

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)



Atena
Editora
Ano 2019

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Lorena Prestes
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.ª Dr.ª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P966	Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas [recurso eletrônico] : uma visão biotecnológica / Organizadores Regina Meneses Gonçalves, Breno Emanuel Farias Frihling, Ludovico Migliolo. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-575-4 DOI 10.22533/at.ed.754190209 1. Bioquímica. 2. Biotecnologia. 3. Microbiologia. I. Gonçalves, Regina Menesas. II. Frihling, Emanuel Farias. III. Migliolo, Ludovico. CDD 660.6
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra intitulada “*Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica*” consiste em uma coletânea de artigos científicos apresentados em 9 capítulos, com enfoque em biotecnologia. Na mesma, foram expostos conhecimentos sobre bioquímica, microbiologia e bioinformática, com estudos em diferentes espécies, abrangendo a biodiversidade brasileira.

Na biotecnologia, os campos de estudos são muito amplos e englobam pesquisas complexas envolvendo microrganismos, plantas e animais. Desta forma, a obra apresenta pesquisas sobre moléculas bioativas derivadas de aracnídeos, insetos, répteis, anfíbios e plantas. Essas moléculas bioativas apresentam uma gama de atividades biológicas, e algumas dessas, com potencial antimicrobiano, inibidores de peptidases, entre outras, foram apresentadas no decorrer da obra.

Ademais, moléculas protéicas bioativas provenientes de fontes naturais, podem ter sua sequências primárias caracterizadas e modificada por meio da bioinformática (metodologia de desenho racional), que busca melhorar seu potencial terapêutico *in vitro* partindo de estudos *in silico*.

As informações geradas nesta obra são de extrema relevância em nível acadêmico, pois mostra pesquisas básicas avançando para pesquisas aplicadas, o que proporciona o enriquecimento da comunidade científica e formação profissional de alunos de graduação e pós graduação.

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DE PERFIL PROTEICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA HEMOLINFA DA ARANHA <i>Nhandu carapoensis</i>	
Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Patrícia Souza e Silva Alexya Sandim Guindo Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902091	
CAPÍTULO 2	17
CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE <i>Tityus confluens</i>	
Regina Meneses Gonçalves Danieli Fernanda Buccini Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902092	
CAPÍTULO 3	30
AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE LARVAS NECRÓFAGAS <i>Chrysomya albiceps</i> (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) INIBIDORAS DE BIOFILME DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	
Patrícia Souza e Silva Regina Meneses Gonçalves Daniela Lopes Da Cunha Lucas Rodrigues de Lima Carina Elisei De Oliveira Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902093	
CAPÍTULO 4	41
EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS PRESENTE EM LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i> (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE) COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME	
Patrícia Souza e Silva Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Elizangela de Barros Ana Paula de Araújo Boleti Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902094	
CAPÍTULO 5	51
DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS A TOXINA DO ESCORPIÃO <i>Tityus sp.</i>	
Lucas Bianchi Nunes Taylla Michelle de Oliveira Flores Patricia Souza e Silva Elizangela de Barros Marlon Henrique Cardoso Octávio Luiz Franco Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902095	

CAPÍTULO 6	71
AVALIAÇÃO E SELEÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DA SERPENTE <i>Bothrops jararacussu</i>	
Odaias Pereira de Almeida Filho	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Michel Ângelo Constantino de Oliveira	
Gilberto Astolfi	
Hemerson Pistori	
Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902096	
CAPÍTULO 7	81
ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE <i>Bothrops erythromelas</i>	
Ellynes Amancio Correia Nunes	
Renner de Souza Leite	
Álisson Emannuel Franco Alves	
Ludovico Migliolo	
Karla Patrícia de Oliveira Luna	
DOI 10.22533/at.ed.7541902097	
CAPÍTULO 8	96
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Rhinella schneideri</i> , <i>Dermatonotus muelleri</i> , <i>Physalaemus nattereri</i> e <i>Trachycephalus typhonius</i>	
Alexya Sandim Guindo	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes	
Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902098	
CAPÍTULO 9	110
POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i> (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)	
Taylla Michelle de Oliveira Flores	
Liliam Silvia Cândido	
Ludovico Migliolo	
Jannaina Velasques da Costa Pinto	
DOI 10.22533/at.ed.7541902099	
SOBRE OS ORGANIZADORES.....	118

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

Lucas Bianchi Nunes

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Taylla Michelle de Oliveira Flores

(Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular
Universidade Federal da Paraíba João
Pessoa-PB)

Patricia Souza e Silva

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Elizangela de Barros

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Marlon Henrique Cardoso

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Octávio Luiz Franco

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

RESUMO: Atualmente, as infecções bacterianas têm sido preocupação de governos e alvo de estudos, pois este é um problema em todo o mundo. As pessoas que mais sofrem são aquelas imunossuprimidas, sendo afetadas por super bactérias como *Enterococcus*

faecalis e *Escherichia coli* que provocam graves danos à saúde. Com o avanço da tecnologia e a prospecção de novas drogas, os peptídeos antimicrobianos (PAM) são candidatos a combater esses microrganismos e curar pessoas. Em relação aos resultados *in silico*, os peptídeos Butylatus apresentaram características de peptídeos antimicrobianos, baixa energia de interação nas membranas miméticas, boa estabilidade estrutural na membrana. Além disso, a atividade *in vitro* observada foi que o peptídeo apresenta atividade antimicrobiana e baixa atividade hemolítica. A partir desses resultados, é possível considerar o peptídeo TsAp-1 como candidato a produtos biotecnológicos de interesse para a indústria farmacêutica e hospitalar.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias patogênicas; Peptídeos antimicrobianos; Estudo *in silico*.

ABSTRACT: Currently, bacterial infections have been targeted by governments and study targets, as this is a problem around the world. People who are most immunosuppressed are affected by supercommissions such as *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* that cause serious damage to health. The antimicrobial peptides (PAM) are candidates to combat these microorganisms and heal people. Regarding the *in silico* results, the peptides butylatus the characteristics of antimicrobial peptides,

low interaction energy in the mimetic membranes, good structural reassembly in the membrane. In addition, the *in vitro* activity showed that the peptide showed antimicrobial activity and low hemolytic activity. In order to obtain results, it is possible to consider the peptide TsAp-1 as a biotechnological product of interest for a pharmaceutical and hospital industry.

KEYWORDS: Pathogenic bacteria; Antimicrobial peptides; *In silico* study.

1 | INTRODUÇÃO

1.1 O Combate À Infecções e o Surgimento Das Resistências aos Antibióticos

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



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

Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho). Fonte: (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2016) (ADAPTADO).

Visando obter novas ferramentas para tratamento de infecções bacterianas, Peptídeos Antimicrobianos (PAM) aparecem como uma alternativa proveitosa. Os

PAMs são peptídeos que exercem atividade bacteriostática, bactericida, lise celular, prevenção do biofilme, entre outras, nas quais podem ser usadas contra a infecção bacteriana (HARRISON et al., 2014).

A interação dos PAM se dá nas membranas destes organismos, interagindo com a membrana externa das bactérias. Após o PAM se fixar na membrana inicia-se a desestabilização da parede microbiana por meio da formação de poros ou a atividade de enfraquecimento da membrana. As formas de atuação dos peptídeos na membrana bacteriana foi estudada ao longo do tempo e elucidadas várias maneiras de interação, como demonstra a Figura 2 (CALISKAN et al., 2013a; TARAZI, 2015). Contudo, Powers e Hancock (2003), apresentam que a capacidade antimicrobiana dos peptídeos se dá pela combinação de cationicidade, hidrofobicidade, formação de estrutura secundária, anfipaticidade, conformação, hidrofobicidade e ângulo polar. Para promover a ação antimicrobiana descrita, o PAM interage com a membrana da célula alvo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Para tanto, características estruturais e eletrostáticas precisam ser consideradas pois a mudança em alguma característica do peptídeo acarreta mudanças no corpo e atividade do peptídeo (POWERS; HANCOCK, 2003).

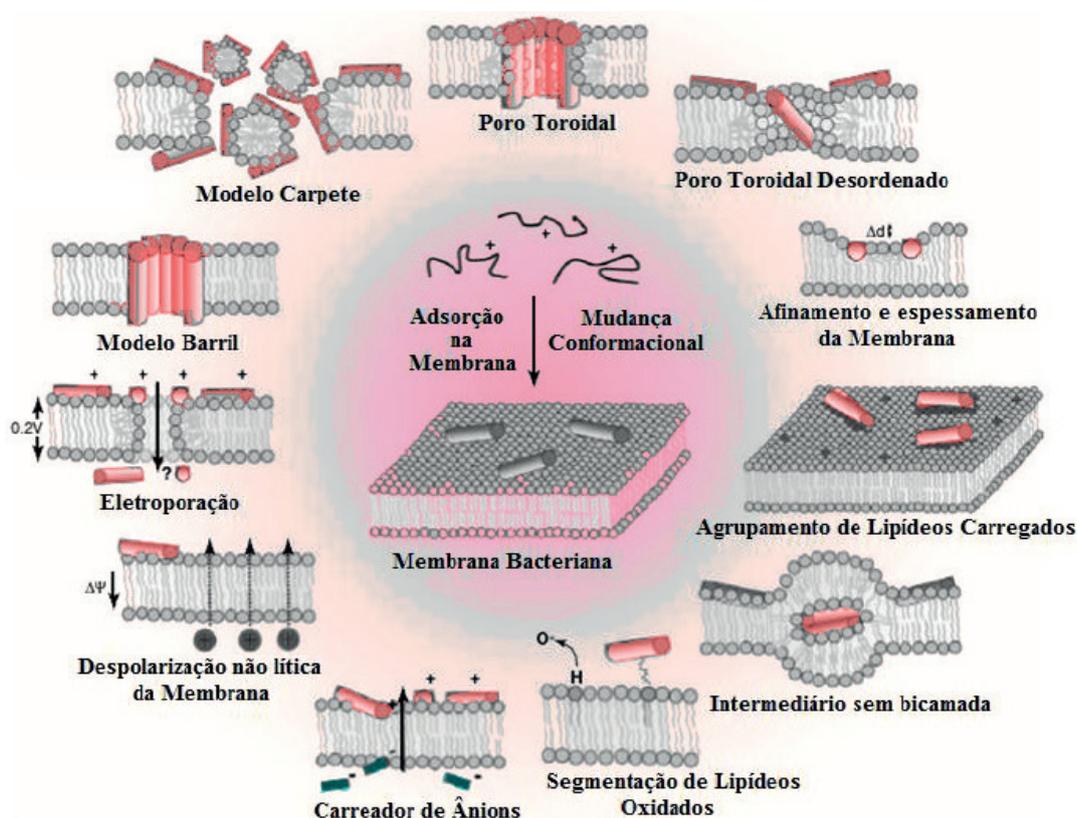


Figura 2 - Mecanismos de ação de PAMs na membrana bacteriana. Padrões clássicos de ruptura de membrana, os peptídeos se encontram com a membrana interagindo de maneira a formar um limiar de concentração e penetrar-se em toda membrana formando poros no modelo Barril, solubilizar a membrana em estruturas de micelas no modelo tapete ou formar poros peptídeo-lipídeo como é o padrão poro toroidal. No modelo de poro toroidal desordenado, a formação de poros é, de certa forma, aleatória e envolve um número menor de peptídeos. A espessura da bicamada de fosfolipídios pode ser perturbada pela existência de peptídeos, ou a própria membrana pode ser reconstruída de modo a formar domínios ricos em lipídeos aniônicos. Em poucos casos, a bicamada sem intermediários poder induzida; peptídeos

podem ser adsorvidos pela membrana bacteriana direcionando fosfolipídios oxidados; peptídeos podem induzir pequenos ânions por meio da bicamada, resultando no efluxo, o potencial de membrana pode ser dissipado sem outro dano aparente, ou, também podemos observar inversamente, no modelo molecular de eletroporação, a acumulação de peptídeo na monocamada externa que aumenta o potencial da membrana a um limiar que torna a membrana porosa a transitoriedade de várias moléculas, incluindo o peptídeo que causou este efeito (NGUYEN, et al., 2011) (ADAPTADO).

1.2 Disposição de Pam Na Natureza e Em Escorpiões

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

Escorpião	Peptídeo	Carga	Atividade biológica	Referencial teórico
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-1	+1	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(GUO et al., 2013)
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-2	+1	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(GUO et al., 2013)
<i>Scorpiops tibetanus</i>	SiCT1	+1	Anti-Gram+	(YUAN et al., 2010)
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-2	+1	Anti-Gram+, Gram-, antifúngico	(ZENG et al., 2013)
<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKbpp	+7	Anti-Gram+, Gram-, antifúngico, cél. Mamíferos	(XU et al., 2014)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP1	+2	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(DU et al., 2015)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP2	+2	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(DU et al., 2015)
<i>Tityus discrepans</i>	Bactridine 1	+2	Anti-Gram+ e Gram-	(DÍAZ et al., 2009)
<i>Tityus stigmurus</i>	Stigmurin	+1	Anti-Gram+, antifúngico, cél. de mamíferos, antitumoral	(DE MELO et al., 2015)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT1	+2	Anti-Gram+ & Gram-	(RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT2	+2	Anti-Gram+ & Gram-, cél. Mamíferos	(RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012)
<i>Chaerilus tricostatus</i>	Ctriporin	+3	Anti-Gram+, antifúngico	(FAN et al., 2011)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1036	+1	Antiviral	(HONG et al., 2014)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1239	+1	Antiviral	(HONG et al., 2014)

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

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

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

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

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

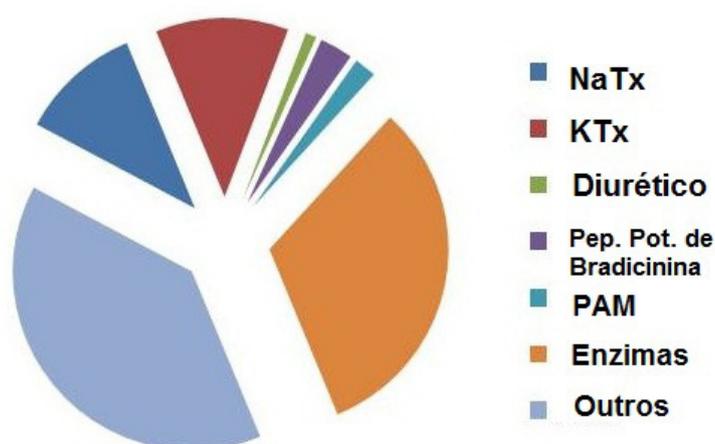


Figura 7 - Composição da peçonha de escorpiões *Tityus*.

Fonte: Venom Zone (ADAPTADO).

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

Isolando determinadas frações da toxina do escorpião *T. serrulatus*, observou-se que existem pelo menos dezenove peptídeos tóxicos, podendo ser classificados em α e β -toxinas, de acordo com a sua conformação estrutural. As mais notáveis, no entanto, são a *Tityus*Toxina1 (Ts1) caracterizada como β -neurotoxina com atividade tóxica para mamíferos e insetos ao interagir fortemente com o sítio quatro de canais de sódio; Ts2 com ação de retardo na inativação de canais de sódio, sendo uma α -neurotoxina; a Ts3 é composta por 62 resíduos de aminoácidos, massa de 7,240 kDa e ação sobre o terceiro canal de sódio induzindo a liberação de mediadores

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

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

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

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

1.3 Modelagem Molecular (MM)

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

molecular) trouxe desenvolvimento em áreas até então completamente desconhecidas (COHEN, 1996; VERLI, 2014).

2 | MATERIAL DE MÉTODOS

2.1 Desenho Racional e Predição dos Análogos do Peptídeo TsAP-1

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

Utilizou-se o servidor *Antimicrobial Peptide Database (APD)* para conhecer a porcentagem de resíduos hidrofóbicos e massa teórica do peptídeo TsAP-1 e os desenhados racionalmente. Para conhecer a similaridade entre o peptídeo molde e seus análogos foi utilizado o programa **Clustal Omega** versão 1.2.4 (SIEVERS et al., 2011) no formato com números. Para prever a atividade antimicrobiana, foi utilizado o servidor **CAMP_{R3}** (WAGHU et al., 2016) o qual utiliza banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, *UniProtKB* e *PDB* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) selecionando peptídeos com as palavras-chave: antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários considerando informações sobre a sequência, estrutura, definição proteica, atividade, taxonomia do organismo de origem e organismos alvos (WAGHU et al., 2016).

2.2 Síntese, e Quantificação do Produto

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

2.3 Análises Estruturais *In Silico*

A) Alinhamento e modelagem molecular

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

B) Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

O programa **AutoDock 4.2** foi utilizado para elucidar modos possíveis de interação entre os peptídeos desenhados racionalmente e o peptídeo controle em uma membrana mimética bacteriana Gram-negativa e Gram-positiva. As membranas foram construídas utilizando o servidor **CHARMM-GUI**, na proporção de 9:1 de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DPPG). A bicamada foi construída em uma caixa retangular, onde moléculas de água foram adicionadas, bem como neutralizando íons por métodos de substituição. A caixa da grade foi calculada com 40 × 40 × 25 pontos e espaçamento de 1,0 Å centrado na superfície da membrana. Depois disso, cinquenta quadros de encaixe foram feitos e as estruturas geradas foram classificadas de acordo com seus valores de afinidade. O programa **PyMOL** foi utilizado para visualizar as estruturas tridimensionais dos peptídeos modelados bem como as interações peptídeo-membrana respeitando a distância de 2,8 a 3,6 Å para todos os átomos ancorados com a membrana (CARDOSO et al., 2016)

2.4 Quantificação dos Peptídeos

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

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

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

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

Onde, ABS é a absorbância e C é igual à concentração do peptídeo em mg/mL

nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm. As constantes são representadas por 0,144 e 0,031.

2.5 Análise funcional *in vitro*

A) Ensaio hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo TsAP-1 e os análogos foi avaliada utilizando eritrócitos de camundongo. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A solução peptídica foi adicionada à suspensão de eritrócitos (1%, em volume), em uma concentração final variando de 256 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em um volume final de 100 μL . As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 60 min. A liberação de hemoglobina foi monitorizada medindo a absorbância do sobrenadante a 540 nm. O controle de hemólise zero (branco) foi determinado com eritrócitos suspensos na presença de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e para controle positivo (100% de lise de eritrócitos); utilizou-se uma solução de 1% (em volume) de Triton X-100 dissolvido em água milli-Q em vez da solução peptídica. Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata (CARDOSO et al., 2016).

B) Ensaios antibacterianos

Escherichia coli (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), sensíveis à meticilina foram utilizados para ensaios antimicrobianos. As espécies bacterianas foram cultivadas em 1,0 mL de *Mueller-Hinton* (MH) por 24 horas a 37°C sob agitação em tubos de ensaio. Após isto, cada peptídeo sintético foi incubado com 5 x 10⁵ UFC. mL⁻¹ de bactéria. Os controles negativos e positivos do ensaio foram bactérias em meio MH e várias diluições de ciprofloxacina, respectivamente, com volume final de 100 μL . Foi considerado atividade inibitória quando o peptídeo apresentou >90% de inibição do crescimento bacteriano quando comparado ao controle. O crescimento bacteriano foi medido em 595 μm após 24 horas de incubação na placa, realizado de acordo com os protocolos descritos pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (NCLS).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenho racional e síntese de análogos do TsAP1

Neste trabalho, o peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK) foi sintetizado quimicamente e testado contra bactérias.

Como forma de prever se o peptídeo TsAP1 apresentaria atividade antimicrobiana e prospectar sua massa foi utilizado o servidor CAMP_{R3}. Por meio de um banco de dados é possível conhecer, com grande precisão, a probabilidade da molécula apresentar

atividade antimicrobiana. Conforme análise, por meio da ferramenta “Resultados com classificador de análise discriminante”, o controle obteve 98,5% de chance de ser antimicrobiano, o que é considerado uma margem de segurança para prosseguir com os estudos, tanto para os padrões de atividade antimicrobiana como de massa, visto que é de comum acordo na comunidade científica atividade antimicrobiana prevista de no mínimo 85% (THOMAS et al., 2009; WAGHU et al., 2016).

Alinhamento e Modelagem Molecular

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

O peptídeo analisado por meio do *I-TASSER* foi alinhados com dez (10) *templates* de maior significância nos alinhamentos *LOMETS*.

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

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

Validação dos Modelos Tridimensionais

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

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

Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

O peptídeo TsAP-1 foi analisado quanto à sua interação com membranas bacterianas e estabilidade em α -hélice. Para tanto foi construída uma membrana composta de DPPE e DPPG, para simular a membrana bacteriana. O peptídeo então foi atracado contra a membrana para permitir o contato do ligante ao alvo.

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

Neste trabalho propõe-se uma nova forma de análise da avaliação estatística por meio de média e desvio padrão, ponderando que esses dados, do ponto de vista da energia de maior frequência, tem maior probabilidade de levar a um melhor entendimento da interação receptor/membrana. Para isto foram observados as

cinquenta simulações dos peptídeos com a membrana e observadas as energias de interação mais frequentes em cada simulação.

O *Docking* entre o peptídeo controle TsAP-1 e membrana aniônica (Figura 10) demonstrou média de $-5,1 \pm 0,7$ kcal/mol e energia mais frequente foi a de $-5,2$ kcal/mol. Já o *Docking* entre o peptídeo controle e membrana catiônica (Figura 11) demonstrou média de energia livre de $-3,6 \pm 0,6$ kcal/mol de energia, sendo a energia mais frequente de $-3,8$ kcal/mol.

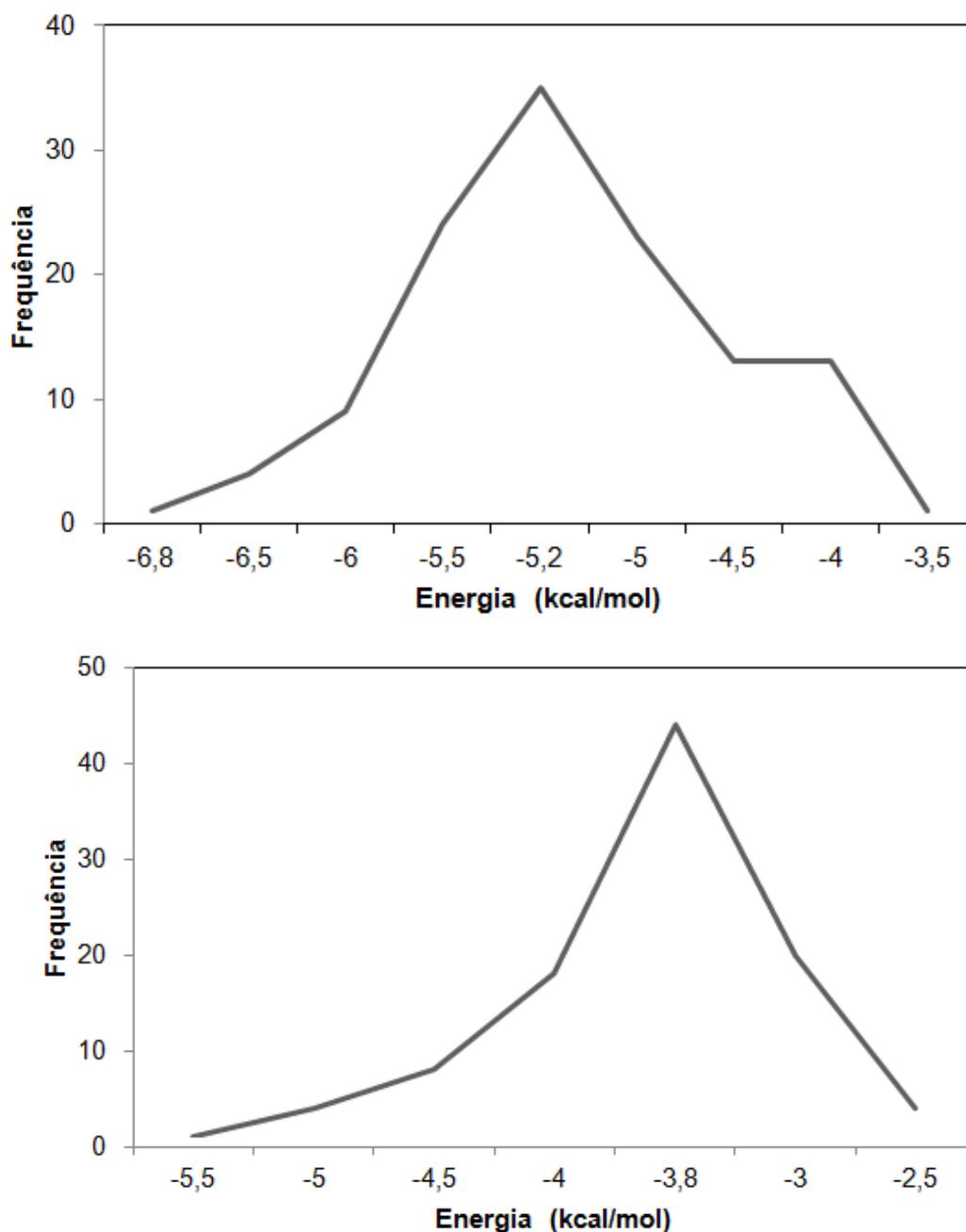


Figura 10- Interação entre o TsAP-1 e a membrana aniônica e catiônica.

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

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

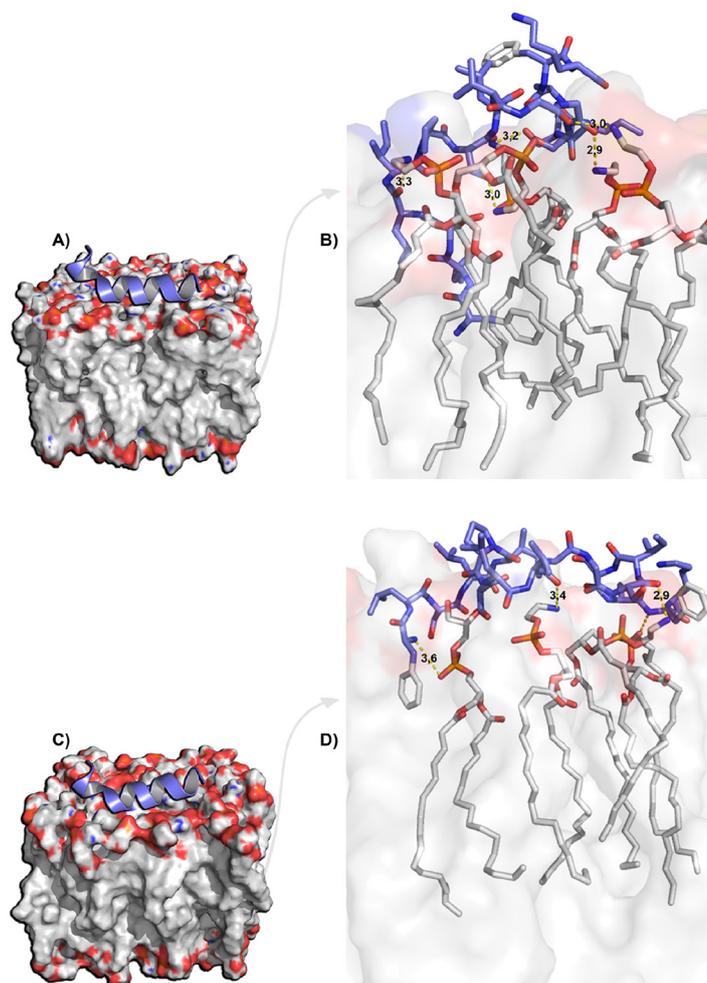


Figura 12 - Interação *in silico* entre TsAP-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

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

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

Quando analisa-se a interação entre o TsAP-1 e a membrana mimética catiônica, observa-se que seu primeiro contato foi por meio de uma Phe¹ utilizando nitrogênios (O14) em fosfolipídios (DPPG⁵) com distância de 3,6 Å, respectivamente. Além disso, a

Val⁶ e a Ser¹² ligaram-se aos fosfolipídios DPPE⁷ e DPPE⁶, por ligações de hidrogênio, em distancias de 3,4 e 2,9 Å, respectivamente. As interações e distancias do *Docking* podem ser visualizadas na Tabela 5.

	Resíduo	Átomo	Distancia (Å)	Fosfolipídio*	Átomo**	Interação
TsAP-1 (G-)	Gly-10	O	3,0	DPPE-8	N	LH
	Gly-11	O	3,0	DPPG-4	N	LH
	Ser-14	O _γ	3,2	DPPG-1	N	LH
	Ser-7	O _γ	2,7	DPPE-2	N	LH
	Leu-4	O	3,3	DPPE-7	N	LH

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

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

*Posição do fosfolipídio.

**Átomo do fosfolipídio que fez a interação.

Síntese dos Peptídeos

O TsAP-1 foi sintetizado pela empresa Aminotech. O peptídeo foi sintetizado para realização dos testes antimicrobianos e hemolítico. A confirmação das purezas e massas moleculares observadas para os peptídeos controle determinada por MALDI-ToF, que apresentara valor experimental de 1736,1. Valor este que corresponde à predição dos programas de bioinformática.

Bioensaios Com Bactérias

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

	TsAP-1*	TsAP-1**
<i>E. coli</i>	160	147,5
<i>E. faecalis</i>	160	147,5
Hematócrito	160	147,5

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

Valores em µM

*Peptídeo purificado (GUO et al., 2013)

**Peptídeo sintético

4 | CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apartir das análises dos resultados obtidos por meio de métodos de bioinformática, considerando o comportamento físico-químico do peptídeo sintetizado e sua relação com as atividades *in vitro* é possível afirmar que este peptídeo estudado é candidato a futuros produtos antibacterianos, considerando a técnica de bioinformática para prospecção de moléculas antibacterianas.

REFERÊNCIAS

ALMAAYTAH, A. et al. **Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion androctonus mauritanicus.** International Journal of Peptide Research and Therapeutics, v. 19, n. 4, p. 281–293, 2013.

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

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

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

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

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

CARLSSON, J.; BOUKHARTA, L.; AQVIST, J. **Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase.** J Med Chem, v. 51, n. 9, p. 2648–56, 2008.

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

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. **Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells.** Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HAYES, J. M. et al. **Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined**. *J Med Chem*, v. 51, n. January, p. 703–719, 2018.

HEINEN, T. E. et al. **Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and**

viability of cell lines. Cytotechnology, v. 66, n. 1, p. 63–74, 2014.

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

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

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

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

KUFAREVA, Irina; ABAGYAN, Ruben. Methods of protein structure comparison. In: Homology Modeling. Humana Press, 2011. p. 231-257.

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front. Biosci*, v. 21, p. 1341-1371, 2016.

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

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock-14^a Edição*. Artmed Editora, 2016.

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

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

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

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

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

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

PERUMAL SAMY, R. et al. **Animal venoms as antimicrobial agents.**

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

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

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

- RATES, B. et al. **Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity.** *Toxicon*, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: **A unified platform for automated protein structure and function prediction.** *Nature Protocols*, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.
- ROZEK, A. et al. **Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability.** *Biochemistry*, v. 42, n. 48, p. 14130–14138, 2003.
- SADREDINAMIN, M. et al. **Antimicrobial Peptides (AMPs).** *Novelty in Biomedicine*, v. 4, p. 70–76, 2016.
- SAROJINI, V. **Peptides: From Emil Fischer to Psa.** *Chemistry in New Zealand*, v. 1142, n. July, p. 79–86, 2013.
- SCHAFFERHANS, A.; KLEBE, G. **Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling.** *Journal of Molecular Biology*, v. 307, n. 1, p. 407–427, 2001.
- SEO, M.-D. et al. **Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review.** *Molecules*, v. 17, n. 12, p. 12276–12286, 2012.
- SHEN, Y. et al. **TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts.** *Journal of biomolecular NMR*, v. 44, n. 4, p. 213–23, 23 ago. 2009.
- SIEVERS, F. et al. **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.** *Molecular Systems Biology*, v. 7, n. 539, 2011.
- TARAZI, S. **Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article.** *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, p. 1–9, 2015.
- THOMAS, S. et al. **CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides.** *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. SUPPL.1, p. 774–780, 2009.
- USACHEV, K. S. et al. **High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles.** *Journal of Biomolecular NMR*, v. 61, n. 3–4, p. 227–234, 2015.
- VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. **Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.
- VAN HOEK, M. L. **Antimicrobial peptides in reptiles.** *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 6, p. 723–753, 2014.
- VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.**
- VIANNA, J. S. et al. **Drug Resistance in *Helicobacter Pylori*.** *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 53, n. 4, p. 215–223, 2016.
- VRIENS, K. et al. **Synergistic Activity of the Plant Defensin HsAFP1 and Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms and Planktonic Cultures.** *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0132701, 6 ago. 2015.
- WAGHU, F. H. et al. **CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides.** *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.
- WANG, G. **Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs.**

Pharmaceuticals, v. 6, n. 6, p. 728–758, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

SOBRE OS ORGANIZADORES

REGINA MENESES GONÇALVES é graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Católica Dom Bosco (2017) e mestranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. Atualmente, seu foco de pesquisa é avaliação de peptídeos antimicrobianos frente a bactérias patogênicas humanas e animais, com intuito do desenvolvimento de novas terapias.

BRENO EMANUEL FARIAS FRIHLING - Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, tem experiência na área de manejo de animais de laboratório convencionais (ratos e camundongos) e não-convencionais (serpentes), manejo de animais silvestres, captura e manejo de pequenos mamíferos, educação ambiental e técnicas clássicas de purificação. Atualmente trabalha com caracterização bioquímica e bioprospecção de moléculas bioativas presentes nas toxinas de serpentes da região do estado de Mato Grosso do Sul. Além disso, participa de projetos com ênfase na análise de águas com a identificação de fármacos presentes em amostras naturais, rurais e urbanas.

LUDOVICO MIGLIOLO é graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado E Licenciatura) pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2005 e 2006). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2008) e Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia pela Universidade Católica de Brasília (2012), com período sanduíche em *The University of Queensland* (Austrália). Atuou como pós doutor bolsista PNPD CAPES na área de Biotecnologia durante 2 anos na Universidade Católica de Brasília, na bioprospecção e síntese de peptídeos bioativos para o desenvolvimento de novas terapias. Atualmente é professor de graduação e pós graduação além de ser pesquisador nível 2 na área de Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul. Tem experiência na área de Bioquímica, Biofísica e Bioinformática com ênfase em Purificação de Proteínas e Peptídeos Naturais e Sintéticos, Modelagem Molecular de Estruturas Proteicas e Peptídeos, Estudos de Interação Proteína-Proteína, Peptídeo-Proteína, Peptídeo-DNA, Peptídeo-Membranas Biológicas, Estudos com Dicroísmo Circular e Espectrometria de Massa. Além disso, atua na área de desenho racional de peptídeos bioativos análogos de toxinas de serpente, escorpião, anuros, aranhas e insetos. Aplicação destas metodologias nos seguintes temas: defesa de plantas, peptídeos antimicrobianos, imunomoduladores, anticongelantes e análises proteômicas animais, vegetais e de microrganismos.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-575-4

