



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-
PONTXDq3a SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.**

FORTALEZA

2023

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-
PONTXDq3a SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Biologia para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S582a Silva Júnior, Pedro Nonato da.
Ação antimicrobiana de análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a sobre cepas de *Staphylococcus aureus* / Pedro Nonato da Silva Júnior. – 2023.
54 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

1. Peptídeos Antimicrobianos. 2. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina. 3. *Dinoponera quadriceps*. I. Título.

CDD 615

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-
PONTXDq3a SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Aprovada em: 20/03/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Clarissa Perdigão Mello
Fundação Oswaldo Cruz – CE (FIOCRUZ)

Profa. Dra. Aline Diogo Marinho
Centro Universitário Inta – UNINTA

“Somente aqueles que sofreram por muito tempo conseguem ver a luz através das sombras.”

- Roronoa Zoro, One Piece.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria das Dôres e Pedro Nonato, por serem meu alicerce e sempre tomarem minha educação como prioridade. Por renunciarem aos seus planos e sonhos em prol do meu futuro e bem-estar, e por me amarem acima de qualquer diferença que viermos a ter.

À minha orientadora, Professora Alice Maria por ter me acolhido e incentivado nesse ramo de pesquisa. Pelos conselhos, ensinamentos e amparos durante essa caminhada do mestrado.

Ao meu coorientador, Professor Tiago Sampaio, que me acompanha desde a graduação, por ter acreditado no meu potencial e sempre me socorrer nos momentos mais desesperadores que a pesquisa pôde proporcionar.

A todos meus queridos amigos do LBFBC, pelo companheirismo, brincadeiras, lágrimas e raivas compartilhadas durante esse percurso do mestrado. Em especial pros meus amigos Brenna, Emanuel, Helaynne, Lyanna, Igor e Stephanie.

Às agências de fomento CAPES e FUNCAP pelos meses de bolsa concedidos e financiamentos para que a pesquisa não parasse em nenhum momento.

E por último e não menos importante, ao melhor amigo William Crisóstomo, por ter me acompanhado de perto nesse processo de escrita, ter tido paciência pra lidar comigo nos mais diversos estados de espírito, ter sido a palavra de incentivo e a minha sanidade. Por me fazer acreditar na felicidade e me lembrar que eu mereço isso, assim como todas as pessoas merecem ser amadas e bem-quistas.

Agradeço a todos vocês que acreditaram em mim e possibilitaram eu estar vivendo meus sonhos.

RESUMO

A crescente incidência de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) está associada ao aumento das taxas de mortalidade, gerando o interesse no estudo de peptídeos antimicrobianos (PAM), como os da formiga gigante *Dinoponera quadriceps*. A fim de melhorar a carga líquida positiva e a atividade antibacteriana dessas, foram propostos aminoácidos análogos com análogos substituídos simples de cadeia lateral positiva, principalmente arginina ou lisina. Assim, o presente trabalho visa estudar a atividade antimicrobiana dos análogos de M-PONTX-Dq3a, um AMP de 23 aminoácidos identificado no veneno de *D. quadriceps*. M-PONTX-Dq3a[1-15], um fragmento contendo os 15 aminoácidos centrais, e oito análogos derivados de simples substituições por arginina ou lisina foram propostos. Posteriormente, a atividade antimicrobiana desses peptídeos foi testada contra as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MSSA) e ATCC 33591 (MRSA). Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal mínima (CLM), bem como a concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB). A permeabilidade da membrana foi avaliada usando o ensaio de cristal violeta (CV) e citometria de fluxo usando iodeto de propídio. O efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana (Time-Kill) foi avaliado. Alterações ultraestruturais foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15], ambos substituídos por arginina, apresentaram os menores valores de MIC e MLC (ambos 0,78 µM). Nos ensaios de formação de biofilme, o peptídeo [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou um CIMB de 3,12 µM para as duas cepas testadas. Ambos os peptídeos foram capazes de alterar a permeabilidade da membrana em cerca de 80%. O tratamento no CIM foi capaz de eliminar as bactérias após 2 horas de contato. Para o tratamento com metade da CIM, ambas as cepas apresentaram constância no número de bactérias até 12h, o que pode indicar um efeito bacteriostático. A MEV mostrou que o tratamento na menor concentração (0,78 µM) de ambos os peptídeos proporcionou a ruptura da membrana celular, desestabilizou a interação intercelular e a CLM de [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] causou a erradicação completa do bactérias. Assim, este estudo descreve dois AMP ativos contra MSSA e MRSA e também são capazes de inibir a formação de seus biofilmes. [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15] surgem como uma nova alternativa de pesquisa de substâncias para o tratamento de cepas resistentes e/ou formadoras de biofilme.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos; *Dinoponera quadriceps*, Metilicina-resistente.

ABSTRACT

The growing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is associated with increased mortality rates, generating the interest on the developing of antimicrobial peptides (AMP), such those from the giant ant *Dinoponera quadriceps*. In order to improve the net positive charge and the antibacterial activity of the AMP, amino acids with positive side chain single substituted analogues have been proposed, mainly arginine or lysine. Thus, the present work aims to study the antimicrobial activity of the analogues of M-PONTX-Dq3a, a 23 amino acid AMP identified in the *D. quadriceps* venom. M-PONTX-Dq3a[1-15], a fragment containing the 15 central amino acids, and eight derivatives single arginine or lysine substituted analogues were proposed. After, the antimicrobial activity of these peptides was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MSSA) and ATCC 33591 (MRSA) strains. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) were determined, as well the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC). Membrane permeability was assessed using the Crystal violet (CV) assay and flow cytometry using with propidium iodide. The effect of exposure time on microbial viability (Time-Kill) was evaluated. Ultrastructural alterations were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] and [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15], both arginine-substituted, showed the lowest MIC and MLC values (both 0.78 μ M). In the biofilm formation assays, the peptide [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] showed a MBIC of 3.12 μ M for the two strains tested. Both peptides were able to change the permeability of the membrane around 80%. The treatment at MIC was able to eliminate bacteria after 2 hours of contact. For treatment with half of the MIC, both strains had a constancy in the number of bacteria up to 12h, which may indicate a bacteriostatic effect. SEM showed that the treatment at the lowest concentration (0.78 μ M) of both peptides provided disruption of the cell membrane, destabilized the intercellular interaction and the CLM of [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] caused the complete eradication of the bacteria. Thus, this study describes two AMP active against MSSA and MRSA and also are able to inhibit the formation of their biofilms. [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] and [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15] emerge as a new alternative for research substances for the treatment of resistant and/or biofilm-forming strains.

Keywords: Antimicrobial peptides, *Dinoponera quadriceps*, Methicillin-resistant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fluxograma da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	24
Figura 2 –	Fluxograma da determinação da concentração letal mínima (CLM).....	25
Figura 3 –	Fluxograma da determinação da concentração inibitória mínima de formação de biofilme (CIMB).....	26
Figura 4 –	Fluxograma do ensaio do cristal violeta (CV).....	27
Figura 5 –	Fluxograma do ensaio de citometria de fluxo.....	28
Figura 6 –	Fluxograma do ensaio do tempo de morte.....	29
Figura 7 –	Fluxograma da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
Figura 8 –	Captação do cristal violeta pelo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p tratados com dinoponerotoxinas modificadas	33
Figura 9 –	Demonstração do dano celular em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p tratados com dinoponerotoxinas modificadas por citometria de fluxo.....	34
Figura 10 –	Efeito do tempo de exposição de [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a e [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a na viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	35
Figura 11 –	Efeito do tempo de exposição de [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a e [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a na viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	35
Figura 12 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p.....	36
Figura 13 –	Espectros do ensaio de dicroísmo circular dos peptídeos testados.....	37
Figura 14 –	Efeito do fragmento e dos análogos de arginina sobre cepa de <i>S. aureus</i> sensível à meticilina.....	51
Figura 15 –	Efeito da oxacilina e vancomicina sobre cepas de <i>S. aureus</i>	52
Figura 16 –	Efeito de peptídeos modificados sobre a formação de biofilme por cepas de <i>S. aureus</i>	53
Figura 17 –	Efeito da oxacilina e vancomicina sobre a formação de biofilme por cepas de <i>S. aureus</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do fragmento e análogos de M-PONTXDq3a.....	20
Tabela 2 – Efeito antimicrobiano de dinoponeratoxinas modificadas sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Tabela 3 – Fração helicoidal (f _H) dos peptídeos.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Histórico da resistência aos antimicrobianos	13
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	14
2.3 Novas alternativas terapêuticas	15
3. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo geral	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1 Produção dos peptídeos	22
5.2. Espectroscopia de dicroísmo circular	22
5.3 Antimicrobianos.....	23
5.4 Cepas microbianas	23
5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração letal mínima (CLM)	23
5.6 Determinação da concentração inibitória mínima de formação de biofilme (CIMB).....	25
5.7 Ensaio do cristal violeta.....	26
5.8 Citometria de fluxo	27
5.9 Efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana (tempo de morte).....	28
5.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	29
5.11 Análise estatística	30
6. RESULTADOS	31
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
9. APÊNDICE.....	51

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é grave problema de saúde pública mundial e, dentre as bactérias gram-positivas, o *Staphylococcus aureus* é o patógeno de maior destaque, sobretudo a cepa resistente à metilina (MRSA) (Bouiller, Bertrand e Hocquet, 2020). Esse microrganismo é responsável por uma variedade de infecções comumente relacionadas à pele, tecidos moles, ossos e articulações como também às infecções associadas à cateteres ou dispositivos protéticos. Junto a isso, o *S. aureus* é o principal agente nas bacteremias em nações industrializadas. (Cheung, Bae e Otto, 2021).

Vale ressaltar que a bacteremia mediada por MRSA geralmente causa infecções metastáticas, como endocardite infecciosa, artrite séptica e osteomielite, configurando-o como agente de grande relevância clínica, tendo em vista o arsenal antibiótico restrito disponível para seu tratamento e o pior prognóstico para o paciente quando comparado ao *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) (Kwiecinski e Horswill, 2020). Por outro lado, infecções por MSSA também são relevantes clinicamente uma vez que algumas linhagens, como por exemplo as detentoras da sequência (ST) 398, possuem alta virulência levando a infecções fatais. (Huang e Chen, 2020). A formação de biofilme por essas cepas também se mostra como um importante mecanismo de perpetuação do quadro infeccioso, uma vez que tal estrutura fornece uma matriz protetora ao redor da bactéria, sendo esta altamente resistente à ação dos antimicrobianos e atuação do sistema imunológico do hospedeiro (Nasser *et al.*, 2022).

Esses aspectos relacionados à virulência e resistência aos antimicrobianos contribuem para o aumento nas taxas de morbidade, mortalidade e de permanência hospitalar dos pacientes, gerando custos adicionais (Lee *et al.*, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para a prevenção e tratamento de cepas resistentes e biofilmes se mostram emergenciais (Lisowska-Łysiak *et al.*, 2021).

Dentro desse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são uma alternativa promissora frente aos antibióticos convencionais devido à sua ação potencial em combater bactérias resistentes, uma vez que, do ponto de vista farmacodinâmico, apresentam uma taxa de mortalidade muito maior que os fármacos de escolha, segundo a literatura (Omardien, Brul e Zaat, 2016; Yu *et al.*, 2018). Essas substâncias compõem o sistema imune inato de invertebrados aquáticos e terrestres contra infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e alguns protozoários (Erdem Büyükkiraz e Kesmen, 2022).

Do ponto de vista estrutural, os PAMs compartilham características como o tamanho (geralmente entre 12 e 50 aminoácidos) e a estrutura tridimensional. No entanto, eles são bem

diversos em termos de teor de aminoácidos, atividades biológicas, mecanismos de ação, sua origem e propriedades físico-químicas (Huan *et al.*, 2020). Em relação à ação antimicrobiana, a literatura destaca alguns mecanismos de ação, como: inibição da síntese de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos no citoplasma, interferência no dobramento de proteínas e dano à membrana, sendo este o mais recorrente (Hernández-Aristizábal e Ocampo-Ibáñez, 2021).

A ação dos peptídeos antimicrobianos sobre as membranas bacterianas é efetiva graças ao caráter anfipático e catiônico dessas moléculas, favorecendo interações eletrostáticas culminando na inserção dos PAMs na superfície da célula e rompimento através da formação de poros. Algumas dessas moléculas são capazes de induzir morte celular por apoptose, em alguns casos, através da interrupção do metabolismo do DNA e de proteínas de interagir com a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro atuando como imunomoduladores (Mwangi *et al.*, 2019; Lima, Cavalcante e Rádis-Baptista, 2020). Graças a essas características, os peptídeos antimicrobianos se demonstram como atores de relevância na pesquisa de novas alternativas para o controle de bactérias suscetíveis e resistentes aos antibióticos que afetam a saúde humana (Lazzaro, Zasloff e Rolff, 2020).

Os venenos de invertebrados mostram-se como uma grande fonte de peptídeos antimicrobianos e têm sido investigados no âmbito do desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas, sendo alguns já utilizados na prática clínica (Boparai e Sharma, 2019). Alguns exemplos de peptídeos de invertebrados incluem aqueles encontrados em insetos (defensinas e cecropinas), moluscos e nematóides (defensinas), caranguejos-ferradura (grandes defensinas), β -defensinas de invertebrados e crustáceos (crustinas) (Bin Hafeez *et al.* 2021).

Previamente, descrevemos ação antimicrobiana e tripanocida do veneno total da formiga *Dinoponera quadriceps* (Lima *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2016). Através do transcriptoma da glândula de veneno, os PAMs majoritariamente identificados foram as chamadas dinoponeratoxinas (DnTx) (Torres *et al.*, 2014).

Dentre os diferentes PAMs com atividade antichagásica, M-PONTX-Dq3a foi identificado como um peptídeo promissor contra as principais formas evolutivas de *T. cruzi*, possuindo, assim, o maior índice de seletividade (IS) (Lima *et al.*, 2018) e contra formas plactônicas e formadores de biofilme de *S. aureus* (Rocha *et al.*, 2021). Através desse estudo foi possível constatar que M-PONTX-Dq3a é um potente inibidor de cepas sensíveis e resistentes, sendo capaz de prevenir a formação de biofilme em baixa faixa micromolar (0,78 – 3,12 mM), além do seu rápido efeito por meio da ruptura de membrana bacteriana

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico da resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias detêm de forma intrínseca ou desenvolvem a capacidade de burlar os mecanismo de ação que os fármacos possuem contra elas. Dados epidemiológicos provenientes da Europa e Ásia comprovam que as bactérias resistentes aos antimicrobianos tornaram-se muito mais prevalentes no decorrer da última década, de forma que 700.000 mortes são atribuídas anualmente à esse problema de saúde pública em todo o mundo, podendo aumentar para 10 milhões de mortes por ano até 2050 (ECDC, 2018). Ademais, infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) comprovadamente resultam no aumento do tempo de hospitalização dos pacientes, representando um fardo econômico significativo para os sistemas nacionais de saúde (Christaki, Marcou e Tofarides, 2020).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos já existia bem antes dessas substâncias serem descobertas, sintetizadas ou comercializadas. Por exemplo, bactérias isoladas de águas glaciais com mais de 2.000 anos apresentam resistência à ampicilina e outros isolados de pergelissolo com mais 30.000 anos demonstram resistência à vancomicina (D'Costa *et al.*, 2011). Isso se deve porque muitos dos antibióticos utilizados na prática clínica são produzidos naturalmente por organismos do ambiente (Holmes *et al.*, 2016).

A penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming, é sintetizada por um fungo como defesa contra bactérias. Muito antes de ser utilizada no tratamento de soldados feridos na Segunda Guerra Mundial, as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina já haviam sido descritas (Sengupta, Chattopadhyay e Grossart, 2013). Como forma de contornar este problema, a metilina foi introduzida em 1959, gerando cepas resistentes após seu uso. Dentro desse contexto, a vancomicina foi introduzida como tratamento para infecções por cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA).

Algumas décadas posteriores, em 1979, cepas de *Staphylococcus coagulase-negativo* resistentes à vancomicina foram identificadas e, em 1989, a resistência em enterococos a esse antimicrobiano foi descrita (Courvalin, 2006). Já na década de 1990, as primeiras cepas de *S. aureus* menos suscetíveis à vancomicina foram encontradas no Japão (*Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* – VISA) (Levine, 2006). Outro exemplo no âmbito da resistência aos antimicrobianos é o da tetraciclina, introduzida em 1950, seguida de relatos de resistência em cepas de *Shigella* em 1959. De forma similar, o levofloxacino começou a ser

utilizado na prática clínica em 1996 possibilitando o surgimento de pneumococos resistentes a ele um ano depois (Harkins *et al.*, 2017).

A produção de antimicrobianos pela indústria farmacêutica teve seu ápice durante as décadas de 1960 e 1980, apresentando uma drástica redução no número de descobertas de novas antibioticoterapias após este período. O interesse nessa pesquisa retornou como consequência do arsenal restrito de substâncias para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, transformando esse cenário numa grande preocupação na prática clínica em escala global (Levin-Reisman *et al.*, 2019).

2.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo, coagulase-positiva, sem motilidade, pertencente ao filo Firmicutes (Lee *et al.*, 2018). Dentre as 52 espécies e 28 subespécies do gênero *Staphylococcus*, esta espécie é mais clinicamente relevante, podendo ser encontrada na microbiota comensal da mucosa nasal de 20 – 40% da população (Turner *et al.*, 2019). A infecção por *S. aureus* pode ocorrer quando as barreiras cutâneas e mucosas são rompidas (como por exemplo, em condições crônicas da pele, feridas ou intervenção cirúrgica), possibilitando o acesso do microrganismo à tecidos adjacentes e a corrente sanguínea. Vale destacar, que indivíduos com dispositivos médicos, como cateteres, e imunocomprometidos são mais vulneráveis à infecção por esta bactéria (Chalmers e Wylam, 2020).

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi evidenciado pela primeira vez no ano de 1961 na Inglaterra, logo após o início do uso da meticilina na prática clínica. Este fármaco foi amplamente utilizado, mas por conta de sua toxicidade, acabou sendo substituído por penicilinas mais estáveis, como a oxacilina (Davis, Van Hal e Tong, 2015) No entanto o termo MRSA permaneceu em utilização. Uma década depois de sua caracterização, o MRSA foi o responsável por surtos em hospitais em várias partes do mundo, sendo que posteriormente, estas cepas foram encontradas em indivíduos sem contato com ambientes nosocomiais, sobretudo em populações indígenas da Austrália e pessoas saudáveis, incluindo crianças, nos Estados Unidos (Fridkin *et al.*, 2005).

Vários clones de *S. aureus* tornaram-se MRSA através da captação por transferência horizontal de genes do cromossomo cassete estafilocócico mec (SCCmec), um elemento genético móvel que codifica os genes mecA ou mecC (Uehara, 2022). Estes, por sua vez, conferem resistência à meticilina e, portanto, à maioria dos antibióticos β -lactâmicos (Lima *et al.*, 2020). A capacidade notável do *S. aureus* em adquirir resistência gera implicações nas condutas de tratamento de infecções por esse patógeno. Além disso, pessoas com colonização de MRSA têm risco aumentado de infecção subsequente e configuram-se como uma importante

fonte de transmissão indivíduo-indivíduo (Hassoun, Linden e Friedman, 2017).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos se ligam a proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), impedindo a formação da parede celular e resultando em lise bacteriana. O mecanismo de resistência à meticilina está relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas, não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos (Miyachiro, Contreras-Martel e Dessen, 2019). A codificação dessas novas PBPs, tornando esses patógenos resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA (Straume *et al.*, 2020).

Ademais, *S. aureus* possui um vasto arsenal de fatores de virulência, incluindo moléculas de adesão, prejudiciais às células hospedeiras e imunomodulatórias, de forma que essa variedade reflete nos diferentes perfis de infecção que essa bactéria pode causar (Jenul e Horswill, 2019). Contudo, a relação entre a combinação de fatores de virulência distintos com a gravidade e agressividade das infecções ainda não está muito bem elucidada, uma vez que muitos desses fatores detém funções redundantes ou parcialmente sobrepostas (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021). Além disso, a investigação desses elementos não é replicável em modelos animais porque são específicos em humanos (Miller *et al.*, 2020).

As infecções de pele e tecidos moles por *S. aureus* são iniciadas por transferência bacteriana do reservatório principal no nariz até microlesões abertas e feridas na pele, provavelmente por contato manual. As proteínas de superfície da bactéria (FnBPA, FnBPB, ClfA, ClfB Cna) se ligam às proteínas da matriz extracelular, permitindo a multiplicação delas nos tecidos lesionados (Foster *et al.*, 2020). Além disso, a capacidade de adesão do *S. aureus* o torna capaz de gerar biofilme, uma aglomeração de microrganismos contidos numa matriz extracelular que facilita a resistência à interferência mecânica, defesas do hospedeiro e tratamento com antibióticos, em superfícies plásticas ou metálicas, tornando-o uma causa frequente de infecções associadas ao catéter e pneumonia associada à ventilação mecânica (Yang *et al.*, 2017).

2.3 Novas alternativas terapêuticas

As altas prevalências e incidências das infecções por cepas resistentes aos antimicrobianos desafiam o arsenal terapêutico vigente e têm estimulado vários estudos que visam descobrir novas substâncias antibióticas de fontes naturais (Lima *et al.*, 2016). Os insetos vêm sendo amplamente estudados, devido ao seu forte desenvolvimento em vários nichos ecológicos, sugerindo excelentes estratégias de defesa contra patógenos, como microrganismos,

e superação e adaptação a diferentes condições ambientais (Vilcinskas, 2021). Vários estudos com venenos animais vêm demonstrando grande potencial biotecnológico, como no caso de alguns venenos de formigas das subfamílias Ponerinae, Myrmiciinae, Pseudomyrmecinae e Ecitonina (Xu *et al.*, 2018; Wanandy *et al.*, 2015) que são ricos em peptídeos e proteínas.

Após a invasão em um hospedeiro mamífero, as bactérias são apresentadas ao sistema imunológico do hospedeiro e induzem a produção de moléculas de defesa, como peptídeos e proteínas. Muitos desses peptídeos exercem propriedades antibacterianas, antifúngicas ou antivirais, e são conhecidos como peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Dijksteel *et al.*, 2021). Os PAMs geralmente contêm de 15 a 45 resíduos de aminoácidos e são, em geral, catiônicos em pH fisiológico, geralmente com caráter anfipático e codificados por genes separados. Os PAMs fazem parte da primeira defesa imunológica contra patógenos, durante a imunidade inata. Em mamíferos, estas moléculas são observadas em linfócitos e leucócitos. Devido à sua ampla atividade contra microrganismos e sua expressão desencadeada por várias infecções, atualmente os PAMs são intensamente examinados como potenciais compostos antiparasitários e antibióticos (Pretzel *et al.*, 2013).

Os peptídeos em geral, oferecem mínima imunogenicidade, excelente penetrabilidade nos tecidos, baixo custo de produção e facilidade em modificações moleculares para melhorar a estabilidade *in vivo* e a atividade biológica. Assim, PAMs são fortes candidatos para antibióticos, antiparasitários ou antineoplásicos (Yavari *et al.*, 2018).

A espécie *Dinoponera quadriceps*, pertencente à subfamília Poneriane, é uma formiga primitiva, distribuída no nordeste brasileiro (Paiva e Brandão, 1995). As formigas deste gênero são, em sua maioria, predadoras, alimentando-se de pequenos e médios artrópodes, que são paralizados pela sua picada (Araújo e Rodrigues, 2006). Este veneno possui conteúdo protéico de 64% e o grupo de Lima *et al.* (2014) demonstrou diversas propriedades farmacológicas, como antinoceptiva (Sousa *et al.*, 2012), anticonvulsivante (Lopes *et al.*, 2013), anti-inflamatória, anti-agregante plaquetária, anticoagulante (Madeira *et al.*, 2015), antimicrobiana (Lima *et al.*, 2014) e antiparasitária (Lima *et al.*, 2014). Ao realizar o transcriptoma da glândula de veneno da *D. quadriceps*, foi revelado um repertório de toxinas que inclui as dinoponeratoxinas (DnTx), toxinas semelhantes a pilosulina, toxinas ICK, proteínas alérgicas, esterases e toxinas letais (Torres *et al.*, 2014). Esses achados abriram caminho para as investigações funcionais e farmacológicas desses novos peptídeos oriundos do veneno desta formiga (Lima *et al.*, 2018).

As DnTx foram denominadas de acordo com seu peso molecular teórico ou experimental e por uma nomenclatura normalizada: Dq2561 (M-PONTXDq3a; 23 resíduos de

aminoácidos), Dq-1503 (M-PONTXDq3b; 13 resíduos de aminoácidos), Dq-1319 (M-PONTX-Dq3c, 11 resíduos de aminoácidos) e Dq-3348 (MPONTX- Dq4e; 30 resíduos de aminoácidos). Dentre os diferentes PAMs com atividade antichagásica e antibacteriana, M-PONTX-Dq3a foi identificado como um peptídeo promissor contra as principais formas evolutivas de *T. cruzi*, possuindo, assim, o maior índice de seletividade (IS) (Lima *et al.*, 2018) e contra formas plactônicas e formadores de biofilme de *S. aureus* (Rocha *et al.*, 2021). Com base nos achados, o M-PONTX-Dq3a demonstrou grande potencial como modelo estrutural para a busca de novos PAMs, através de decisões guiadas com o objetivo de elevar a seletividade, reduzir a toxicidade e baratear o custo de produção.

O aprimoramento da atividade dos PAMs é realizado através do aumento da sua eficácia, aumento da especificidade, redução das interações medicamentosas, diminuição da toxicidade, bem como pela sua diversidade biológica e possibilidade do desenho racional do peptídeo através da substituição de seus aminoácidos. Alterações sutis realizadas nessas unidades proteicas podem acarretar mudanças funcionais, que afetam a capacidade desses peptídeos de agir em microrganismos, além de alterar a sua toxicidade na célula hospedeira (Fry, 2018). Essas características dos aminoácidos estão relacionadas com o mecanismo de ação dos PAMs e podem ser modificadas por meio da mutagênese sítio-dirigida, ou seja, excluindo ou substituindo resíduos de aminoácidos com o objetivo de direcionar a atividade de peptídeos já existentes. Como por exemplo a substituição de aminoácido pela arginina no VmCT1, que foi capaz de aumentar a seletividade do peptídeo ao parasito em três vezes (Pedron *et al.*, 2019).

Os resíduos de aminoácidos que predominam, na maioria dos peptídeos antimicrobianos, são os de arginina (Arg) e lisina (Lys). A carga positiva dos grupos guanidínio e amino de Arg e Lys, respectivamente, são responsáveis pela interação dos peptídeos com membranas negativamente carregadas, a exemplo da membrana parasitária (Li *et al.*, 2017).

O resíduo mais comumente utilizado no desenho de PAMs é o de Arg, pois são aqueles mais abundantes, além de apresentarem maior efetividade na permeabilização das membranas (Schmidt *et al.*, 2012) Os peptídeos de Arg tendem a atuar através de mecanismos transmembrânicos, ou seja, penetram as células mais facilmente devido ao favorecimento energético da inserção dos grupos guanidínio em ambientes hidrofóbicos (Hirose *et al.*, 2012; Rice e Wereszczynski, 2017). O resíduo de Lys é descrito, por alguns trabalhos, como responsável direto da alta atividade antimicrobiana dos peptídeos. Além disso, os PAMs com maior quantidade de resíduos de Lys também tendem a atuar por mecanismos de permeabilização das membranas dos microrganismos (Schibli *et al.*, 2006; Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até o ano de 2050, infecções resistentes à medicamentos, exacerbada pelo uso indiscriminado de antibióticos, matará 10 milhões de indivíduos anualmente, desencadeará um cataclismo financeiro, impondo um quadro de pobreza extrema a milhões de pessoas (De Kraker, Stewardson e Harbarth, 2016). A crescente incidência e prevalência da resistência aos antimicrobianos entre bactérias nosocomiais associada à rápida disseminação de genes de resistência no meio ambiente configuram uma ameaça alarmante à saúde pública em escala global, devido aos riscos relacionados à morbimortalidade e o peso deste problema sobre a economia (Willyard, 2017).

O bacilo gram-positivo *S. aureus* é uma das principais causas de infecções de pele, sepse e pneumonia em pacientes hospitalizados, com dados recentes indicando infecções adquiridas na comunidade. O crescimento da incidência de infecções por MRSA constitui uma ameaça, associada ao aumento das taxas de mortalidade tanto nos hospitais como na comunidade (Aslam *et al.*, 2018). Além disso, relatos recentes da literatura destacam o surgimento e disseminação de cepas com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos, como a vancomicina (MRSA vancomicina-resistente), tornando o tratamento viavelmente impossível (Othman, Sleiman e Abdel-Massih, 2019). Os peptídeos antimicrobianos surgem como uma alternativa promissora para combater essa ameaça, já que quando comparado aos antibióticos empíricos, eles apresentam baixa tendência em gerar resistência, tempo de ação de morte rápida, atividade de amplo espectro e eficácia clínica relevante contra uma gama de cepas multirresistentes (Magana *et al.*, 2020). Nesse contexto, venenos e toxinas de invertebrados tornam-se uma fonte em potencial de novas moléculas de interesse farmacológico, uma vez que são fontes de PAMs (Lima *et al.*, 2018).

O efeito antimicrobiano do veneno total da formiga *D. quadriciceps* foi previamente descrito por Lima *et al.* (2014) e associado aos PAMs que o compunham majoritariamente, denominados de dinoponeratoxinas. Dentre eles, MPONTX-Dq3a demonstrou melhor atividade sobre cepas sensíveis e resistentes à metilina e impediu a formação de biofilme em baixas concentrações (Rocha *et al.*, 2021).

Para melhorar a atividade antibacteriana das dinoponeratoxinas M-PONTX-Dq3a foram propostos alguns análogos com substituições únicas de arginina ou lisina. A cationicidade (carga líquida positiva) é uma importante característica físico-química dos peptídeos, que influencia as interações peptídeo-membrana modulando as interações eletrostáticas iniciais entre os PAMs e os fosfolípidios carregados negativamente presentes nas membranas do

microrganismo (Pedron *et al.*, 2019). Após estudos preliminares do efeito biológico, M-PONTX-Dq3a[1-15] mostrou-se promissor e alguns análogos de substituições únicas de arginina foram propostas na face hidrofílica nas posições G3, T4, K7, L10 e K11, bem como substituições únicas de lisina nas posições G3, T4 e L10, o que levou ao aumento das cargas líquidas positivas, de +3 a +4 em seis destes peptídeos análogos (Tabela 1).

Dessa forma, o presente trabalho visa estudar a atividade antimicrobiana de análogos da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a na busca de substâncias com potencial biotecnológico, frente ao cenário alarmante e crescente da resistência aos antibióticos.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do fragmento e análogos de M-PONTX-Dq3a.

Peptídeos	Sequência	Peso Molecular	Carga Líquida	H	μH
M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWALKAIPA	1673,0	3	0,782	0,411
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWKTLAKWALKAIPA	1743,16	4	0,716	0,459
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGKLAKWALKAIPA	1699,10	4	0,699	0,465
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWAKKAIPA	1687,05	4	0,603	0,510
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWRTLAKWALKAIPA	1772,14	4	0,715	0,460
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGRLAKWALKAIPA	1728,08	4	0,697	0,466
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLARWALKAIPA	1701,02	3	0,781	0,412
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWARKAIPA	1716,03	4	0,601	0,511
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWALRAIPA	1701,02	3	0,781	0,412
M-PONTX-Dq3a	FWGTLAKWALKAIPAAMGMKQNK	2561,13	5	0,509	0,248

Fonte: Monteiro e colaboradores (2021). Sequências e propriedades físico-químicas da M-PONTX-Dq3a foram previamente descritas por Lima e colaboradores (2018). A carga líquida em pH neutro, hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μH) foram calculados em <https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a ação antimicrobiana de análogos de M-PONTXDq3a sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Letal Mínima (CLM) dos análogos de dinoponeratoxinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição dos peptídeos na viabilidade microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus*;
- Estudar o efeito dos peptídeos sobre a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*;
- Investigar o mecanismo de ação dos peptídeos modificados em cepas de *Staphylococcus aureus*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Produção dos peptídeos

No presente trabalho foram estudados os análogos da dinoponerotoxina M- PONTX-Dq3a, cujos processos de síntese e purificação ocorreram no laboratório de compostos bioativos da Universidade Federal do ABC-UFABC, sob coordenação do Prof. Vani Xavier de Oliveira Junior e no Laboratório de Química de Peptídeos y Proteínas do Centro de Investigación Príncipe Felipe, coordenado pela Dra. Mar Orzaéz, Valencia-Espanha.

A síntese de peptídeos em fase sólida foi realizada em um sintetizador de peptídeos (PS3-Sync Technologies/ Libertyblue), utilizando a estratégia fluorometiloxicarbonil (Fmoc), e os peptídeos foram ancorados a uma resina Rink Amide, com grau de substituição de 0,52 mmol. g⁻¹. A peptidil-resina protegida a seco foi clivada por exposição a TFA/anisol/água (95:2,5:2,5, v:v:v) durante 2h à temperatura ambiente (Monteiro *et al.*, 2021). Os peptídeos brutos foram precipitados com éter dietílico anidro, separados dos componentes da reação solúveis em éter por filtração, extraídos da resina com acetonitrila 60% em água e liofilizados (Torres *et al.*, 2017). Os peptídeos brutos foram por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa semi-preparativa em um Delta Prep 600 (Waters Associates) e as frações selecionadas contendo os peptídeos purificados foram reunidas e liofilizadas. Os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massa por eletrospray- ionização por cromatografia líquida usando um espectrômetro de massa Modelo 6130 Infinity acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Modelo 1260 (Agilent) (Monteiro *et al.*, 2021).

Os peptídeos obtidos foram denominados da seguinte maneira: M-PONTX-Dq3a[1-15], [Lys]³M-PONTX-Dq3a[1-15], [Lys]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15], [Lys]¹⁰M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁷M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]¹⁰M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]¹¹M-PONTX-Dq3a[1-15]. Todas as substituições foram promovidas nas posições hidrofílicas. As soluções-estoque de peptídeos foram preparadas a 1 mM com tampão fosfato-salino (PBS), dividida em alíquotas e mantidas a -20°C até o momento dos ensaios.

5.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

A estrutura secundária dos peptídeos foi analisada através de ensaios de dicroísmo circular. Os espectros foram obtidos no ultravioleta distante (195 – 260 nm) após quatro acumulações a 20 °C. O experimento foi realizado em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), dodecilsulfato de sódio (SDS, 20 mmol/L) e 2,2,2-trifluoretanol (TFE)/água

(60% v:v), usando uma solução de peptídeos de concentração fixa (40 $\mu\text{mol/L}$). Após a obtenção dos espectros, um filtro de transformada rápida de Fourier foi aplicado com o intuito de reduzir os efeitos de fundo. A fração helicoidal (f_H) dos peptídeos em meios distintos foi calculada utilizando a teoria de hélice-molde de Lifson-Roig (Lifson e Roig, 1961).

5.3 Antimicrobianos

Oxacilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram pesados e reconstituídos em cada experimento.

5.4 Cepas microbianas

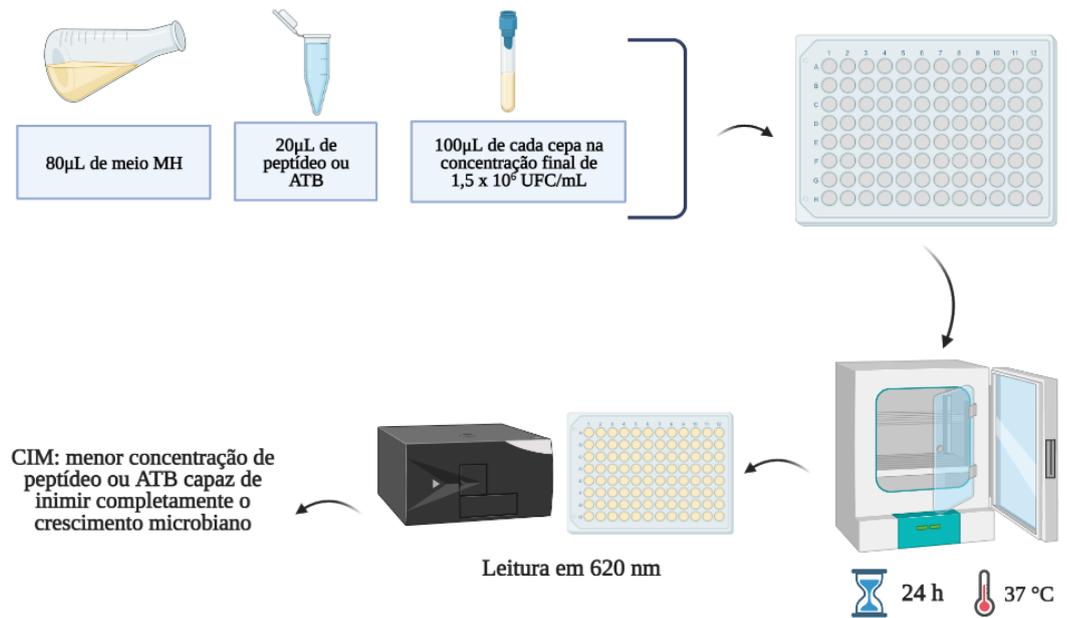
As cepas ATCC 6538P (MSSA) e ATCC 33591 (MRSA) foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. As culturas bacterianas foram mantidas em ágar nutriente inclinado (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) a 4 °C e tendo seu subcultivo realizado a cada oito semanas.

5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração letal mínima (CLM)

As concentrações inibitória e letal dos peptídeos e dos antibióticos foram determinadas através do ensaio de microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2018), com algumas adaptações. Culturas puras das duas cepas utilizadas no estudo, mantidas em ágar nutriente reclinado sob refrigeração, foram repicadas em caldo Mueller-Hinton (MH) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubadas a 37 °C por 24h. Em seguida, as suspensões bacterianas tiveram a densidade celular ajustada com o intuito de se obter uma turbidez semelhante à 0,5 na escala McFarland. Após isso, as suspensões foram diluídas 100 vezes em MH.

Foram adicionados 80 μL de MH, 20 μL dos peptídeos (0,19 a 25,0 μM) ou antibióticos (oxacilina ou vancomicina em uma faixa de concentrações de 0,095 a 200,0 μM) e 100 μL do inóculo bacteriano à microplaca (Kasvi). Tampão salino-fosfato foi utilizado como controle negativo com o intuito de observar o crescimento microbiano. As placas de 96 poços foram então incubadas a 37 °C e verificadas visualmente após 24h. Além disso, as placas de cultura foram submetidas a uma leitura de absorbância em uma leitora de Elisa Bio-Tek a 620nm com o objetivo de eliminar a interferência da turvação causada pela presença dos peptídeos. A CIM foi definida como a menor concentração de peptídeos capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, evidenciado pela ausência de turvação visível.

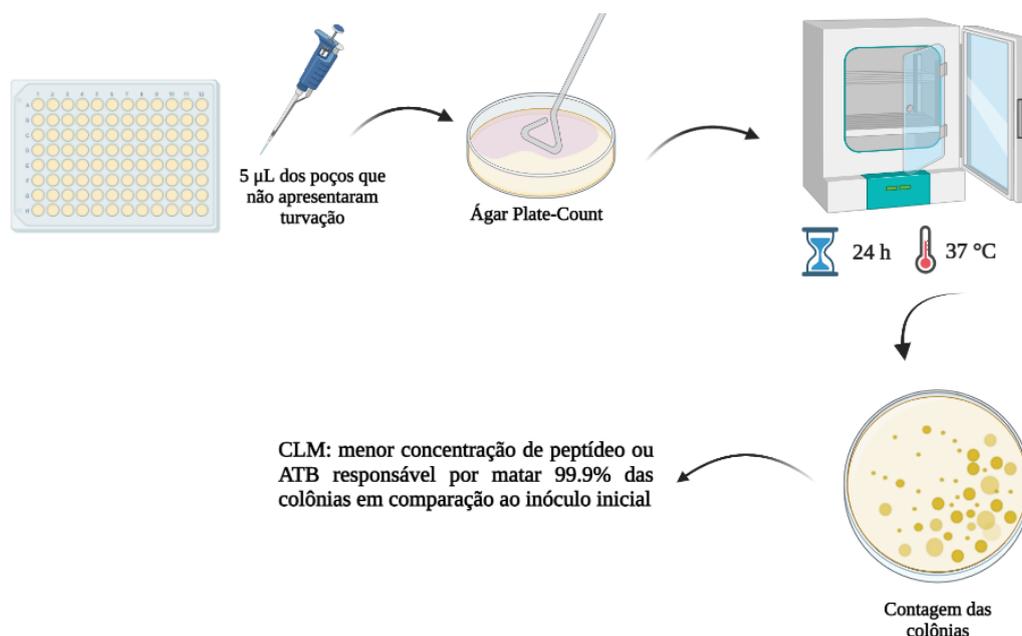
Figura 1: Fluxograma da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).



Fonte: O autor (2023).

A CLM foi definida pela contagem das células viáveis. De forma asséptica, inóculos de 5 µL foram obtidos dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM, onde havia ausência total de turvação visível, e semeados na superfície do ágar Plate-Count (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil). As placas foram incubadas por 24h a 37°C e as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas. Considerou-se como CLM a menor concentração de peptídeos capaz de determinar a morte de 99,9% das células de *S. aureus* do inóculo inicial. Os ensaios foram realizados em triplicata (Rocha *et al.*, 2021). Os experimentos com a cepa MRSA foram desempenhados com os peptídeos que apresentamos melhores valores de CIM e CLM.

Figura 2: Fluxograma da determinação da concentração letal mínima (CLM).



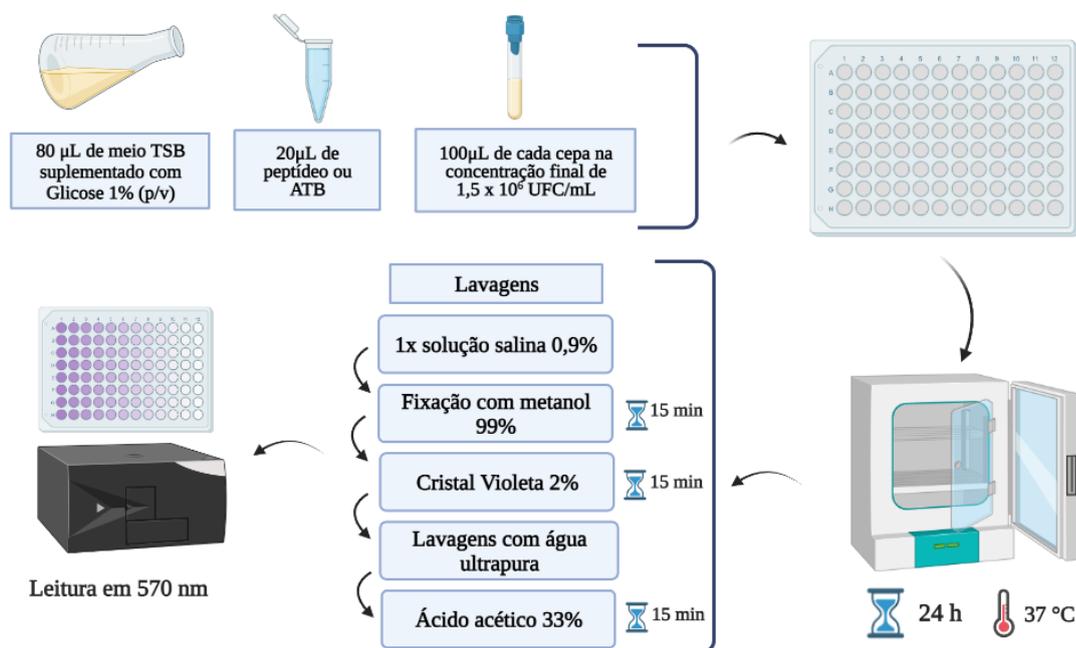
Fonte: O autor (2023).

5.6 Determinação da concentração inibitória mínima de formação de biofilme (CIMB)

O efeito dos peptídeos sobre a formação de biofilme foi avaliado mediante a determinação da CIMB, por meio da quantificação de sua biomassa utilizando a técnica do cristal violeta (CV, Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brasil) (Stepanović *et al.*, 2000). As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo tripton de soja (TSB; Merck Millipore Corporation), suplementado com 1% de glicose (p/v), por 24 horas a 37°C.

Alíquotas de 100 µL da cultura ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) e 100 µL de peptídeos foram adicionadas aos poços de microplacas de 96 poços, sendo incubadas por 24 horas a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com 250 µL de solução salina 0,85% estéril e, para a fixação das células aderidas, 200 µL de metanol 99% foram adicionados por 15 minutos. Após a retirada do metanol e a secagem das microplacas à temperatura ambiente, alíquotas de 200 µL de solução de CV 2% (v/v) foram acrescentadas aos poços por 15 minutos. O excesso de CV foi removido lavando os poços três vezes com água ultrapura. O CV captado pelas células bacterianas foi liberado pela adição de 160 µL de ácido acético 33%, por 15 minutos, e a leitura da densidade óptica a 570 nm foi realizada em leitora de microplaca (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). Como controles do experimento, foram utilizados TSB estéril e cultura microbiana sem exposição a peptídeos. Considerou-se CIMB como a menor concentração de peptídeos capaz de inibir a formação de biofilme bacteriano (Rocha *et al.*, 2021).

Figura 3: Fluxograma da determinação da concentração inibitória mínima de formação de biofilme (CIMB).



Fonte: O autor (2023).

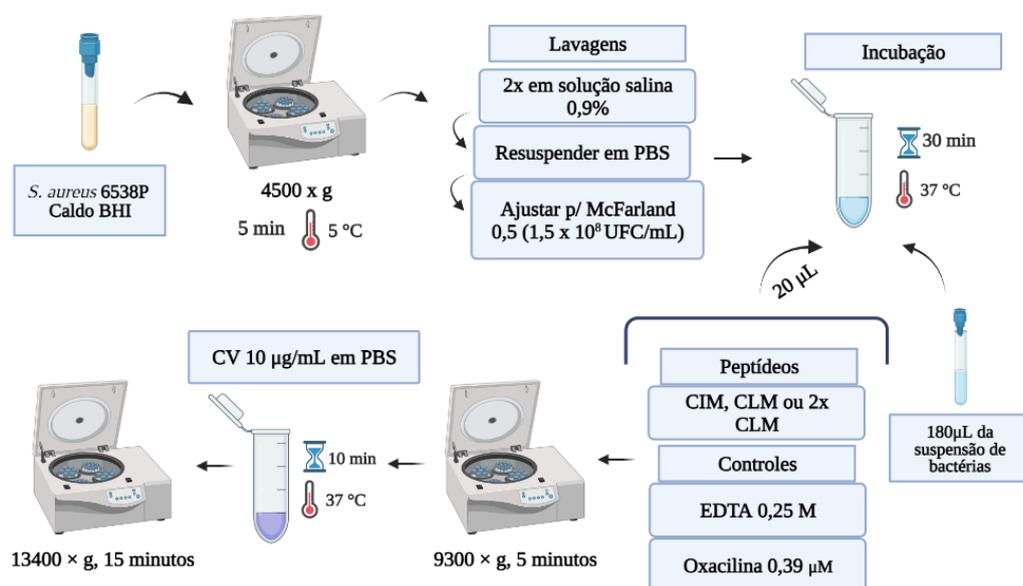
5.7 Ensaio do cristal violeta

A avaliação das mudanças na permeabilidade da membrana induzidas pelos peptídeos modificados foi realizada utilizando o ensaio do cristal violeta (Stepanović *et al.*, 2000). As culturas de *S. aureus* 6538P foram subcultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C durante a noite em caldo BHI. A suspensão bacteriana foi coletada, centrifugada a 4500 x g por 5 minutos a 4°C, lavada duas vezes e ressuspensa em PBS a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

As suspensões bacterianas foram tratadas com os peptídeos modificados que apresentaram os melhores perfis de CIM e CLM (nas concentrações de CIM, CLM e 2x CLM) e incubadas a 37°C por 30 minutos. As células foram coletadas (9300 x g/5 minutos), ressuspensas em PBS contendo 10 µg/mL de CV (Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brasil) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Após uma nova centrifugação (13400 x g / 15 minutos), o sobrenadante foi coletado para leitura em 570 nm em uma leitora de microplaca (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). Culturas tratadas com oxacilina (Oxacilina 0,39 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), EDTA (Edetato dissódico di-hidratado, 0,25 M, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e PBS estéril (sem tratamento) foram utilizadas como controles. Os ensaios foram realizados em triplicata. A captação de cristal violeta pelas células bacterianas foi

calculada pela seguinte fórmula: densidade óptica da amostra / densidade óptica do CV \times 100, considerando a densidade óptica da solução de CV como 100% (Kim, Aquino e Izadjoo, 2021).

Figura 4: Fluxograma do ensaio do cristal violeta (CV).



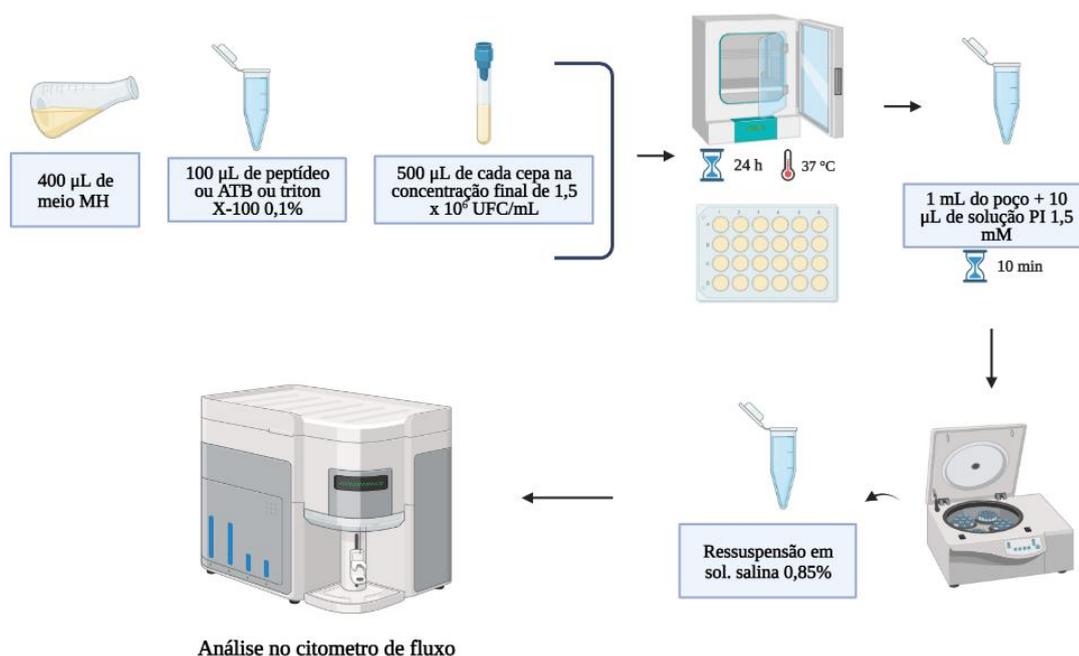
Fonte: O autor (2023).

5.8 Citometria de fluxo

Como forma de demonstrar um possível comprometimento da membrana das células bacterianas, uma citometria de fluxo foi realizada de acordo com o preconizado por Li *et al.* (2016) com algumas modificações. Para isso, alíquotas da suspensão de bactérias ajustadas para a turvação 0,5 da escala de McFarland (500 µL) foram incubadas por 24h com caldo MH (400 µL) e os peptídeos, oxacilina (ambos nas concentrações CIM, CLM e 2 x CLM) ou triton X-100 0,1% (100 µL) em uma placa de 24 poços. O controle negativo consistiu de tampão fosfato-salino.

Iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich Co., EUA) foi dissolvido em água destilada para fazer uma solução estoque de 1,5 mM e foi mantido em geladeira (4°C) no escuro. Um mililitro de cada suspensão diluída foi incubado com 10 µL de PI por 10 min para permitir a marcação de células com membrana comprometida. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de solução salina estéril 0,85% para remover o excesso de PI. As amostras foram mantidas no escuro em gelo e foram usadas dentro de 1h para análise de citometria de fluxo.

Figura 5: Fluxograma do ensaio de citometria de fluxo.

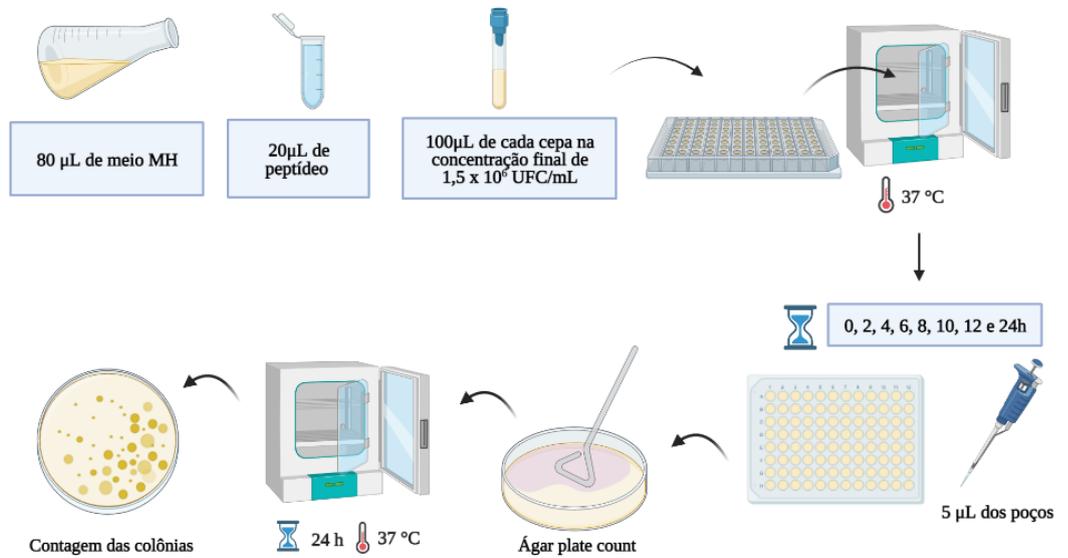


Fonte: O autor (2023).

5.9 Efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana (tempo de morte)

Os análogos $[\text{Arg}]^3\text{M-PONTX-Dq3a}$ [1-15] e $[\text{Arg}]^4\text{M-PONTX-Dq3a}$ [1-15] nas concentrações de $\frac{1}{2}$ CIM e CIM foram adicionados em microplaca de 96 poços com suspensões de *S. aureus* ATCC 6538P ou *S. aureus* ATCC 33591 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) na fase de crescimento exponencial em meio Muller-Hinton caldo. As placas foram mantidas em 37°C. Alíquotas em diferentes tempos de incubação (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 24 h) foram coletadas, diluídas em solução salina estéril 0,85% e plaqueadas em ágar plate Count para a contagem de colônias após 24h de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

Figura 6: Fluxograma do ensaio do tempo de morte.

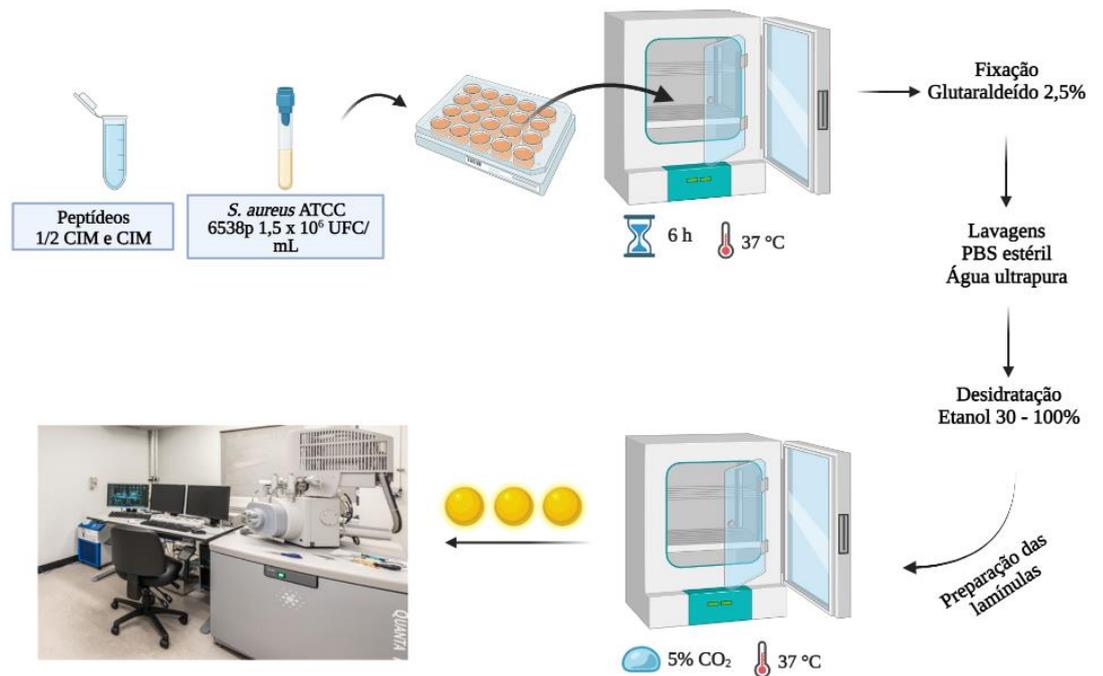


Fonte: O autor (2023).

5.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Alterações ultraestruturais nas bactérias induzidas pelos análogos [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] foram evidenciadas por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, suspensões de *S. aureus* em caldo Mueller-Hinton ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram tratadas com os análogos nas concentrações MIC e $2 \times$ MIC durante 6h. Após a incubação, os grupos experimentais foram fixados com solução de glutaraldeído a 2,5% por 2h, lavados duas vezes com PBS estéril e duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, foi realizada a desidratação com diferentes concentrações de etanol (30 – 100%) por 5 min. As amostras foram secas, revestidas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, EUA) (Mello *et al.*, 2017).

Figura 7: Fluxograma da microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: O autor (2023).

5.11 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram verificados usando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi alcançada se $*p < 0,05$.

6. RESULTADOS

O fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e oito peptídeos modificados foram testados contra a cepa sensível à meticilina de *S. aureus* (6538p) em diferentes concentrações para avaliar o perfil MIC e MLC. Entre eles, [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15] apresentaram os menores valores destes parâmetros (ambos 0,78 µM) e por isso foram escolhidos para realizar os seguintes testes (Tabela 2).

Desta forma, a atividade dos peptídeos modificados mais promissores foi investigada contra a cepa MRSA e na formação de biofilme. Ambos apresentaram MIC e MLC de 0,78 µM, como também verificado para vancomicina, o que é muito relevante, já que a oxacilina apresentou MIC de 400 µM. Nos ensaios de formação de biofilme, o peptídeo [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou um MBIC de 3,12 µM para as duas cepas testadas, sendo eficaz em baixas concentrações enquanto a oxacilina não foi, garantindo uma faixa de tratamento baixa, semelhante ao apresentado pela vancomicina.

Tabela 2: Efeito antimicrobiano de dinoponeratoxinas modificadas sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

(continua)

	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p (MSSA)			<i>S. aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)		
	CIM (µM)	CLM (µM)	CIMB (µM)	CIM (µM)	CLM (µM)	CIMB (µM)
M-PONTX-Dq3a [1-15]	1,56	3,12	ND	ND	ND	ND
[Arg] ³ M-PONTX- Dq3a [1-15]	0,78	0,78	3,12	0,78	0,78	3,12
[Arg] ⁴ M-PONTX- Dq3a [1-15]	0,78	0,78	6,25	0,78	0,78	12,5
[Arg] ⁷ M-PONTX- Dq3a [1-15]	12,5	12,5	ND	ND	ND	ND

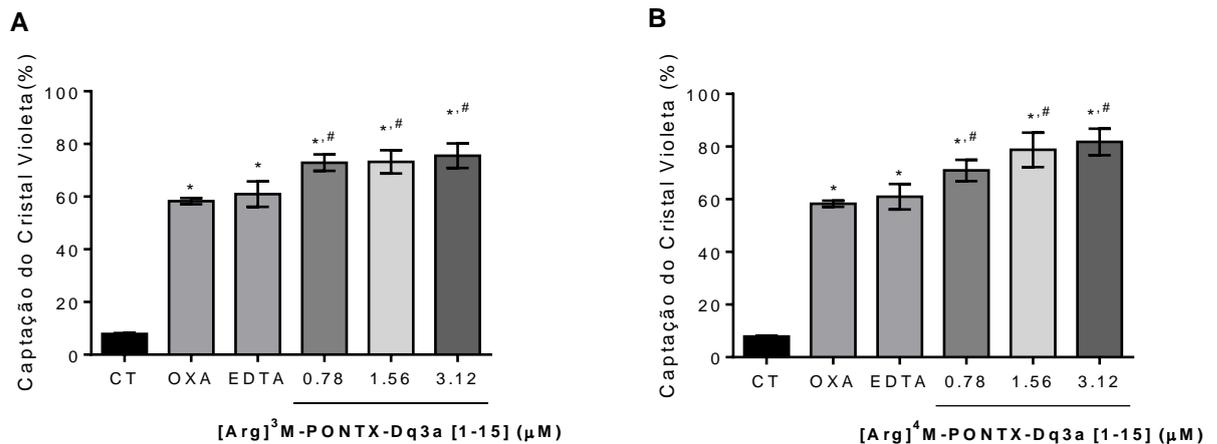
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p (MSSA)			<i>S. aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)		
	CIM (μ M)	CLM (μ M)	CIMB (μ M)	CIM (μ M)	CLM (μ M)	CIMB (μ M)
[Arg] ¹⁰ M- PONTX- Dq3a [1- 15]	6,25	6,25	ND	ND	ND	ND
[Arg] ¹¹ M- PONTX- Dq3a [1- 15]	1,56	1,56	ND	ND	ND	ND
[Lys] ³ M-PONTX- Dq3a [1-15]	1,56	1,56	ND	ND	ND	ND
[Lys] ⁴ M-PONTX- Dq3a [1-15]	6,25	6,25	ND	ND	ND	ND
[Lys] ¹⁰ M- PONTX- Dq3a [1- 15]	> 25	> 25	ND	ND	ND	ND
Oxacilina	0,39	0,39	0,78	400	400	100
Vancomicina	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,39

Fonte: O autor (2023). μ M: micromolar; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; ATCC: American Type Culture Collection; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CLM: Concentração Letal Mínima; CIMB: Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme; ND: Não Determinado.

Com o intuito de avaliar a capacidade que [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a teriam em induzir a permeabilidade da membrana bacteriana, foi realizado o ensaio do cristal violeta (CV) em cepas 6538p tratadas nas concentrações correspondentes a CIM, CLM e 2 x CLM, utilizando a CIM da oxacilina como controle positivo e tampão fosfato-salino como controle negativo. Os peptídeos testados foram capazes de aumentar a captação de cristal violeta, de forma mais exacerbada que os dois controles utilizados. Enquanto OXA e EDTA aumentaram a captação em cerca de 60%, [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15] foram capazes de aumentar a captação em 73 e 71%, respectivamente, isso apenas na concentração mais baixa testada para ambos os peptídeos.

Na maior concentração testada, [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] se destacou, aumentando a captação em 82% (Figura 9B). Esse achado sugere que esses peptídeos são capazes de influenciar a permeabilidade da membrana bacteriana em baixas concentrações e de forma mais evidente do que a droga de referência para o tratamento de infecções mediadas por MSSA.

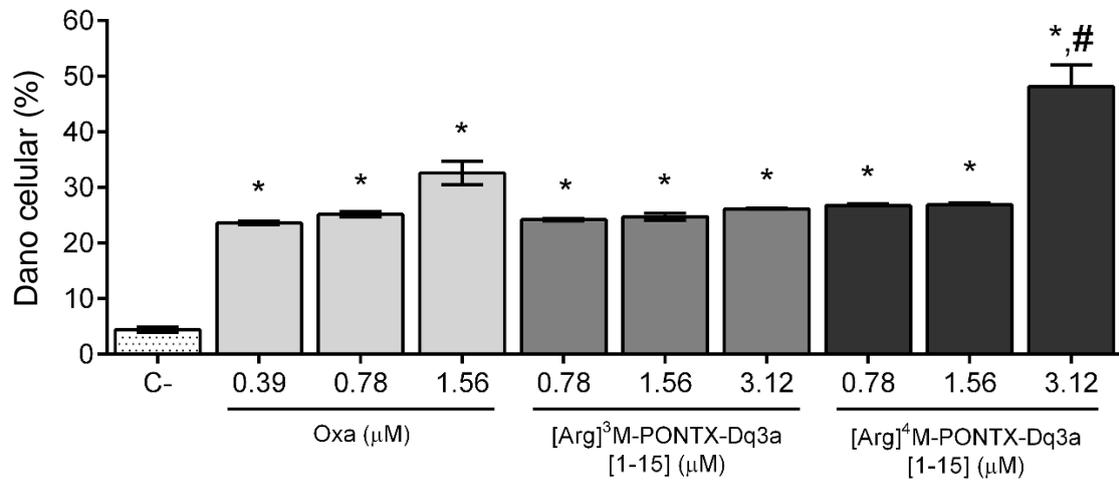
Figura 8: Captação do cristal violeta pelo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p tratados com dinoponeratoxinas modificadas.



Fonte: Elaborada pelo autor. CT: controle, células tratadas com tampão fosfato em salina; OXA: células tratadas com oxacilina 0,39 µM. EDTA: células tratadas com EDTA dissódico 0,25M. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05 em relação ao C- e #p<0,05 em relação aos grupo OXA.

Corroborando com os resultados do cristal violeta, a citometria de fluxo evidenciou que, nas concentrações testadas, o perfil de dano celular apresentado pelos peptídeos foi similar ao da oxacilina em relação aos controles negativo, destacando-se a concentração de 3,12 µM do [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a onde foi possível observar uma maior porcentagem de células danificadas quando comparados aos grupos de oxacilina utilizados. (Figura 9).

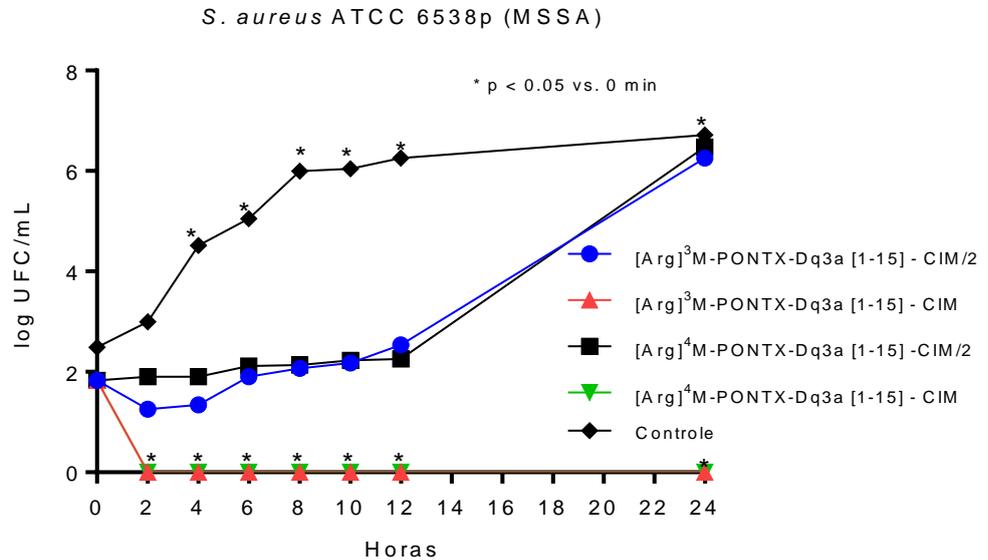
Figura 9: Demonstração do dano celular em *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p tratados com dinoponerotoxinas modificadas por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborada pelo autor. C-: controle, células tratadas com tampão fosfato em salina; Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com * $p < 0,05$ em relação ao C- e # $p < 0,05$ em relação aos grupos Oxa.

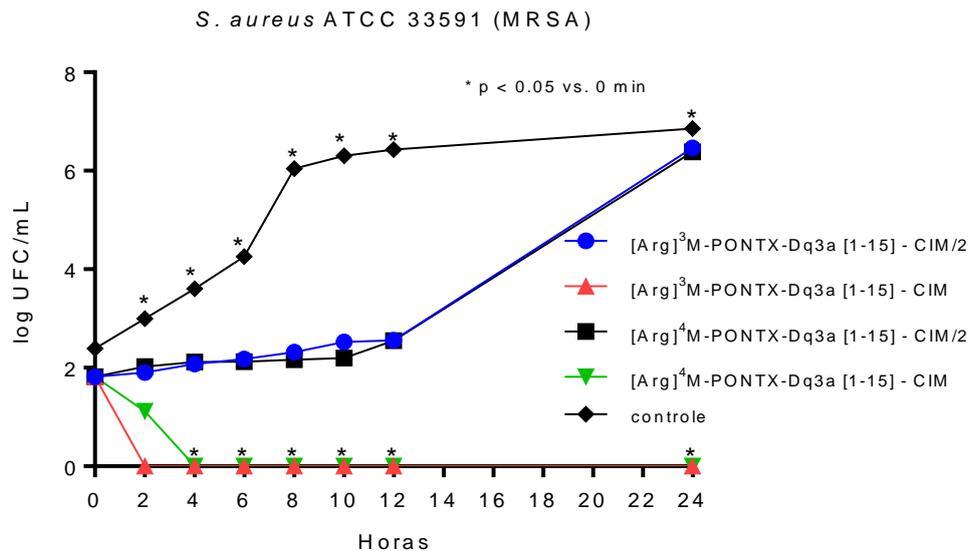
Através do ensaio do tempo de morte foi possível verificar que ambos os peptídeos testados foram capazes de eliminar todas as unidades MSSA após 2 horas de contato quando tratados com MIC. Para MRSA, esse tempo aumentou para 4 horas para o tratamento com peptídeo R4. É importante ressaltar que, para o tratamento com $\frac{1}{2}$ MIC, ambas as cepas apresentaram número constante de UFC/mL até 12h, o que pode indicar um efeito bacteriostático (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Efeito do tempo de exposição de [Arg]³M-PONTX-Dq3a e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a na viabilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P



Fonte: Elaborada pelo autor. C-: controle, células tratadas com tampão fosfato em salina; CIM: Concentração inibitória mínima. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com * $p < 0,05$ em relação tempo 0 min.

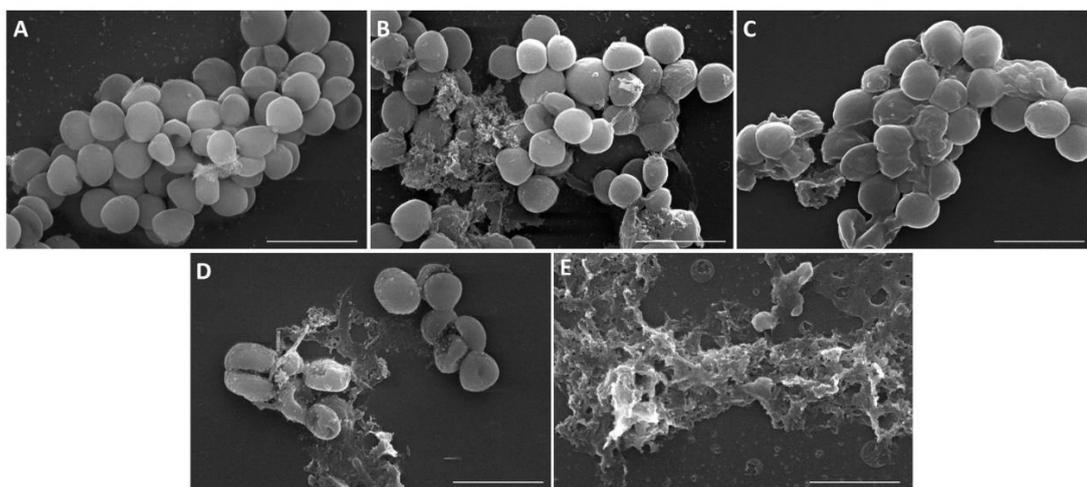
Figura 11: Efeito do tempo de exposição de [Arg]³M-PONTX-Dq3a e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a na viabilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591



Fonte: Elaborada pelo autor. C-: controle, células tratadas com tampão fosfato em salina; CIM: Concentração inibitória mínima. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com * $p < 0,05$ em relação tempo 0 min.

Como forma de registrar a ação realizada pelos peptídeos modificados na membrana bacteriana, foi realizada microscopia eletrônica de varredura. *S. aureus* tratado com PBS demonstrou integridade da superfície da membrana e aderência intercelular característica (Figura 12A). O tratamento na menor concentração testada (0,78 μM) de ambos os peptídeos proporcionou o rompimento da membrana celular (Figuras 12B e 12D), enquanto a CLM de [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] desestabilizou a interação intercelular (Figura 12C, observe células ainda unidas mas se desintegrando com aspecto rugoso). A CLM de [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] provocou a erradicação completa da bactéria, pois só é possível notar restos celulares na imagem (Figura 12E).

Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* 6538p

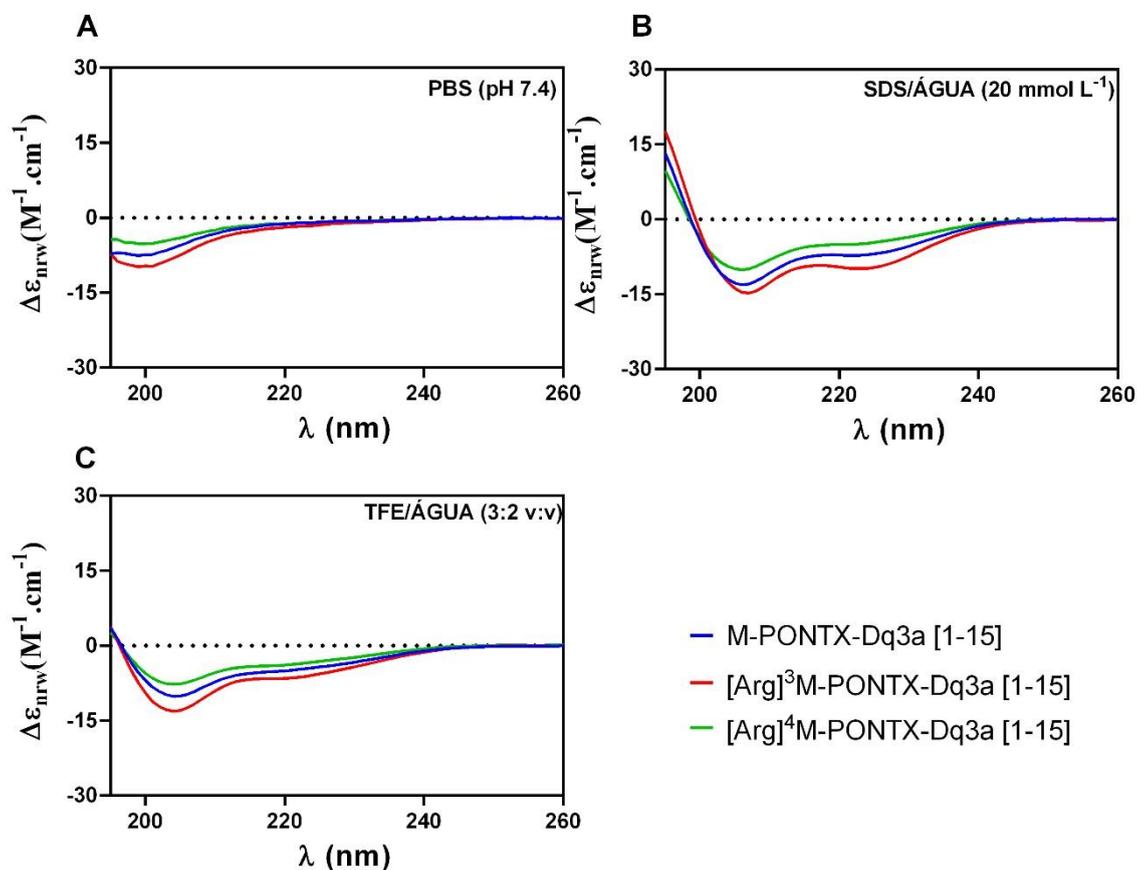


Fonte: Elaborada pelo autor. Células sem tratamento com peptídeos análogos demonstrando forma, tamanho e aderência intercelular regulares (A). Células expostas a [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] 0,78 μM mostrando alguma ruptura de membrana (B). Células expostas a [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] 1,56 μM mostrando dano e deformação entre a população de células (C). Células expostas a [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] 0,78 μM demonstrando lesão celular e presença de bolhas na superfície de algumas células (D). Células expostas a [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] 1,56 μM mostrando dano celular severo (E). Barra de escala: 2 μm .

Através dos estudos de dicroísmo circular foi possível evidenciar a estrutura secundária adotada por cada peptídeo. Ademais, a utilização deste ensaio possibilitou observar o comportamento dessas estruturas em meio aquoso, tampão fosfato salino, SDS e TFE. Como mostrado na figura 13, os peptídeos substituídos por arginina não apresentaram mudanças consideráveis na estrutura secundária, quando comparados entre si e em comparação ao peptídeo não substituído M-PONTX-Dq3a [1-15]. Esses dados encontram-se ilustrados na

Tabela 3, a qual demonstra que a f_H dos peptídeos não mudou ao realizar as substituições, mostrando frações helicoidais semelhantes nos três meios testados.

Figura 13: Espectros do ensaio de dicroísmo circular dos peptídeos testados.



Fonte: Elaborada pelo autor. Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos $[Arg]^3M$ -PONTX-Dq3a [1-15], $[Arg]^4M$ -PONTX-Dq3a [1-15] e M-PONTX-Dq3a [1-15] obtidos em (A) PBS (pH 7,4), (B) SDS (20 mmol/L) e (C) TFE/água (60%; v:v). Os espectros foram registrados após quatro acumulações a 20 °C, usando uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm, entre 195 e 260 nm a 100 nm min⁻¹, com uma largura de banda de 0,5 nm. Os peptídeos foram usados a uma concentração de 40 μmol/L

Tabela 3: Fração helicoidal (f_H) dos peptídeos

Peptídeos	Fração Helicoidal (f_H)		
	PBS	SDS	TFE
M-PONTX-Dq3a [1-15]	0,09	0,57	0,37
$[Arg]^3M$ -PONTX-Dq3a [1-15]	0,14	0,77	0,50
$[Arg]^4M$ -PONTX-Dq3a [1-15]	0,09	0,40	0,29

Fonte: O autor (2023). A fração helicoidal dos peptídeos (f_H) em diferentes meios foi calculada usando a teoria de hélice-molde de Lifson-Roig, descrita por Lifson et al. (1961).

7. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana surgiu como um grande problema de saúde pública nos últimos anos devido ao uso discriminado de antibióticos, especialmente durante a pandemia de COVID-19 (Lai *et al.*, 2021). Desta forma, uma ampla gama de biomoléculas tornou-se essencial para o desenvolvimento de novos fármacos para microrganismos resistentes.

Os peptídeos antimicrobianos, principalmente os derivados de venenos e toxinas de animais invertebrados, destacam-se neste cenário por apresentarem eficácia clínica com atividade de amplo espectro contra uma variedade de bactérias gram-positivas (Rocha *et al.*, 2021), Gram-negativas (Dodou Lima, Cavalcante e Rádis-Baptista, 2020) e fungos (Perez-Rodriguez *et al.*, 2022) em baixas concentrações, com rápido tempo de ação.

O presente estudo procurou avaliar a ação antimicrobiana de um fragmento e análogos de arginina e lisina do M-PONTX-Dq3a sobre duas cepas de *Staphylococcus aureus*, uma sensível e outra resistente à meticilina. O fragmento M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou valores de CIM e CLM (1,56 e 3,12 μM , respectivamente) duas vezes maiores que o peptídeo parental (0,78 e 1,56 μM) ao passo que os análogos de arginina [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] se mostraram como mais eficazes com CIM e CLM de 0,78 μM , concentrações estas menores àquelas notadas tanto pelo peptídeo parental como pelo seu fragmento. Além disso, o [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] destacou-se na inibição da formação de biofilme de ambas as cepas testadas em concentrações semelhantes ao peptídeo M-PONTX-Dq3a (Rocha *et al.*, 2021).

Os valores apresentados pelos dois análogos mais promissores aqui descritos são inferiores à faixa MIC relatada na literatura para algumas pilosulinas, correspondendo a concentrações abaixo de 6,5 μM (Touchard *et al.*, 2018). Quando comparados com a ação dos antibióticos usados como controles positivos, [Arg]³M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1-15] mantiveram sua ação em concentrações baixas e próximas às apresentadas pelas drogas, com destaque para a baixa concentração dos dois peptídeos em relação à demonstrada pela oxacilina na cepa resistente (0,78 μM versus 400 μM).

É importante ressaltar que os peptídeos substituídos por arginina apresentaram melhores efeitos quando comparados aos substituídos por lisina. Estudos de design racional de peptídeos antimicrobianos usam aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, etc.) e aminoácidos hidrofílicos (arginina, lisina, etc.) arrançados alternadamente na sequência peptídica que permite que as moléculas tenham boa solubilidade em água e solventes orgânicos. Além disso, o fato permite que peptídeos anfifílicos carregados positivamente, quando em contato com

membranas hidrofóbicas, tendam a ter uma afinidade por interfaces de membrana carregadas negativamente e levem ainda mais a danos no envelope e morte celular (Cheng e Zeng, 2022). Nesse contexto de design racional de antimicrobianos, um estudo mostrou que uma estrutura peptídica sintética foi capaz de apresentar melhor penetração no biofilme de MRSA devido ao óxido nítrico (NO), gás produzido a partir da oxidação de resíduos de arginina, corroborando os achados do presente estudo (Zheng *et al.*, 2022).

As análises conformacionais foram realizadas em PBS, micelas de SDS e TFE/água (meio indutor de hélice). Os peptídeos sintetizados apresentaram diferentes comportamentos de estrutura secundária quando comparados ao M-PONTX-Dq3a [1-15], contribuindo para uma melhor atividade antimicrobiana dos análogos.

O peptídeo [Arg]³-M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou maior conteúdo helicoidal (f_H : 0,77 em SDS e 0,50 em TFE/água) do que o M-PONTX-Dq3a [1-15] (f_H : 0,57 em SDS e 0,37 em TFE/água). Essas diferenças foram devido à remoção do aminoácido glicina na posição 3. A ausência de uma cadeia lateral torna a glicina o aminoácido mais flexível, portanto, raramente é encontrado em uma hélice. (Yang e Honig, 1995). Assim, a substituição do resíduo Gly por resíduo Arg favorece a conformação helicoidal, permitindo interações hidrofóbicas (peptídeo-membrana) (Seelig e Ganz, 1991).

O [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou menor conteúdo helicoidal (f_H : 0,40 em SDS e 0,29 em TFE/água), enquanto o M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou (f_H : 0,57 e 0,37, respectivamente). A substituição da treonina pelo resíduo arginina na posição 4, possivelmente suprimiu o efeito de estabilização helicoidal intramolecular do grupo hidroxila da cadeia lateral deste aminoácido (Pedron *et al.*, 2019).

Esses resultados demonstraram que a conformação helicoidal deve ter uma influência significativa na atividade biológica deste peptídeo. No entanto, a sequência primária desses compostos é muito importante para o estabelecimento de interações com a membrana de microrganismos.

Para investigar o eventual mecanismo de ação na membrana bacteriana, foi realizado o ensaio do cristal violeta. Observou-se que ambos os peptídeos modificados foram capazes de aumentar a absorção do cristal violeta em taxas entre 71 e 82% quando comparados ao controle e à oxacilina, percentual superior ao relatado para M-PONTX-Dq3a (18 a 32%) de acordo com Rocha e colaboradores (2021). A influência dos peptídeos modificados na viabilidade celular de *S. aureus* também foi evidenciada por citometria de fluxo, demonstrando que a taxa de células danificadas foi semelhante entre peptídeos e oxacilina para MSSA. Nosso trabalho demonstrou que esses dois peptídeos modificados foram capazes de causar membrana drástica

com a presença de múltiplas bolhas projetando-se da superfície celular, confirmando o efeito na membrana.

A melhora do efeito evidenciada no presente trabalho pode estar associada à substituição pela arginina, uma vez que peptídeos contendo este aminoácido são mais efetivos em permeabilizar membranas carregadas negativamente devido ao favorecimento energético da inserção de grupos guanidínio em regiões hidrofóbicas (Schmidt *et al.*, 2012). A carga positiva de um peptídeo antimicrobiano é essencial para garantir sua interação com as membranas biológicas, uma vez que essa estrutura é carregada negativamente, gerando atração entre essas partes (Torres *et al.*, 2017).

Além disso, modificações por resíduos básicos, como as realizadas nos análogos testados neste estudo, conferem aumento da carga positiva dos peptídeos, uma vez que esses aminoácidos possuem carga positiva em pH neutro. Desta forma, as cadeias laterais carregadas positivamente são orientadas externamente ao eixo da conformação α -hélice, compondo a face hidrofílica das hélices anfipáticas. O mecanismo de ação dos peptídeos é determinado justamente por esse tipo de interação, onde as moléculas de AMP, após interação inicial com a membrana, podem promover o rompimento da membrana ou serem internalizadas nas células (Torres *et al.*, 2018). No presente trabalho, a interação dos peptídeos com a membrana, através da alteração do potencial elétrico, causou desestabilização da interação intercelular associada ao comprometimento da integridade da membrana, visto no MEV.

Vários determinantes estão intimamente relacionados com a ação antimicrobiana e citolítica dos peptídeos antimicrobianos. Estudos demonstram que o crescimento da cationicidade, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e conformação α -hélice de peptídeos antimicrobianos nativos tem um efeito no espectro desse efeito antibiótico (Nguyen *et al.*, 2011). O conhecimento mais aprofundado dessas características permite entender as ações empregadas por essas moléculas nas infecções, bem como o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para reduzir os custos de produção, suprimir a capacidade dos patógenos de gerar resistência e aumentar a potencial terapêutico desses peptídeos.

As substituições por arginina nas posições 3 e 4 permitiram aumentar os valores de hidrofobicidade e momento hidrofóbico dos análogos quando comparados ao peptídeo parental e isso influenciou diretamente na melhora do efeito antimicrobiano, reduzindo os valores das concentrações letais mínimas e aumentando a porcentagem de absorção do cristal violeta pelas células microbianas.

Um estudo realizado por La Salud Bea e colaboradores (2015), utilizando cinco análogos desenvolvidos a partir do PAM do escorpião *Buthus martensii* Karsh, demonstrou que

peptídeos análogos com maiores momentos hidrofóbicos apresentaram maior atividade antimicrobiana. Resultados semelhantes foram observados por Parente e colaboradores (2018), onde os dois peptídeos análogos estudados, com momentos hidrofóbicos de 0,66 e 0,72, apresentaram maior atividade antimicrobiana e maior espectro de ação, quando comparados ao peptídeo nativo que apresentou momento hidrofóbico de 0,57. Isso nos permite inferir que o momento hidrofóbico é uma característica que modula a atividade do peptídeo antimicrobiano por meio de interações hidrofóbicas entre o peptídeo e a membrana bacteriana.

É importante ressaltar que mesmo melhorando esses parâmetros, o efeito pode estar relacionado a outros fatores. Isso pode ser observado em [Arg]⁷M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]¹⁰M-PONTX-Dq3a [1-15], onde os valores de hidrofobicidade e momento hidrofóbico foram melhorados quando comparados aos análogos originais, mas as concentrações de MIC e MLC aumentaram 3 a 4 vezes mais. Isso implica que essas posições são importantes para a atividade antimicrobiana desses peptídeos.

Além disso, os peptídeos mostraram um perfil bacteriostático no ensaio time-kill. Vários PAM mostraram um efeito semelhante. Por exemplo, o trabalho mostrou que a Nisina Z, um peptídeo catiônico lantibiótico bacteriocina de 34 resíduos de aminoácidos produzido principalmente por *Lactococcus lactis*, interage com o lipídeo II precursor da parede celular de *S. aureus*, levando à formação de poros, que se acredita causar rápida dissipação do potencial eletrostático transmembrana, causando efeito bacteriostático; essa desestabilização da célula bacteriana resulta na inibição da formação do biofilme (Serrano *et al.*, 2023).

No contexto de PAMs de origem animal, um trabalho avaliou o potencial uso de peptídeos derivados de serpentes no tratamento de infecções respiratórias, obtendo um efeito relacionado à inibição do crescimento de cepas multirresistentes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CREANE *et al.*, 2023). Considerando peptídeos antimicrobianos derivados de invertebrados, um estudo mostrou que uma proteína catiônica codificada por transcriptoma do intestino médio anterior de *Triatoma infestans* medeia o estabelecimento do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, controlando a microbiota (Buarque *et al.*, 2016). Venenos de formigas (Formicidae) são uma fonte promissora de PAM. Por exemplo, estudos com foco no veneno de formigas da Europa Central identificaram vários decapeptídeos lineares curtos e nonapeptídeos semelhantes a peptídeos antimicrobianos no veneno de *Myrmica rubra* e *Myrmica ruginodis*; o peptídeo U-MYRTX-Mrug5a mostrou efeitos antimicrobianos moderadamente potentes contra *Staphylococcus epidermidis* com base na inibição do crescimento (efeito bacteriostático) (Hurka *et al.*, 2022).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo descreveu dois peptídeos antimicrobianos ativos contra MSSA e MRSA que também são capazes de inibir a formação de seus biofilmes. [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15] surgem como uma nova alternativa de pesquisa de substâncias para o tratamento de cepas resistentes e/ou formadoras de biofilme.

REFERÊNCIAS

- AHMAD-MANSOUR, N.; LOUBET, P.; POUGET, C.; DUNYACH-REMY, C.; SOTTO, A.; LAVIGNE, J.-P.; MOLLE, V. Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 677, 2021.
- ARAÚJO, A.; RODRIGUES, Z. Foraging behavior of the queenless ant *Dinoponera quadriceps* Santschi (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 159–164, 2006.
- ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M. K. F.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P. J.; ZHU, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11691, 2021.
- BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 4–16, 2019.
- BOUILLER, K.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; CHIROUZE, C. Human Infection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: A Review. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1737, 2020.
- BUARQUE, D. S.; GOMES, C. M.; ARAÚJO, R. N.; PEREIRA, M. H.; FERREIRA, R. C.; GUARNERI, A. A.; TANAKA, A. S. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. **Biochimie**, [s. l.], v. 123, p. 138–143, 2016.
- CHALMERS, S. J.; WYLAM, M. E. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Treatment Options. Em: JI, Y. (Ed.). **Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2069p. 229–251.
- CHENG, Q.; ZENG, P. Hydrophobic-hydrophilic Alternation: An effective Pattern to de novo Designed Antimicrobial Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 28, n. 44, p. 3527–3537, 2022.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.
- CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.
- COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 42, n. Supplement_1, p. S25–S34, 2006.

DAVIS, J.; HAL, S.; TONG, S. Combination Antibiotic Treatment of Serious Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 01, p. 003–016, 2015

D’COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W. L.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, [s. l.], v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011.

DE KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLOS Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

DE LA SALUD BEA, R.; ASCUITTO, M. R.; DE JOHNSON, L. E. L. Synthesis of analogs of peptides from *Buthus martensii* scorpion venom with potential antibiotic activity. **Peptides**, [s. l.], v. 68, p. 228–232, 2015.

DIJKSTEEL, G. S.; ULRICH, M. M. W.; MIDDELKOOP, E.; BOEKEMA, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 616979, 2021

DODOU LIMA, H. V.; DE PAULA CAVALCANTE, C. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antifungal In Vitro Activity of Pilosulin- and Ponericin-Like Peptides from the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* and Synergistic Effects with Antimycotic Drugs. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 354, 2020.

DODOU LIMA, H. V.; SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE, C.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antimicrobial activity of synthetic Dq-3162, a 28-residue ponericin G-like dinoponeratoxin from the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom, against carbapenem-resistant bacteria. **Toxicon**, [s. l.], v. 187, p. 19–28, 2020.

ERDEM BÜYÜKKIRAZ, M.; KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 3, p. 1573–1596, 2022.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **External quality assessment of laboratory performance: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet), 2017**. LU: Publications Office, 2018.

FOSTER, C. E.; KOK, M.; FLORES, A. R.; MINARD, C. G.; LUNA, R. A.; LAMBERTH, L. B.; KAPLAN, S. L.; HULTEN, K. G. Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. e0235115, 2020.

FRIDKIN, S. K.; HAGEMAN, J. C.; MORRISON, M.; SANZA, L. T.; COMO-SABETTI, K.; JERNIGAN, J. A.; HARRIMAN, K.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; FARLEY, M. M. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 352, n. 14, p. 1436–1444, 2005.

FRY, D. E. Antimicrobial Peptides. **Surgical Infections**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 804–811, 2018.

HARKINS, C. P.; PICHON, B.; DOUMITH, M.; PARKHILL, J.; WESTH, H.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H.; BENTLEY, S. D.; KEARNS, A. M.; HOLDEN, M. T. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 130, 2017.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 211, 2017.

HERNÁNDEZ-ARISTIZÁBAL, I.; OCAMPO-IBÁÑEZ, I. D. Antimicrobial Peptides with Antibacterial Activity against Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: Classification, Structures, and Mechanisms of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 7927, 2021.

HIROSE, H.; TAKEUCHI, T.; OSAKADA, H.; PUJALS, S.; KATAYAMA, S.; NAKASE, I.; KOBAYASHI, S.; HARAGUCHI, T.; FUTAKI, S. Transient Focal Membrane Deformation Induced by Arginine-rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 984–993, 2012.

HOLMES, A. H.; MOORE, L. S. P.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P. J.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 582779, 2020.

HUANG, Y.-C.; CHEN, C.-J. Detection and phylogeny of *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in Taiwan. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 15, 2020.

HURKA, S.; LÜDDECKE, T.; PAAS, A.; DERSCH, L.; SCHULTE, L.; EICHBERG, J.; HARDES, K.; BRINKROLF, K.; VILCINSKAS, A. Bioactivity Profiling of In Silico Predicted Linear Toxins from the Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. **Toxins**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 846, 2022.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 7.2.29, 2019.

KIM, H.; AQUINO, M.; IZADJOO, M. Development and assessment of a high-throughput biofilm and biomass testing platform. **Journal of Wound Care**, [s. l.], v. 30, n. Sup7, p. S36–S46, 2021.

KWIECINSKI, J. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 53, p. 51–60, 2020.

LAI, C.-C.; CHEN, S.-Y.; KO, W.-C.; HSUEH, P.-R. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 106324, 2021.

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6490, p. eaau5480, 2020.

LEE, A. S.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J.; MALHOTRA-KUMAR, S.; PESCHEL, A.; HARBARTH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 18033, 2018.

LEVINE, D. P. Vancomycin: A History. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 42, n. Supplement_1, p. S5–S12, 2006.

LEVIN-REISMAN, I.; BRAUNER, A.; RONIN, I.; BALABAN, N. Q. Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 29, p. 14734–14739, 2019.

LI, J.; KOH, J.-J.; LIU, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; VERMA, C. S.; BEUERMAN, R. W. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017.

LIFSON, S.; ROIG, A. On the Theory of Helix—Coil Transition in Polypeptides. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1963–1974, 1961.

LIMA, D. B.; MELLO, C. P.; BANDEIRA, I. C. J.; PESSOA BEZERRA DE MENEZES, R. R. P.; SAMPAIO, T. L.; FALCÃO, C. B.; MORLIGHEM, J.-É. R. L.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A. M. C. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display *in vitro* antitrypanosomal activity. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 399, n. 2, p. 187–196, 2018.

LIMA, D. B.; SOUSA, P. L.; TORRES, A. F. C.; RODRIGUES, K. A. D. F.; MELLO, C. P.; MENEZES, R. R. P. P. B. D.; TESSAROLO, L. D.; QUINET, Y. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; MARTINS, A. M. C. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 120, p. 128–132, 2016.

LIMA, D. B.; TORRES, A. F. C.; MELLO, C. P.; DE MENEZES, R. R. P. P. B.; SAMPAIO, T. L.; CANUTO, J. A.; DA SILVA, J. J. A.; FREIRE, V. N.; QUINET, Y. P.; HAVT, A.; MONTEIRO, H. S. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; MARTINS, A. M. C. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 390–396, 2014.

LIMA, L. M.; SILVA, B. N. M. D.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 208, p. 112829, 2020

LISOWSKA-ŁYSIAK, K.; LAUTERBACH, R.; MIĘDZOBRODZKI, J.; KOSECKA-STROJEK, M. Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review. **Polish Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.

LOPES, K. S.; RIOS, E. R. V.; LIMA, C. N. D. C.; LINHARES, M. I.; TORRES, A. F. C.; HAVT, A.; QUINET, Y. P.; FONTELES, M. M. D. F.; MARTINS, A. M. C. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 141–145, 2013.

MADEIRA, J. D. C.; QUINET, Y. P.; NONATO, D. T. T.; SOUSA, P. L.; CHAVES, E. M. C.; JÚNIOR, J. E. R. H.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. Novel Pharmacological Properties of *Dinoponera quadriceps* Giant Ant Venom. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1934578X1501000, 2015.

MAGANA, M.; PUSHPANATHAN, M.; SANTOS, A. L.; LEANSE, L.; FERNANDEZ, M.; IOANNIDIS, A.; GIULIANOTTI, M. A.; APIDIANAKIS, Y.; BRADFUTE, S.; FERGUSON, A. L.; CHERKASOV, A.; SELEEM, M. N.; PINILLA, C.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; LAZARIDIS, T.; DAI, T.; HOUGHTEN, R. A.; HANCOCK, R. E. W.; TEGOS, G. P. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. e216–e230, 2020.

MELLO, C. P.; LIMA, D. B.; MENEZES, R. R. P. P. B. D.; BANDEIRA, I. C. J.; TESSAROLO, L. D.; SAMPAIO, T. L.; FALCÃO, C. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A. M. C. Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**, [s. l.], v. 130, p. 56–62, 2017.

MILLER, L. S.; FOWLER, V. G.; SHUKLA, S. K.; ROSE, W. E.; PROCTOR, R. A. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 123–153, 2020.

MIYACHIRO, M. M.; CONTRERAS-MARTEL, C.; DESSEN, A. Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Bacterial Cell Wall Elongation Complexes. Em: HARRIS, J. R.; MARLES-WRIGHT, J. (Eds.). **Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function**. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 93p. 273–289.

MONTEIRO, M. L.; LIMA, D. B.; FREIRE, K. A.; NICOLASKI PEDRON, C.; MAGALHÃES, E. P.; SILVA, B. P.; GARCÍA-JAREÑO, A. B.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, J. V. S.; MARINHO, M. M.; MENEZES, R. R. P. P. B. D.; ORZAÉZ, M.; OLIVEIRA JUNIOR, V. X.; MARTINS, A. M. C. Rational design of a trypanocidal peptide derived from *Dinoponera quadriceps* venom. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 241, p. 114624, 2022.

MWANGI, J.; YIN, Y.; WANG, G.; YANG, M.; LI, Y.; ZHANG, Z.; LAI, R. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 52, p. 26516–26522, 2019.

NASSER, A.; DALLAL, M. M. S.; JAHANBAKHSI, S.; AZIMI, T.; NIKOUEI, L. *Staphylococcus aureus*: Biofilm Formation and Strategies Against it. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 664–678, 2022.

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

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. J. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 4, 2016

OTHMAN, L.; SLEIMAN, A.; ABDEL-MASSIH, R. M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 911, 2019

PAIVA, R. V. S.; BRANDÃO, C. R. F. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera Formicidae). **Ethology Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 297–312, 1995.

PARENTE, A.; DANIELE-SILVA, A.; FURTADO, A.; MELO, M.; LACERDA, A.; QUEIROZ, M.; MORENO, C.; SANTOS, E.; ROCHA, H.; BARBOSA, E.; CARVALHO, E.; SILVA-JÚNIOR, A.; SILVA, M.; FERNANDES-PEDROSA, M. Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. **Toxins**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 161, 2018.

PEDRON, C. N.; DE OLIVEIRA, C. S.; DA SILVA, A. F.; ANDRADE, G. P.; DA SILVA PINHAL, M. A.; CERCHIARO, G.; DA SILVA JUNIOR, P. I.; DA SILVA, F. D.; TORRES, M. D. T.; OLIVEIRA, V. X. The effect of lysine substitutions in the biological activities of the scorpion venom peptide VmCT1. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 136, p. 104952, 2019.

PEREZ-RODRIGUEZ, A.; ERASO, E.; QUINDÓS, G.; MATEO, E. Antimicrobial Peptides with Anti-Candida Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 16, p. 9264, 2022.

RICE, A.; WERESZCZYNSKI, J. Probing the disparate effects of arginine and lysine residues on antimicrobial peptide/bilayer association. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1859, n. 10, p. 1941–1950, 2017.

ROCHA, L. Q.; ORZAÉZ, M.; GARCÍA-JAREÑO, A. B.; NUNES, J. V. S.; DUQUE, B. R.; SAMPAIO, T. L.; ALVES, R. S.; LIMA, D. B.; MARTINS, A. M. C. *Dinoponera quadriceps* venom as a source of active agents against *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, [s. l.], v. 189, p. 33–38, 2021.

SCHIBLI, D. J.; NGUYEN, L. T.; KERNAGHAN, S. D.; REKDAL, Ø.; VOGEL, H. J. Structure-Function Analysis of Tritrpticin Analogs: Potential Relationships between Antimicrobial Activities, Model Membrane Interactions, and Their Micelle-Bound NMR Structures. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 91, n. 12, p. 4413–4426, 2006.

SCHMIDT, N. W.; TAI, K. P.; KAMDAR, K.; MISHRA, A.; LAI, G. H.; ZHAO, K.; OUELLETTE, A. J.; WONG, G. C. L. Arginine in α -Defensins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 26, p. 21866–21872, 2012.

SEELIG, J.; GANZ, P. Nonclassical hydrophobic effect in membrane binding equilibria. **Biochemistry**, [s. l.], v. 30, n. 38, p. 9354–9359, 1991.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, 2013.

SERRANO, I.; ALHINHO, B.; CUNHA, E.; TAVARES, L.; TRINDADE, A.; OLIVEIRA, M. Bacteriostatic and Antibiofilm Efficacy of a Nisin Z Solution against Co-Cultures of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Diabetic Foot Infections. **Life**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 504, 2023.

SOUSA, P. L.; QUINET, Y.; PONTE, E. L.; DO VALE, J. F.; TORRES, A. F. C.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 213–216, 2012.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STRAUME, D.; PIECHOWIAK, K. W.; OLSEN, S.; STAMSÅS, G. A.; BERG, K. H.; KJOS, M.; HEGGENHOUGEN, M. V.; ALCORLO, M.; HERMOSO, J. A.; HÅVARSTEIN, L. S. Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 11, p. 6129–6138, 2020.

TORRES, A. F. C.; HUANG, C.; CHONG, C.-M.; LEUNG, S. W.; PRIETO-DA-SILVA, Á. R. B.; HAVT, A.; QUINET, Y. P.; MARTINS, A. M. C.; LEE, S. M. Y.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Transcriptome Analysis in Venom Gland of the Predatory Giant Ant *Dinoponera quadriceps*: Insights into the Polypeptide Toxin Arsenal of Hymenopterans. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e87556, 2014.

TORRES, M. D. T.; PEDRON, C. N.; DA SILVA LIMA, J. A.; DA SILVA, P. I.; DA SILVA, F. D.; OLIVEIRA, V. X. Antimicrobial activity of leucine-substituted decoralin analogs with lower hemolytic activity. **Journal of Peptide Science**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 818–823, 2017.

TORRES, M. D. T.; PEDRON, C. N.; HIGASHIKUNI, Y.; KRAMER, R. M.; CARDOSO, M. H.; OSHIRO, K. G. N.; FRANCO, O. L.; SILVA JUNIOR, P. I.; SILVA, F. D.; OLIVEIRA JUNIOR, V. X.; LU, T. K.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. **Communications Biology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 221, 2018.

TOUCHARD, A.; TÉNÉ, N.; SONG, P. C. T.; LEFRANC, B.; LEPRINCE, J.; TREILHOU, M.; BONNAFÉ, E. Deciphering the Molecular Diversity of an Ant Venom Peptidome through a Venomics Approach. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 3503–3516, 2018.

TURNER, N. A.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; MASKARINEC, S. A.; EICHENBERGER, E. M.; SHAH, P. P.; CARUGATI, M.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

UEHARA, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 86, 2022.

VILCINSKAS, A. (ED.). **Yellow Biotechnology I: Insect Biotechnologie in Drug Discovery and Preclinical Research**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. v. 135.

VILCINSKAS, A. Mechanisms of transgenerational immune priming in insects. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 124, p. 104205, 2021.

WANANDY, T.; GUEVEN, N.; DAVIES, N. W.; BROWN, S. G. A.; WIESE, M. D. Pilosulins: A review of the structure and mode of action of venom peptides from an Australian ant *Myrmecia pilosula*. **Toxicon**, [s. l.], v. 98, p. 54–61, 2015

WEINSTEIN, M. P.; PATEL, J. B. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A11**. 11. edition ed. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards, 2018.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, [s. l.], v. 543, n. 7643, p. 15–15, 2017.

XU, S.; ERRABELI, R.; FEENER, D. H.; NOBLE, K.; ATTYGALLE, A. B. Alkyl-Dimethylpyrazines in Mandibular Gland Secretions of Four *Odontomachus* Ant Species (Formicidae: Ponerinae). **Journal of Chemical Ecology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 444–451, 2018.

YANG, A.-S.; HONIG, B. Free Energy Determinants of Secondary Structure Formation: II. Antiparallel β -Sheets. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 252, n. 3, p. 366–376, 1995.

YANG, X.; QIAN, S.; YAO, K.; WANG, L.; LIU, Y.; DONG, F.; SONG, W.; ZHEN, J.; ZHOU, W.; XU, H.; ZHENG, H.; LI, W. Multiresistant ST59-SCCmec IV-t437 clone with strong biofilm-forming capacity was identified predominantly in MRSA isolated from Chinese children. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 733, 2017.

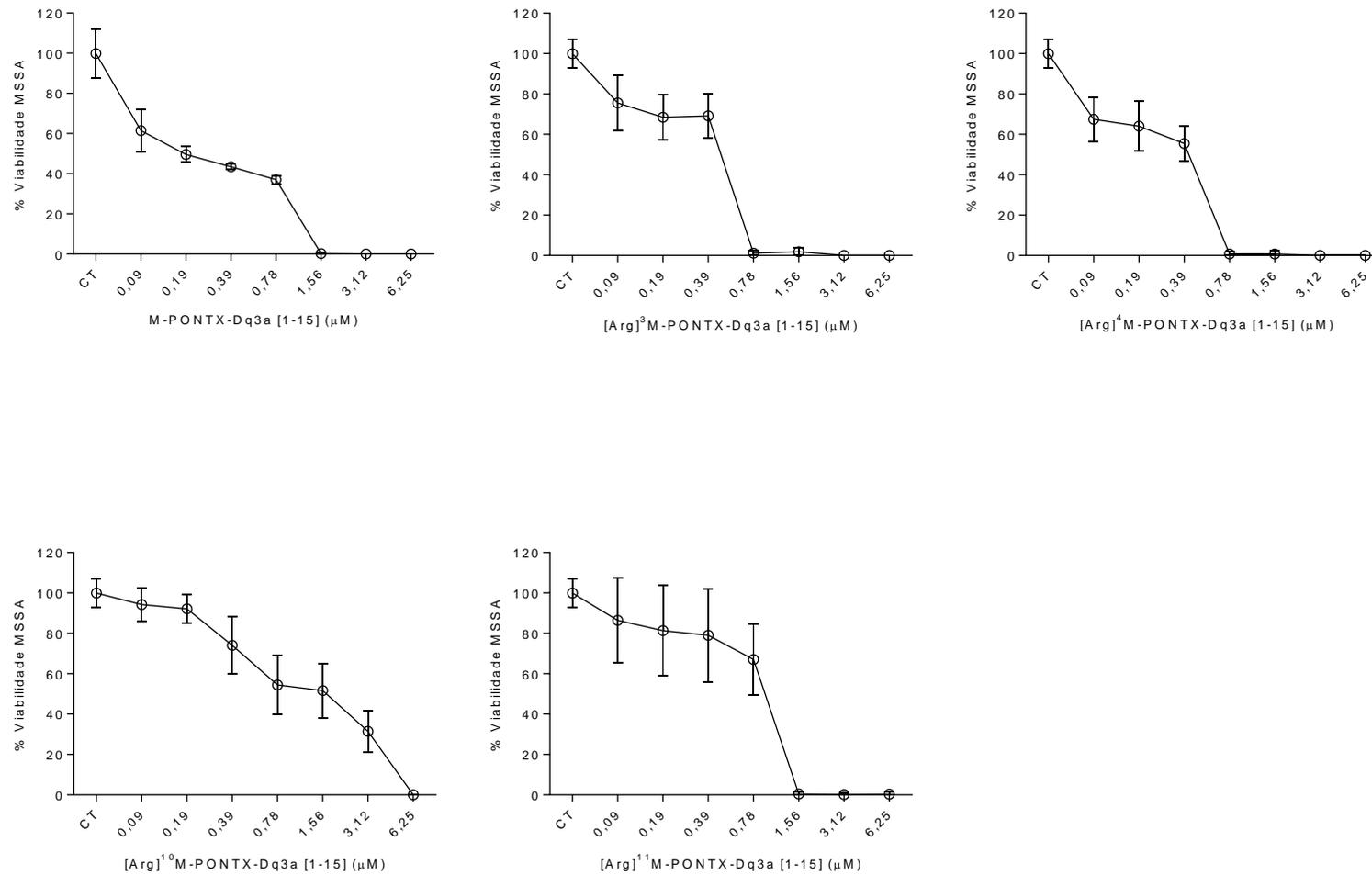
YAVARI, B.; MAHJUB, R.; SAIDIJAM, M.; RAIGANI, M.; SOLEIMANI, M. The Potential Use of Peptides in Cancer Treatment. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 759–770, 2018.

YU, G.; BAEDER, D. Y.; REGOES, R. R.; ROLFF, J. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 285, n. 1874, p. 20172687, 2018.

ZHENG, J.; WANG, W.; GAO, X.; ZHAO, S.; CHEN, W.; LI, J.; LIU, Y. Cascade Catalytically Released Nitric Oxide-Driven Nanomotor with Enhanced Penetration for Antibiofilm. **Small**, [s. l.], v. 18, n. 52, p. 2205252, 2022.

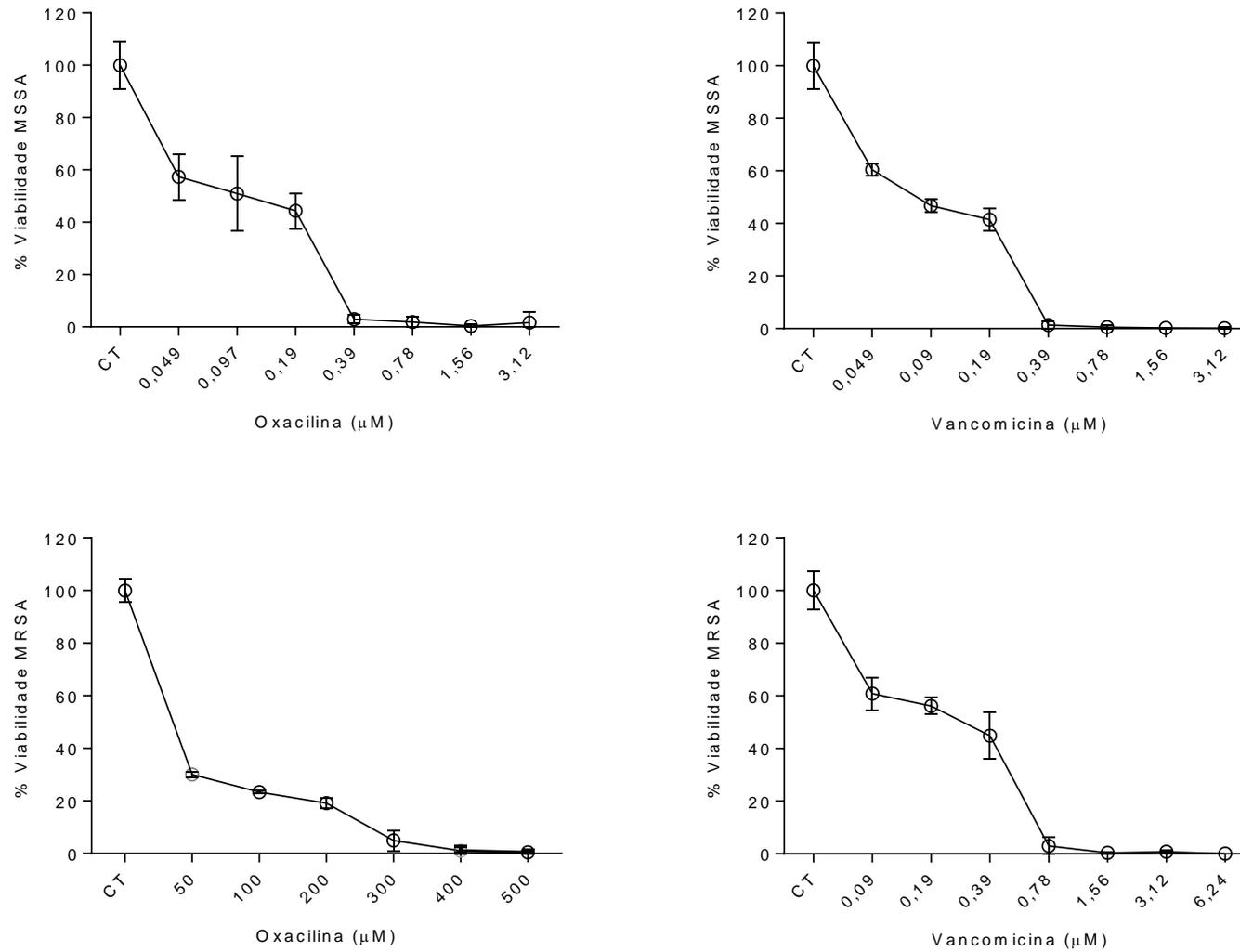
9. APÊNDICE

Figura 14: Efeito do fragmento e dos análogos de arginina sobre cepa de *S. aureus* sensível à meticilina.



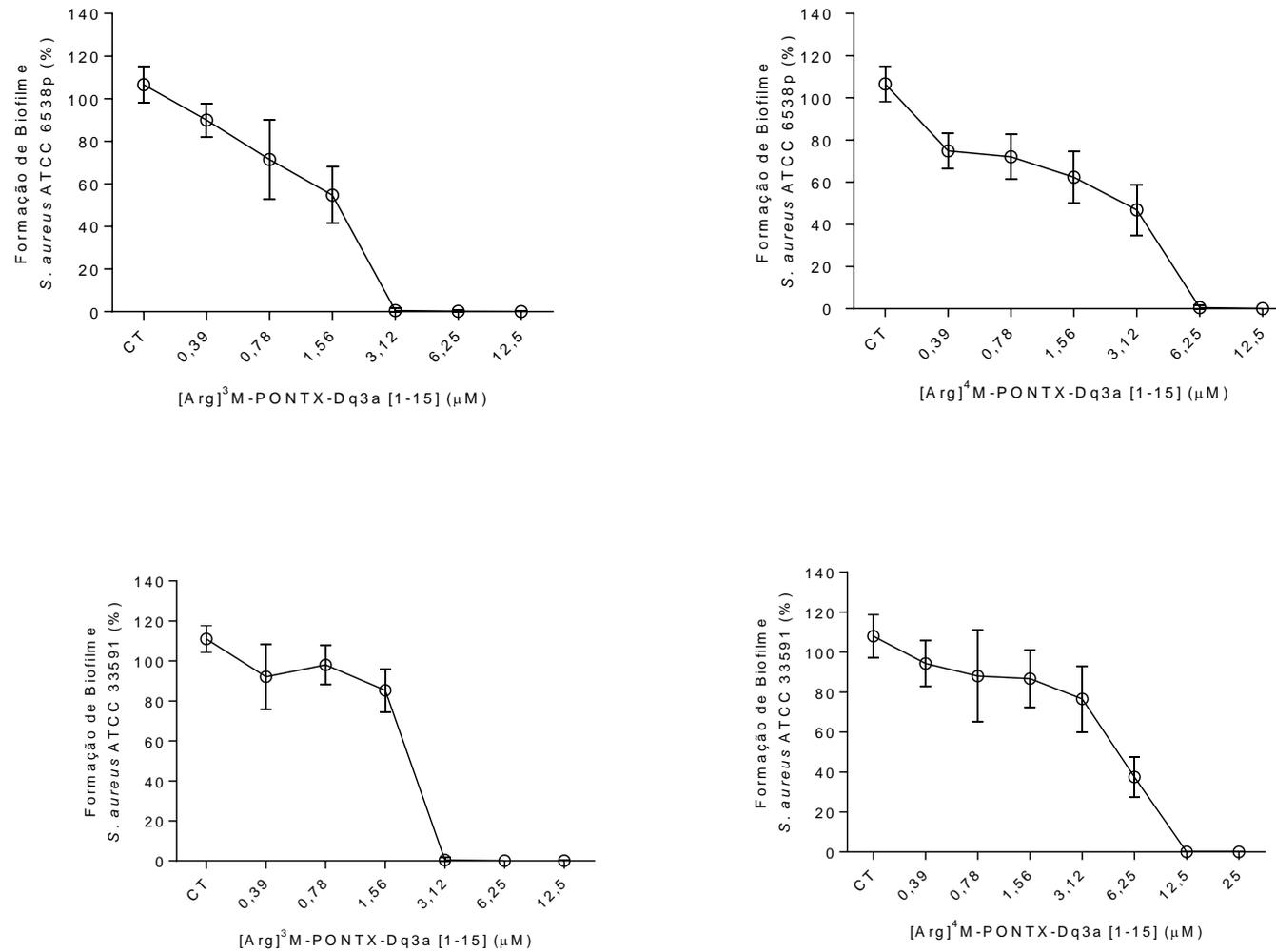
Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com * $p < 0,05$ em relação ao CT.

Figura 15: Efeito da oxacilina e vancomicina sobre cepas de *S. aureus*.



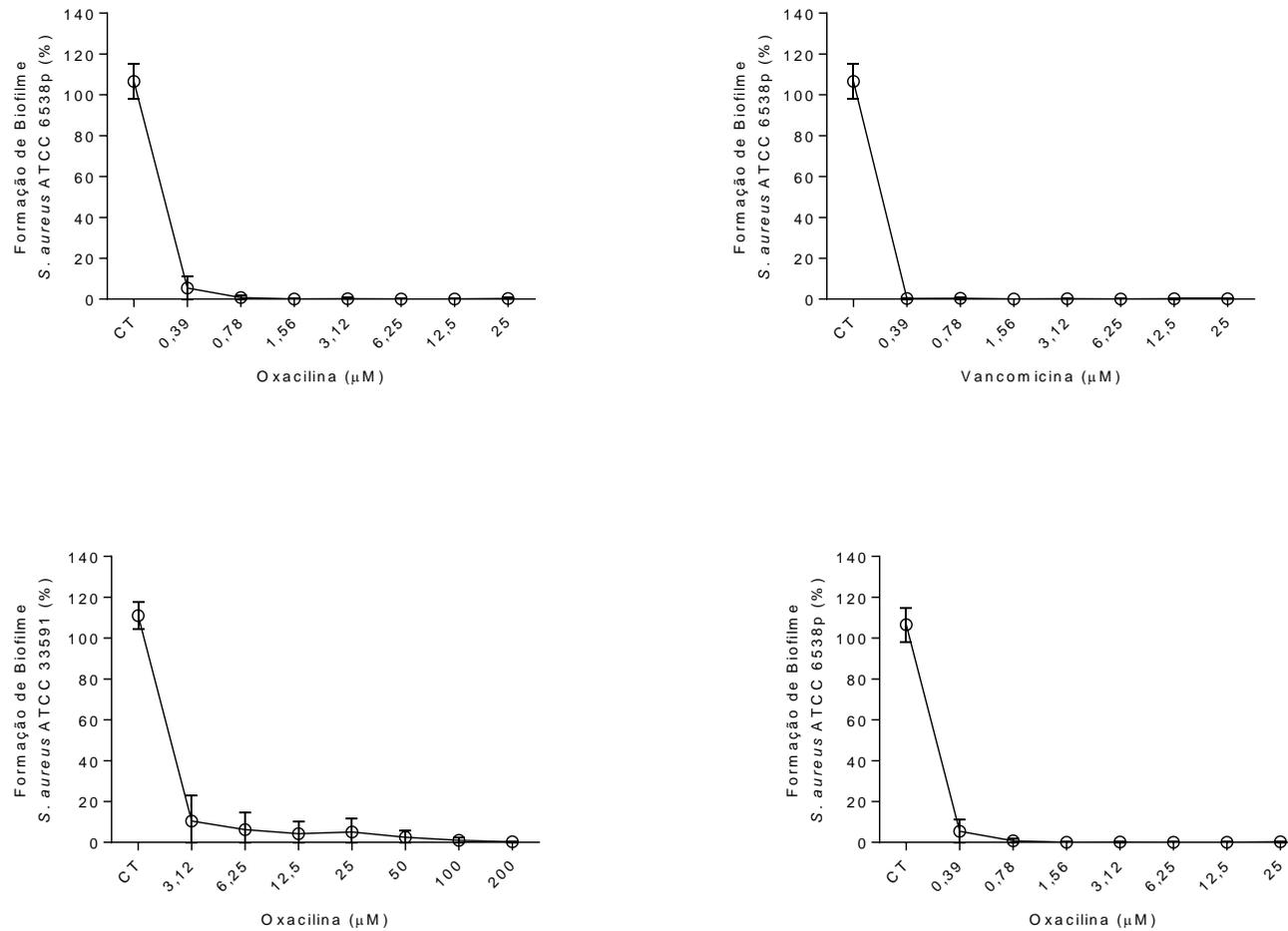
Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$ em relação ao CT.

Figura 16: Efeito de peptídeos modificados sobre a formação de biofilme por cepas de *S. aureus*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com * $p < 0,05$

Figura 17: Efeito da oxacilina e vancomicina sobre a formação de biofilme por cepas de *S. aureus*.



Fonte: O autor (2023). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$ em relação ao CT.