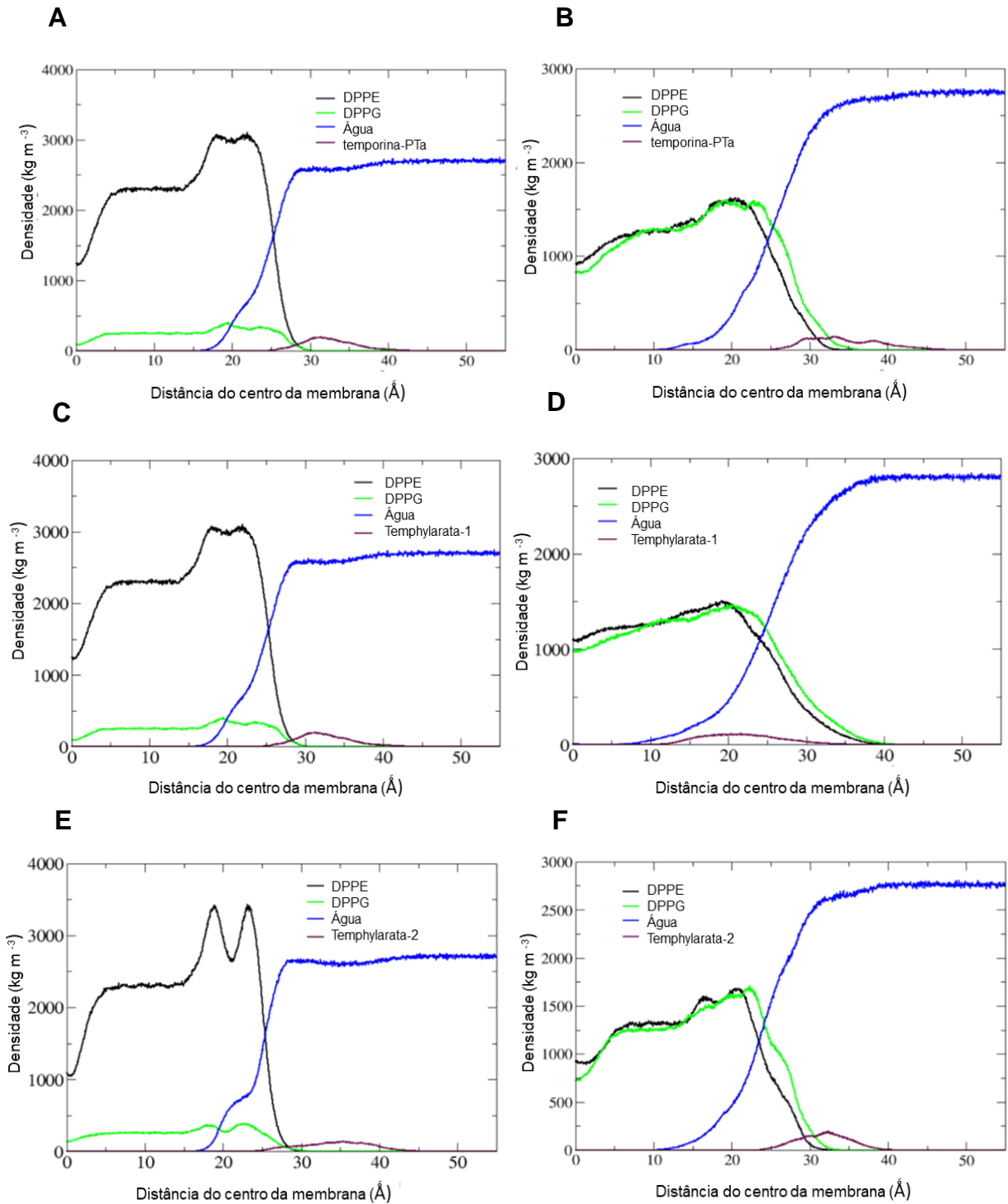


Figura 14: Posicionamento aos centros das membranas, peptídeos (roxo) frente à os fosfolípidos DPPE (preto) e DPPG (verde) na interface entre a água (azul). **(A)** temporina-PTa em interação com fosfolípidos aniônicos **(B)** temporina-PTa em interação com fosfolípidos catiônicos. **(C)** temphylarata-1 em interação com os fosfolípidos aniônicos. **(D)** temphylarata-1 em interação com fosfolípidos catiônica. **(E)** temphylarata-2 em interação com os fosfolípidos aniônicos. **(F)** temphylarata-2 em interação com fosfolípidos catiônica.

5. DISCUSSÃO

Por causa da falta de medicamentos para doenças negligenciadas e o número crescente de bactérias resistentes aos medicamentos, o cuidado com a saúde vem enfrentando sérios desafios em todo o mundo com uma necessidade urgente de novos compostos para o tratamento dessas doenças. Peptídeos de defesa do hospedeiro têm, portanto, alto potencial para se tornar a próxima geração destes compostos bioativos.

O entendimento das correlações estrutura-função destes peptídeos multifuncionais pode também ser fundamental para o desenvolvimento destas ferramentas biotecnológicas em terapias não tóxicas devido à composição. Na literatura, a maior parte dos relatos demonstram que a atividade antimicrobiana pode ser associada a dois principais parâmetros físico-químicos: carga e hidrofobicidade. Portanto, este estudo demonstrou que ambas as propriedades são importantes, mas é apenas uma parte do processo.

Além disso, a compreensão do modo como as condições ambientais, tais como temperatura e pH também pode modular a atividade do peptídeo devido à suavização das flutuações estruturais pode também ser importante, o que permite o desenvolvimento de multidrogas que tenham ação em momentos diferentes e sob condições variadas (AHMED et al., 2019; MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017; PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018).

Embora o modo exato de ação dos peptídeos antimicrobianos não tenha sido estabelecido, foi proposto que a membrana citoplasmática é o principal alvo de alguns peptídeos. Assim, não é esperado o desenvolvimento de resistência a peptídeos ativos na membrana, porque isto exigiria alterações substanciais na composição lipídica das membranas celulares dos microrganismos. Em geral, as aplicações terapêuticas desses peptídeos foram prejudicadas por vários problemas, talvez o mais importante seja a toxicidade para as células hospedeiras. Para resolver esse problema, numerosos estudos de estrutura-função em peptídeos antimicrobianos naturais e sintéticos foram empregados para projetar PAMs ativos contra os patógenos de interesse e com baixa toxicidade na dose terapêutica (WIRADHARMA et al., 2011).

Parâmetros físico-químicos que se acredita serem importantes para a atividade antimicrobiana dos PAMs foram identificados, incluindo carga líquida, helicidade, hidrofobicidade e anfipaticidade (JIANG et al., 2008). No entanto, é difícil estimar as contribuições desses parâmetros para a atividade antimicrobiana e a seletividade celular, porque esses parâmetros não são necessariamente independentes. Neste estudo os aminoácidos Phe¹, Phe², Gly³, Ser⁴, Iso⁹, Pro¹⁰ e Iso¹² de temporina-PTa foram sistematicamente substituídos por resíduos apolares e os carregados positivamente para estudar os efeitos do número e distribuição dos resíduos nas propriedades biofísica e atividades biológicas dos peptídeos.

Os novos peptídeos tiveram a anfipaticidade definida, e foram feitas as seguintes modificações Ser⁴ e Pro¹⁰ na face polar foram substituídas por Lys carregado positivamente aumentou a carga e anfipaticidade do peptídeo temphylarata-1, e Phe¹, Phe², Iso⁹, e Iso¹² substituído por alanina, alanina, leucina e leucina e não teve efeito na anfipaticidade do peptídeo. No entanto, quando Gly³ foi substituído por resíduo de Lys, a anfipaticidade do peptídeo temphylarata-2 foi maior do que o temphylarata-1 e da temporina-PTa. Mas isso é variável pois os peptídeos helicoidais localizados na superfície da membrana podem reposicionar as regiões polares ou apolares por desgaste da hélice que é frequentemente encontrado na interação do peptídeo helicoidal localizado interfacialmente com as membranas (HALSALL; DEMPSEY, 1999; HRISTOVA; DEMPSEY; WHITE, 2001). A anfipaticidade perfeita frequentemente resulta em aumento simultâneo da atividade bactericida e citotoxicidade (TAKAHASHI et al., 2010). A estrutura anfipática α -helicoidal parece estar relacionada a forte atividade antimicrobiana, atividade hemolítica reduzida e, portanto, a um melhor índice terapêutico de PAM (HAWRANI et al., 2008; ZHANG et al., 2016). Neste estudo, temphylarata-1 e temphylarata-2 teve aumento de anfipaticidade também exibiram atividade hemolítica reduzida e uma melhora na atividade biológica.

Acredita-se que o aumento de resíduos com carga positiva seja benéfico para as interações eletrostáticas iniciais entre PAMs e componentes da membrana bacteriana com carga negativa, impondo seletividade (JIA et al., 2020; LISCANO et al., 2019). Em nossos resultados indicam que temphylarata-1 e -2 com aumento de resíduos carregados positivamente possuíam uma atividade antimicrobiana aumentada

contra bactérias Gram-negativas e também exibiram atividade antimicrobiana levemente aumentada contra bactérias Gram-positivas (Tabela 4). Os resultados indicam que o aumento da anfipaticidade do peptídeo por substituição de resíduos carregados positivamente na face polar aumentaria a atividade antimicrobiana. A partir desses resultados, podemos concluir que a posição dos resíduos carregados positivamente influencia significativamente a atividade antimicrobiana do peptídeo.

A obtenção da atividade antimicrobiana máxima possível com toxicidade mínima para o hospedeiro é uma direção atraente para pesquisa e desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos. A atividade hemolítica dos peptídeos contra os eritrócitos humanos foi empregada como uma medida principal da toxicidade do peptídeo em relação a células eucarióticas superiores. Estudos biológicos mostraram que a forte atividade hemolítica dos peptídeos geralmente se correlacionava com alta hidrofobicidade, alta anfipaticidade e alta helicidade (DATHE et al., 1997). Nossos resultados indicam que temphylarata-1 e -2 não exibiram atividade hemolítica na concentração testada e com atividade antimicrobiana melhorada. A toxicidade do peptídeo para as células vero foi bem correlacionada com os resultados da atividade hemolítica.

Neste estudo, aumentando a carga positiva líquida, a hidrofobicidade e a anfipaticidade dos análogos da temporina-PTa foram alterados. O temphylarata-1 e -2 foram ativos contra bactérias Gram-negativas e -positivas com a melhoria das atividades em relação ao parenta em 11 a 21 vezes, chegando, chegando à eliminação em 100 % respectivamente. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) temporin-1DRa e seus análogos mostraram uma potência 5 a 6,5 vezes maior contra os patógenos (GAISER et al., 2019). Um análogo de temporina-1CEb matou 99,9% de *E. coli* e *S. aureus* a 4x (SHANG et al., 2012). É possível ampliar o espectro de atividade de um peptídeo antimicrobiano por alterações sutis da estrutura da primária, como o peptídeo análogo a temporina-Tb, possuindo uma composição simples, um amplo espectro de atividade antimicrobiana e uma atividade hemolítica baixa (AVITABILE et al., 2013).

Biofilmes são comunidades microbianas de microrganismos sésseis compostos por células que são incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas

extracelulares ligadas a um substrato ou interface (KUMAR et al., 2017; POMPILIO; CROCETTA, 2012). O aspecto mais alarmante das infecções relacionadas ao biofilme é que elas são altamente (10 a 1.000 vezes) resistentes aos antibióticos convencionais que foram desenvolvidos para matar células planctônicas (YAN; BASSLER, 2019). Consequentemente, a descoberta de agentes anti-infecciosos ativos contra microrganismos planctônicos e biofilmes é de grande importância para a saúde pública. Nesse estudo revelaram que a temporina-PTa não reduz a formação de biofilme, enquanto seus análogos temphylarata-1 e -2 são promissores peptídeos anti-biofilme com atividade contra infecção e formação de *A. baumannii*, *E. coli* e *K. pneumoniae* reduzindo a formação em 100% de biofilme. Os resultados mostrados por GRASSI et al., (2017) peptídeos semelhantes à temporina B tiveram uma diminuição de até 16 vezes no valor do CIMB em bactérias Gram-negativas.

Os mecanismos de ação dos PAMs contra parasitas são similares aos encontrados contra bactérias e fungos. Comumente estes peptídeos se ligam à membrana citoplasmática causando sua lise, mas há descrições de alguns peptídeos que entram no ambiente intracelular, sem causar dano a bicamada lipídica, e atingem organelas prejudicando o funcionamento do protozoário (TORRENT et al., 2012). Vários estudos demonstraram a ação antiparasitária de PAMs contra o protozoário *T. cruzi*, sendo que muitos destes peptídeos são isolados da secreção cutânea de anuros, como a magainina 2 e alguns de seus análogos encontrados em *Xenopus laevis*, a temporina (T-SHd) isolada de *P. Sahari* que inibiu o significativamente o crescimento de *T. brucei* e *T. cruzi* (ANGÉLIQUE et al., 2015; MAHALKA; KINNUNEN, 2009). Os compostos com valores iguais ou superior a 2 são considerados seletivos (SUFFNESS., 1990). As modificações feitas nos peptídeos não tonou eles seletivos frente a células de *T. cruzi*. O peptídeo parental foi o mais próximo de chegar a 2 no índice de seletividade.

A abordagem *in silico* faz previsões do comportamento estrutural e sobre o modo de ação dos peptídeos. Com relação à o comportamento dos peptídeos em diferentes ambientes. Foi possível observar que a temporina-PTa não tem estabilidade estrutural em água isso por ter aminoácidos hidrofóbicos, isso pode ser favorável para interações com a membranas miméticas. Observando na a (Figura 13A) o peptídeo

perde sua conformação para interagir com os fofolipídeos da membrana aniônica, que corrobora com os estudos *in vitro*.

Em contra partida os análogos permanecem com suas estruturas helecoidais em todos os ambientes e isso favorece a interação dos resíduos com os fofolipídeos. O temphylarata-1 e -2 fazem interações com as membranas com os aminoácidos Ala e Lis e os resíduos modificados do parental foram os que se interagiu com as membranas e deixaram os peptídeos estáveis em relação água-membrana diferente do parental. Então com isso os resultados mostram que a melhoria da anfipaticidade deixa os peptídeos estáveis e melhora as atividades biológicas frente a patógenos que causam infecções (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001; JURETIĆ; SIMUNIĆ, 2019).

Em contraste, as estruturas tridimensionais desses peptídeos foram melhor estabilizadas nos ambientes hidrofóbicos. Além disso, experimentos já mostraram que em micelas de SDS os peptídeos da classe temporina apresentam estrutura helicoidal (ROSENFELD et al., 2006; Z et al., 2017). Estudos de DM realizado com temporina A, código PDB 2MAA, verificou que sua interação com micela de SDS é realizada de forma paralela à superfície da micela sugerindo um mecanismo de interação pelo modelo carpete (CAROTENUTO et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

A compreensão da estabilidade estrutural e preferências conformacionais das temphylarata-1 e -2 em nível molecular em diversos ambientes, principalmente aqueles que mimetizam as membranas biológicas (hidrofóbico), iniciou os avanços na concepção de novos peptídeos bioativos, que em um futuro próximo podem servir como candidatos no desenvolvimento de medicamentos e terapias mais eficientes no combate a microrganismos patogênicos. Os peptídeos análogos temphylarata-1 e -2 demonstraram conformações tridimensionais dependentes do ambiente, isso foi comprovado tanto *in vitro* quanto *in silico*.

Em resumo, foi possível concluir que, por meio de desenho, peptídeos com motivos funcionais de anuros podem servir como arcabouços no desenvolvimento de peptídeos multifuncionais. Aparentemente a hidrofobicidade orienta as atividades

bioativas e a carga tem um papel importante em potencializar estas atividades vistas nos peptídeos análogos. De acordo com os estudos realizados *in vitro* e *in silico*, os peptídeos possuem grande chance da predominância da estrutura secundária α -hélice. Todos os peptídeos tiveram atividade antiparasitária mas não foram seletivos frente a células de mamíferos e protozoário. Por fim, os peptídeos são excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos modificados usando a biotecnologia

7. BIBLIOGRAFIA

ABBASSI, F. et al. Temporin-SHf, a new type of Phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16880–16892, 28 maio 2010.

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.

AHMED, A. et al. **Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections**VirusesMDPI AG, , 1 ago. 2019.

ANGÉLIQUE, L. et al. **The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases**MoleculesMDPI AG, , 1 ago. 2015.

ANNETT ROZEK, § et al. Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability†,‡. 2003.

AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 8, p. 1055–1081, ago. 2013.

ARNAL, A. et al. **Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017**PLoS Neglected Tropical DiseasesPublic Library of Science, , 2019a.

ARNAL, A. et al. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e0006859, 9 abr. 2019b.

AVITABILE, C. et al. Design, structural and functional characterization of a Temporin-1b analog active against Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3767–3775, jun. 2013.

AVORN, J. The \$2.6 Billion Pill — Methodologic and Policy Considerations. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 20, p. 1877–1879, maio 2015.

BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176–182, 2006.

BARROS, M. P. DE. **Venenos como fonte de moléculas ativas contra biofilmes bacterianos patogênicos**. [s.l: s.n.].

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, 1 set. 2006.

BERN, C. **Chagas' disease** **New England Journal of Medicine** Massachusetts Medical Society, , 30 jul. 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, mar. 2010.

CAROTENUTO, A. et al. A different molecular mechanism underlying antimicrobial and hemolytic actions of temporins A and L. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2354–2362, 2008.

CARRASCO, R. et al. Prevalence of Trypanosoma cruzi infection in blood banks of seven departments of Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 69–73, 1990.

CLARKE, B. T. THE NATURAL HISTORY OF AMPHIBIAN SKIN SECRETIONS, THEIR NORMAL FUNCTIONING AND POTENTIAL MEDICAL APPLICATIONS. **Biological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 365–379, jan. 2007.

CONLON, J. M. Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1815–1819, out. 2008a.

CONLON, J. M. Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1815–1819, 1 out. 2008b.

CUCUNUBÁ, Z. M. et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 42, 27 dez. 2016.

CUMMINS, J. et al. Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in Pseudomonas aeruginosa. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 2826–2837, set. 2009.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for

Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, jun. 1993a.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993b.

DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Letters**, v. 403, n. 2, p. 208–212, 17 fev. 1997.

DAVIDCHACK, R. L.; OULDRIDGE, T. E.; TRETYAKOV, M. V. New Langevin and gradient thermostats for rigid body dynamics. **The Journal of Chemical Physics**, v. 142, n. 14, p. 144114, 14 abr. 2015.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. **Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction** *International Journal of Cell Biology*, 2010.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 1997.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do trypanosoma cruzi no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 68–72, 2011.

DNDi América Latina. Disponível em: <<https://www.dndial.org/>>. Acesso em: 29 mar. 2020.

DRAGO, L. [Epidemiology and mechanisms of resistance: clinical and environmental impact]. **Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 15 Suppl 2, p. 6–12, set. 2007.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1973.

FERNANDES, P. A. et al. Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números, 2015. **Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números, 2015**, p. 6–42, 2016.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. **Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases** *The Lancet Infectious Diseases* Lancet Publishing Group, , 1 fev. 2019.

FRIEDRICH, A. W. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 169, n. Suppl 1, p. 25–

30, 1 fev. 2019.

GAISER, R. A. et al. Selection of antimicrobial frog peptides and temporin-1 <scp>DR</scp> a analogs for treatment of bacterial infections based on their cytotoxicity and differential activity against pathogens. **Chemical Biology & Drug Design**, p. cbdd.13569, 18 maio 2019.

GANZ, T. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 4, p. 1427–1435, 1985.

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.

GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Two-dimensional ^1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 9, n. 2, p. 127–135, 1997.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.

GRASSI, L. et al. Analogs of the Frog-skin Antimicrobial Peptide Temporin 1Tb Exhibit a Wider Spectrum of Activity and a Stronger Antibiofilm Potential as Compared to the Parental Peptide. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 24, 11 abr. 2017.

HABERMEHL, G. G. Amphibia (Amphibians). In: **Venomous Animals and Their Toxins**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981. p. 112–129.

HALSALL, A.; DEMPSEY, C. E. Intrinsic helical propensities and stable secondary structure in a membrane-bound fragment (S4) of the Shaker potassium channel. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 4, p. 901–915, 5 nov. 1999.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: [s.l: s.n.]. p. 3–22.

HASSAN, K. A. et al. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 50, p. 20254–9, 10 dez. 2013.

HASSAN, K. A. et al. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. **mBio**, v. 6, n. 1, 10 fev. 2015.

HAWRANI, A. et al. Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active

antimicrobial amphipathic helical peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18636–18645, 4 jul. 2008.

HIGGINS, D. G.; SHARP, P. M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 73, n. 1, p. 237–244, 15 dez. 1988.

HÖGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 11, p. 509–515, 2010.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HRISTOVA, K.; DEMPSEY, C. E.; WHITE, S. H. Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 801–811, 2001.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. Anfíbios: biologia e venenos. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, p. 317–330, 2009.

JIA, B. Y. et al. High cell selectivity and bactericidal mechanism of symmetric peptides centered on d-pro–gly pairs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 1 fev. 2020.

JIANG, Z. et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 90, n. 3, p. 369–383, 2008.

JO, S. et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. **Biophysical journal**, v. 97, n. 1, p. 50–8, 8 jul. 2009.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

JURETIĆ, D.; SIMUNIĆ, J. **Design of α -helical antimicrobial peptides with a high selectivity index** *Expert Opinion on Drug Discovery* Taylor and Francis Ltd, , 3 out. 2019.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1603–1658, 8 out. 2016.

KIM, J.-Y. et al. Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 3, p. 921–927, 13 maio 2005.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. **The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides***Trends in Pharmacological Sciences*Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 96–117, 2015.

KUMAR, A. et al. **Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens***International Journal of Medical Microbiology*Elsevier GmbH, , 1 dez. 2017.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 6566–6596, out. 2011.

LISCANO, Y. et al. Increases in hydrophilicity and charge on the polar face of alyteserin 1c helix change its selectivity towards gram-positive bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, 1 dez. 2019.

LOPES, P. S. **CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA-UNICEUB FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE-FACES CURSO: BACHARELADO EM BIOMEDICINA QUORUM SENSING, FORMAÇÃO DO BIOFILME E A LIGAÇÃO DIRETA COM A RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS**. [s.l: s.n.].

LUISA MANGONI, M. et al. Naturally Occurring Peptides from *Rana temporaria*: Antimicrobial Properties and More. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 54–64, 18 set. 2015.

MAHALKA, A. K.; KINNUNEN, P. K. J. **Binding of amphipathic α -helical antimicrobial peptides to lipid membranes: Lessons from temporins B and L***Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*Elsevier, , 1 ago. 2009.

MANGONI, M. L. **Temporins, anti-infective peptides with expanding properties***Cellular and Molecular Life Sciences*Springer, , 31 maio 2006.

MARSHALL, G. R. Introduction to Chemoinformatics in Drug Discovery – A Personal View. **Discovery**, v. 23, p. 1–22, 2004.

MISHRA, B.; WANG, G. Ab initio design of potent anti-MRSA peptides based on database filtering technology. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 30, p. 12426–12429, 2012.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.

MOLCHANOVA, N.; HANSEN, P. R.; FRANZYK, H. **Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs***Molecules*MDPI AG, , 1 set. 2017.

MOOKHERJEE, N. et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 1–22, 27 fev. 2020.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, p. 382–384, 1 jan. 1960.

NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 11 fev. 2015.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 5. ed. Cambridge: November, 2013.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, dez. 2013.

PEIXOTO CERA, T.; GARCEL PANCOTE, C. Planejamento de Fármacos. **Revista Científica Unilago**, v. 1, p. 137-1, 2013.

PEREIRA, C. M. L. et al. Perfil clínico e epidemiológico da doença de chagas aguda no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira Ciências da Saúde - USCS**, v. 15, n. 52, abr. 2017.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. **Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds** *Frontiers in Pharmacology* Frontiers Media S.A., , 28 mar. 2018.

POLANCO, C. et al. Characterization of Selective Antibacterial Peptides by Polarity Index. **International Journal of Peptides**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

POMPILIO, A.; CROCETTA, V. Anti-biofilm activity of natural and designed alpha-helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. **BMC ...**, v. 12, n. 1, p. 145, jan. 2012.

RAJA, Z. et al. Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017.

ROCA, I. et al. **The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention** *New Microbes and New Infections* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2015.

ROCCATANO, D. et al. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12179–84, 17 set. 2002.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541–561, dez. 2012.

ROSCIA, G. et al. The Development of Antimicrobial Peptides as New Antibacterial Drugs. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, p. 641–649, 2013.

ROSENFELD, Y. et al. A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 28565–28574, 29 set. 2006.

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

SHANG, D. et al. Design of Potent, Non-Toxic Antimicrobial Agents Based upon the Structure of the Frog Skin Peptide, Temporin-1CEb from Chinese Brown Frog, *Rana chensinensis*. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 79, n. 5, p. 653–662, maio 2012.

SILVA, VINICIUS B. DA; SILVA, C. H. T. P. Modelagem Molecular De Proteínas-Alvo Por Homologia Estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, n. 1, p. 15–26, 2007.

SILVA, G. G. E; AVIZ, G. B. DE; MONTEIRO, R. C. Perfil epidemiológico da Doença de Chagas aguda no Pará entre 2010 e 2017. **Pará Research Medical Journal**, v. 4, p. 0–0, 21 jan. 2019.

SIMMACO, M. et al. Purification and characterization of bioactive peptides from skin extracts of *Rana esculenta*. **BBA - General Subjects**, v. 1033, n. 3, p. 318–323, 26 mar. 1990.

SIMMACO, M. et al. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, n. 3, p. 788–792, 1996.

SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1551–1555, 2009.

SIMONETTI, O. et al. Temporin A is effective in MRSA-infected wounds through bactericidal activity and acceleration of wound repair in a murine model. **Peptides**, v. 29, n. 4, p. 520–528, abr. 2008.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. **Biofilm dispersion and quorum sensing** *Current Opinion in Microbiology* Elsevier Ltd, , 2014.

STEINER, H. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246–248, 1 jul. 1981.

SUFFNESS; M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry : Assays for Bioactivity**, v. 6, p. 71–133, 1990.

TAKAHASHI, D. et al. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial

activity and target cell selectivity. 2010.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 2012.

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 1 abr. 2015.

TORRENT, M. et al. Antimicrobial Peptide Action on Parasites. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 1138–1147, 25 jul. 2012.

TYLER, M. J.; STONE, D. J. M.; BOWIE, J. H. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 28, n. 4, p. 199–200, 1992.

URSO, C. D.; MENDES, D. E. S. **VISÃO DE FUTURO PARA A PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS: TENDÊNCIAS DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO**. [s.l.] UFRJ, 2014.

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, abr. 2015.

VACCA, I. **Biofilms: Building up the matrix** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

VALENZUELA, J. G.; AKSOY, S. **Impact of vector biology research on old and emerging neglected tropical diseases** *PLoS Neglected Tropical Diseases* Public Library of Science, , 31 maio 2018.

VARGAS, A. et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saude Publica**, v. 34, n. 1, 2018.

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, ago. 2015.

WALSH, C. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance** *Nature*, 17 ago. 2000.

WANG, G. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**. [s.l.] Cabi, 2010. v. 18

WANG, G.; GUANGSHUN. Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 728–758, maio 2013.

WANG, G.; LI, X.; ZHE WANG. **APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702905/>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

WATTS, C. Neglected tropical diseases: A DFID perspective. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 20 abr. 2017.

WAYNE. M11-A8 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Eighth Edition. 2012.

WEI, S. et al. Studies on the Metabolism of Retinol and Retinol-Binding Protein (RBP) in Transthyretin-Lacking Mice Produced by Homologous Recombination. In: [s.l: s.n.]. p. 245–245.

WHO. **Prevention of hospital-acquired infections A practical guide 2nd edition.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/emc>>. Acesso em: 29 mar. 2020.

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. Web Server issue, p. W407-10, jul. 2007.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. **The Journal of Membrane Biology**, v. 239, n. 1–2, p. 27–34, jan. 2011.

WIRADHARMA, N. et al. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2204–2212, 1 mar. 2011.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 29 jul. 2005.

XIANG, M. et al. Computer-Aided Drug Design: Lead Discovery and Optimization. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 15, n. 4, p. 328–337, maio 2012.

YAN, J.; BASSLER, B. L. **Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms** Cell Host and Microbe Cell Press, , 10 jul. 2019.

Z, D. et al. Molecular Cloning and Characterization of Antimicrobial Peptides From Skin of *Hylarana Guentheri*. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 49, n. 5, 2017.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

ZHANG, S. K. et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. **Scientific Reports**, v. 6, 8 jun. 2016.